

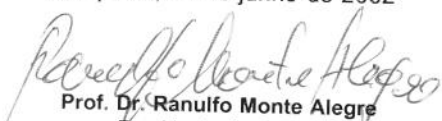
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE PECTINASE
MICROBIANA**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Álvaro Silva Lima**, aprovada pela Comissão Julgadora em 21 de junho de 2002.

Campinas, 21 de junho de 2002


Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
Presidente da Banca

Álvaro Silva Lima
Engenheiro Químico
Mestre em Engenharia de Alimentos

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
Orientador

Prof. Dr. Antonio José de Almeida Meirelles
Co-Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Campinas – SP
Abril, 2002

UNIDADE Be
Nº CHAMADA TVUNICAMP
L628e
V EX
TOMBO BC/ 50210
PROC 16-837/02
C DA
PREÇO R\$ 11,00
DATA 04/08/02
Nº CPD

CM001711B0-4

BIB ID 249049

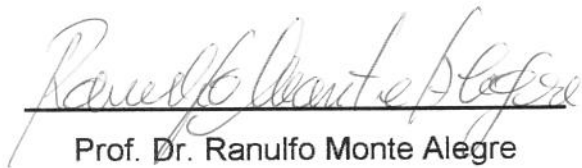
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

L628e Lima, Álvaro Silva
Extração líquido-líquido de pectinase microbiana / Álvaro
Silva Lima. – Campinas, SP: [s.n.], 2002.

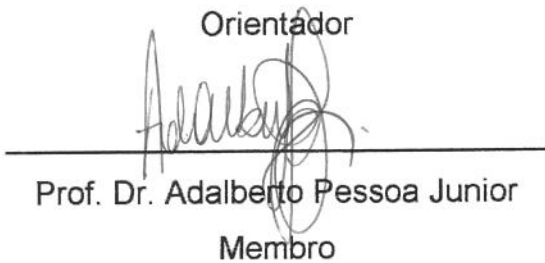
Orientador: Ranulfo Monte Alegre
Co-orientador: Antonio José de Almeida Meirelles
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

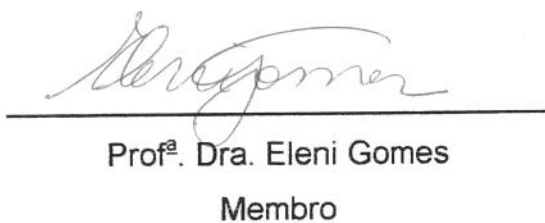
1.Fermentação. 2.Pectinase. I.Alegre, Ranulfo Monte.
II.Meirelles, Antonio José de Almeida. II.Universidade Estadual
de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA

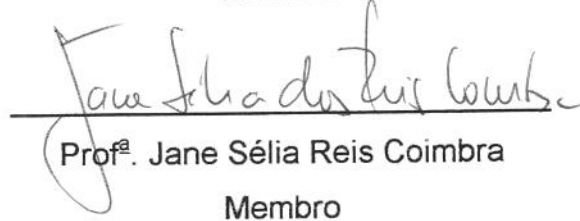

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre

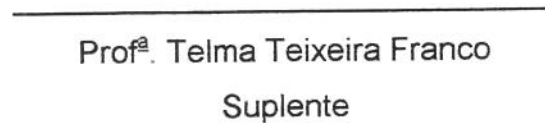
Orientador

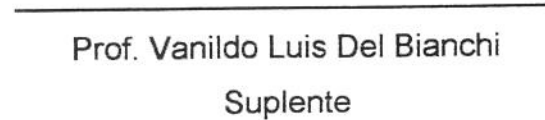

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Membro


Profª. Dra. Eleni Gomes
Membro


Prof. Dr. Fernando Antônio Cabral
Membro


Profª. Jane Sélia Reis Coimbra
Membro


Profª. Telma Teixeira Franco
Suplente


Prof. Vanildo Luis Del Bianchi
Suplente

*Dedico esta tese ao meu primeiro professor,
meu avô Armando Alves da Silva por ter sempre
acreditado que esse sonho se realizaria.*

A maior virtude que podemos deixar como legado a humanidade é a perseverança no trabalho, a simplicidade nas ações e o amor ao próximo

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus que, sem as barreiras das religiões, me conduziu pelo caminho da verdade e da alegria, me amparando nas dificuldades e me dando forças para sempre continuar.

Ao professor Ranulfo Monte Alegre, pelo excelente convívio, pela magnífica orientação, pela presença constante na execução deste trabalho, pela amizade e principalmente pelas palavras amigas e conselhos valiosos.

Ao professor Antonio José de Almeida Meirelles, por ter acreditado no potencial deste trabalho, pelas discussões imprescindíveis para o êxito deste.

A FAPESP pelo suporte financeiro que foi de vital importância na execução do trabalho.

Aos membros da banca, que nas correções, contribuíram de forma crucial para a boa apresentação desta tese.

Aos colegas do Laboratório de Tratamento de Resíduos e Processos Fermentativos: Adriana, David, Evelin, Jean, Márcia, Maurício, Raquel, Rodnei e Tânia pelo excelente convívio e pelo super carinho que tínhamos e continuaremos a ter.

Aos colegas do Laboratório de Separações Físicas: Luciana Ninni, Elias, Cristina, Lintomem, Eduardo pela presença agradável nos diversos dias que trabalhamos lado a lado.

A amiga Lia por ter dividido todos os momentos e pelo carinho constante, Eliana Kamimura por ter sido sempre um verdadeiro anjo, Eliana (boliviana) pelas conversas que varavam a noite e pelas taças de vinho que nos fazia esquecer a saudade de casa, Zé Guilherme pela irmandade que surgiu e continua entre nós, Ana Catarina pelo companheirismo. A todos vocês meu agradecimento maior e a certeza de que os considero meus IRMÃOS.

A D. Maria por ter sempre uma palavra amiga, um gesto de carinho e ter lavado todo o material que usava, mesmo que fosse 500 tubos de ensaio por dia.

As amigadas formadas durante os anos vividos na UNICAMP: Simone, Marcelo, Ássima, Henelyta e famílias pelas várias festas e clima harmonioso que passamos.

Aos colegas Mauro, Alessandra Lopes, Ranieri, Alfredo, Gabriel, Vera, Silvia, Flávio, Kitty, Mari e Oscar pelas alegrias diárias, conversas e incentivos mútuos.

As minhas três mães Núbia (a que tem o título de fato) Maria (avó) pela espera de um dia me verem voltar para casa e Aída (irmã) por ser meu modelo de conduta.

Ao meu pai Valdomiro e irmão Tales que mesmo não demonstrando sabia que acreditavam na minha luta. E nas coisas mais fofas da minha vida, meus sobrinhos (Talinho e Belinha) pelos beijos e abraços deliciosos que felizmente agora são mais constantes.

A todos os demais familiares que apesar da distância se faziam sempre presentes.

Aos amigos de longe: Marisa (Argentina), Luz Maria (Cuba) e Alejandro (México) - *gracias por todo*, Tâmara (Geórgia), Supinda (Tailândia) e Markus Degen – *vielen Danke*. E a Markus Wandir (Sergipe) um grande incentivador da minha carreira acadêmica.

Aos técnicos e funcionários do DEA e da FEA por saber que sempre poderia contar com cada um deles.

A todos aqueles que por um lapso de memória não foram citados, mas que dispenso um carinho valioso. Aqueles que contribuíram de uma ou outra forma para a execução deste trabalho.

Meu muito obrigado e gratidão eterna

Álvaro Silva Lima

CONTEÚDO

LISTA DE TABELAS	xvii
LISTA DE FIGURAS	xxxvii
RESUMO	xliv
SUMMARY	xlvii
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	3

Capítulo 1: Revisão Bibliográfica

1.1. SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS.....	6
1.2. ENZIMAS PECTINOLÍTICAS	8
1.2.1. Produção.....	12
1.2.2. Aplicação industrial	17
1.2.3. Purificação	19
1.3. SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS (SAB).....	21
1.3.1. Tipos de Sistemas.....	22
1.3.2. Diagrama de Fases.....	24
1.3.3. Componentes do Sistema	26
1.3.3.1. Polietileno glicol	26
1.3.3.2. Maltodextrina.....	27

1.3.4. Coeficiente de Partição	28
1.3.5. Separações	29
1.3.6. Vantagens do Processo	34

Capítulo 2: Estudo das Análises Empregadas na Produção e Purificação Das Enzimas Pectinolíticas

2.1. INTRODUÇÃO.....	36
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
2.2.1. Determinação da Concentração de Proteínas Totais.....	37
2.2.2. Determinação da Concentração de Pectina.....	37
2.2.3. Determinação da Concentração dos Açúcares Redutores.....	37
2.2.4. Determinação da Concentração de Metanol.....	37
2.2.5. Determinação da Atividade de Poligactoronase (PG).....	38
2.2.6. Determinação da Atividade de Pectina-liase (PL).....	38
2.2.7. Determinação da Atividade de Pectina-esterase (PE).....	39
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
2.3.1. Determinação da Porcentagem de Pureza do Substrato Comercial	40
2.3.2. Teste da inativação Enzimática.....	41
2.3.3. Avaliação das Atividades Enzimáticas	42
2.3.3.1. Atividade de PE.....	42
2.3.3.2. Atividade de PL.....	44
2.3.3.3. Atividade de Exo-PG.....	45

2.3.3.3. Atividade de Endo-PG.....	46
2.3.4. Influência dos componentes formadores do SAB na atividade enzimática e concentrações de proteína totais	47
2.4. CONCLUSÕES PARCIAIS	51

Capítulo 3: Produção de Enzimas Pectinolíticas por Fermentação Submersa

3.1. INTRODUÇÃO.....	54
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS	55
3.2.1. Microrganismos e Meio de Cultura.....	55
3.2.2. Condições das Fermentações.....	56
3.2.3. Determinação da Massa Celular Seca.....	56
3.2.4. Determinação da Concentração de Proteínas Totais.....	56
3.2.5. Determinação da Concentração de Pectina.....	56
3.2.6. Determinação da Concentração dos Açúcares Redutores.....	57
3.2.7. Determinação da Concentração de Metanol.....	57
3.2.8. Determinação da Concentração de Glicose.....	57
3.2.9. Determinação da Concentração de Sacarose.....	58
3.2.10. Determinação da Atividade de Poligactoronase (PG)	58
3.2.11. Determinação da Atividade de Pectina-liase (PL)	59
3.2.12. Determinação da Atividade de Pectina-esterase (PE)	59
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
3.3.1. Fermentação com <i>Picchia canadensis</i> CCT-2636	60

3.3.2. Fermentações com <i>Penicillium italicum</i> IZ-1584	62
3.3.3. Fermentações com <i>Humicola grisea</i> CCT-2664	69
3.3.4. Fermentações com <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3122	75
3.4. Conclusões Parciais	82

Capítulo 4: Partição das Enzimas Pectinolíticas Comerciais em Sistemas Aquosos Bifásicos

4.1. INTRODUÇÃO	84
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS	85
4.2.1. Enzimas Pectinolíticas	85
4.2.2. Sistema Aquoso Bifásico	85
4.2.3. Determinação da Concentração de Proteínas Totais	88
4.2.4. Determinação da Concentração dos Açúcares Redutores	88
4.2.5. Determinação da Concentração de Metanol	89
4.2.6. Determinação da Atividade de Pectina-esterase (PE)	89
4.2.7. Determinação da Atividade de Pectina-liase (PL)	89
4.2.8. Determinação da Atividade de Poligalacturonase (PG)	89
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
4.3.1. Ensaio de Extração	90
4.3.1.1. Sistema PEG/fosfato de potássio	90
4.3.1.2. Sistema PEG/fosfato de potássio com adição de NaCl	97
4.3.1.3. Sistema PEG/citrato de sódio	102

4.3.1.4. Sistema PEG/citrato de sódio com adição de NaCl	107
4.3.1.5. Sistema PEG/maltodextrina	111
4.3.1.6. Sistemas PEG/maltodextrina com adição de NaCl	116
4.3. CONCLUSÕES PARCIAIS	121

Capítulo 5: Partição das enzimas Pectinolíticas Produzidas por *Aspergillus niger* NRRL-3122 em Fermentação Submersa

5.1. INTRODUÇÃO	124
5.2. MATERIAI E MÉTODOS	125
5.2.1. Microrganismo e Meio de Cultura.....	125
5.2.2. Condições das Fermentações.....	125
5.2.3. Concentração das Enzimas	126
5.2.4. Sistema Aquoso Bifásico.....	127
5.2.5. Determinação da Massa Celular Seca	127
5.2.6. Determinação da Concentração de Proteínas Totais.....	128
5.2.7. Determinação da Concentração dos Açúcares Redutores.....	128
5.2.8. Determinação da Concentração de Metanol	128
5.2.9. Determinação da Concentração de Glicose.....	128
5.2.10. Determinação da Atividade de Poligactoronase (PG).....	128
5.2.11. Determinação da Atividade de Pectina-liase (PL)	129
5.2.12. Determinação da Atividade de Pectina-esterase (PE)	129
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	130

5.3.1. Produção das Enzimas Pectinolíticas	130
5.3.2. Precipitação Enzimática	133
5.3.3. Ensaios de Extração	134
5.3.3.1. Sistema PEG/fosfato de potássio.....	134
5.3.3.2. Sistema PEG/fosfato de potássio com adição de NaCl	140
5.3.2.3. Sistema PEG/citrato de sódio	144
5.3.2.4. Sistema PEG/citrato de sódio com adição de NaCl	150
5.3.2.5. Sistema PEG/maltodextrina	154
5.3. CONCLUSÕES PARCIAIS	155
CONCLUSÕES GERAIS	157
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	159
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	161
APÊNDICE A	173
APÊNDICE B	181
APÊNCIDE C	199
APÊNDICE D	223

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Teor de pectina em vegetais	8
Tabela 1.2: Classificação das enzimas pectinolíticas	9
Tabela 1.3: Sistemas aquosos bifásicos formados por dois polímeros	22
Tabela 1.4: Sistemas aquosos bifásicos formados por um polímero e um soluto de baixo peso molecular	23
Tabela 2.1: Porcentagem de Pureza da pectina comercial tipo 8002	41
Tabela 2.2: Atividade enzimática de PE pelo método titulométrico em diferentes concentrações de pectina	44
Tabela 3.1: Composição dos meios de cultura	55
Tabela 4.1: Recuperações (%) na fase de topo para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	93
Tabela 4.2: Fator de purificação na fase de topo para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	94
Tabela 4.3: Recuperações (%) das proteínas, PE e PL, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	95
Tabela 4.4: Recuperações (%) da PL e PE, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.....	95

Tabela 4.5: Fator de purificação, tomando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/5%) a pH 7,0 e 4°C	96
Tabela 4.6: Recuperações (%) na fase de topo para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C	99
Tabela 4.7: Fator de purificação na fase de topo para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C	100
Tabela 4.8: Recuperações (%) das proteínas, PE e PL, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl a pH 7,0 e 4°C	101
Tabela 4.9: Recuperações (%) de exo-PG e endo-PG, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C	101
Tabela 4.10: Fator de purificação, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	102
Tabela 4.11: Recuperações (%) na fase de topo para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	104
Tabela 4.12: Fator de purificação na fase de topo para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	105
Tabela 4.13: Recuperações (%) das proteínas e da PL, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	106
Tabela 4.14: Recuperações (%) da Endo-PG e Exo-PG, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	106

Tabela 4.15: Fator de purificação, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	106
Tabela 4.16: Recuperações (%) na fase de topo para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C	109
Tabela 4.17: Fator de purificação na fase de topo para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C	109
Tabela 4.18: Recuperações (%) das proteínas e da PL, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C	110
Tabela 4.19: Recuperações (%) da exo-PG e endo-PG, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C	110
Tabela 4.20: Fator de purificação, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl a pH 7,0 e 4°C.....	111
Tabela 4.21: Recuperações (%) na fase de topo para o sistema PEG/maltodextrina (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	114
Tabela 4.22: Fator de purificação na fase de topo para o sistema PEG/maltodextrina (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	115
Tabela 4.23: Recuperações (%) das proteínas e da PL, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/maltodextrina (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	115
Tabela 4.24: Recuperações (%) da exo-PG e endo-PG, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/maltodextrina (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	115

Tabela 4.25: Fator de purificação, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/maltodextrina (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	116
Tabela 4.26: Recuperações (%) na fase de topo para o sistema PEG/maltodextrina (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C	119
Tabela 4.27: Fator de purificação na fase de topo para o sistema PEG/maltodextrina (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C	119
Tabela 4.28: Recuperações (%) das proteínas e da PL, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/maltodextrina (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C	119
Tabela 4.29: Recuperações (%) da endo-PG e exo-PG, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/maltodextrina (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C	120
Tabela 4.30: Fator de purificação, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/maltodextrina (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C	120
Tabela 5.1: Composição dos meios de cultura	125
Tabela 5.2: Resultados da concentração do caldo fermentado de <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3122 para as extrações com os sistemas PEG/fosfato de potássio com e sem NaCl	134
Tabela 5.3: Recuperações (%) na fase de topo para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	137
Tabela 5.4: Fator de purificação na fase de topo para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	138

Tabela 5.5: Recuperações (%) das proteínas, PE e PL, utilizando como referência inicial o caldo fermentado e dialisado, para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	139
Tabela 5.6: Recuperações (%) da PL e PE, utilizando como referência inicial o caldo fermentado e dialisado, para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	139
Tabela 5.7: Fator de purificação, tomando como referência inicial o caldo fermentado e dialisado, para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/5%) a pH 7,0 e 4°C	140
Tabela 5.8: Recuperações (%) na fase de topo para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C	143
Tabela 5.9: Fator de purificação na fase de topo para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C	143
Tabela 5.10: Recuperações (%) das proteínas, PE e PL, utilizando como referência o caldo fermentado e dialisado, para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl a pH 7,0 e 4°C	144
Tabela 5.11: Recuperações (%) de exo-PG e endo-PG, utilizando como referência inicial o caldo fermentado e dialisado, para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C	144
Tabela 5.12: Fator de purificação, utilizando como referência inicial o caldo fermentado e dialisado, para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	144
Tabela 5.13: Resultados da concentração do caldo fermentado de <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3122 para as extrações com os sistemas PEG/citrato de sódio sem NaCl	145

Tabela 5.14: Recuperações (%) na fase de topo para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	148
Tabela 5.15: Fator de purificação na fase de topo para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	148
Tabela 5.16: Recuperações (%) das proteínas e da PL, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	149
Tabela 5.17: Recuperações (%) da Endo-PG e Exo-PG, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	149
Tabela 5.18: Fator de purificação, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	149
Tabela 5.19: Recuperações (%) na fase de topo para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C	152
Tabela 5.20: Fator de purificação na fase de topo para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C	153
Tabela 5.21: Recuperações (%) das proteínas e da PL, utilizando como referência inicial o caldo fermentado e dialisado, para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C	153
Tabela 5.22: Recuperações (%) da exo-PG e endo-PG, utilizando como referência inicial o caldo fermentado e dialisado, para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C	154
Tabela 5.23: Fator de purificação, utilizando como referência inicial o caldo fermentado e dialisado, para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl a pH 7,0 e 4°C.....	154

Tabela A-1: Teor de açúcares redutores em amostras de pectina 1% (p/v) e atividade de exo-PG de Pectinex-3XL em diferentes tempos de inativação	174
Tabela A-2: Concentração de metanol devido à ação enzimática e atividade de PE em Pectinex-3XL determinada pelo método espectrofotométrico em diferentes tempos de reação	174
Tabela A-3: Concentração de metanol devido à ação enzimática e atividade de PE em Pectinex-3XL determinada pelo método titulométrico em diferentes tempos de reação	174
Tabela A-4: Absorbância provocada pela ação enzimática e atividade de PL em Pectinex-3XL em diferentes tempos de reação	175
Tabela A-5: Concentração de metanol devido à ação enzimática e atividade de PE em Pectinex-3XL determinada pelo método titulométrico em diferentes tempos de reação	175
Tabela A-6: Variação da viscosidade da solução de pectina 1% (p/v) em tampão acetato 0,1 M pH 4,5 a 37°C pela ação da endo-PG da Pectinex-3XL	175
Tabela A-7: Atividade de endo-PG de Pectinex-3XL em diferentes tempos de reação	176
Tabela A-8: Resultados da interferência dos componentes formadores do sistema aquoso bifásico na concentração de proteínas	176
Tabela A-9: Resultados da interferência dos componentes formadores do sistema aquoso bifásico na atividade de PL	177
Tabela A-10: Resultados da interferência dos componentes formadores do sistema aquoso bifásico na atividade de exo-PG	177
Tabela A-11: Resultados da interferência dos componentes formadores do sistema aquoso bifásico na atividade de endo-PG	178

Tabela B-1: Resultados da fermentação de pectina comercial tipo 8002 por <i>Pichia canadensis</i> CCT-2636 a 28°C e pH 5,0 em meio 03	182
Tabela B-2: Resultados do comportamento do pH, concentração de proteína e glicose na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por <i>Pichia canadensis</i> CCT-2636 a 28°C e pH 5,0 em meio 03	183
Tabela B-3: Resultados da fermentação de pectina comercial tipo 8002 por <i>Penicillium italicum</i> IZ-1584 a 28°C e pH 4,5 em meio 01	184
Tabela B-4: Resultados da fermentação de pectina comercial tipo 8002 por <i>Penicillium italicum</i> IZ-1584 a 28°C e pH 4,5 em meio 02	185
Tabela B-5: Resultados do comportamento do pH, concentração de sacarose e glicose na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por <i>Penicillium italicum</i> IZ-1584 a 28°C e pH 5,0 em meio 02	186
Tabela B-6: Resultados da fermentação de pectina comercial tipo 8002 por <i>Penicillium italicum</i> IZ-1584 a 28°C e pH 4,5 em meio 03	187
Tabela B-7: Resultados do comportamento do pH, concentração de proteína e glicose na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por <i>Penicillium italicum</i> IZ-1584 a 28°C e pH 5,0 em meio 03	188
Tabela B-8 Resultados da fermentação de pectina comercial tipo 8002 por <i>Humicola grisea</i> CCT-2664 a 28°C e pH 4,5 em meio 01	189
Tabela B-9: Resultados da fermentação de pectina comercial tipo 8002 por <i>Humicola grisea</i> CCT-2664 a 28°C e pH 4,5 em meio 02	190
Tabela B-10: Resultados do comportamento do pH, concentração de sacarose e glicose na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por <i>Humicola grisea</i> CCT-266436 a 28°C e pH 5,0 em meio 02	191

Tabela B-11: Resultados da fermentação de pectina comercial tipo 8002 por <i>Humicola grisea</i> CCT-2664 a 28°C e pH 4,5 em meio 03	192
Tabela B-12: Resultados do comportamento do pH, concentração de proteína e glicose na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por <i>Humicola grisea</i> CCT-2664 a 28°C e pH 5,0 em meio 03	193
Tabela B-13: Resultados da fermentação de pectina comercial tipo 8002 por <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3122 a 28°C e pH 4,5 em meio 01	194
Tabela B-14: Resultados da fermentação de pectina comercial tipo 8002 por <i>Aspergillus niger</i> NRRL-31222664 a 28°C e pH 4,5 em meio 02	195
Tabela B-15: Resultados do comportamento do pH, concentração de sacarose e glicose na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3122 a 28°C e pH 5,0 em meio 02	196
Tabela B-16: Resultados da fermentação de pectina comercial tipo 8002 por <i>Aspergillus niger</i> NRRL-31222664 a 28°C e pH 4,5 em meio 03	197
Tabela B-17: Resultados do comportamento do pH, concentração de proteína e glicose na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3122 a 28°C e pH 5,0 em meio 03	198
Tabela C-1: Volume das fases e do sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C para separar enzimas pectinolíticas contidas na Pectinex-3XL	200
Tabela C-2: Coeficientes de partição para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C para separar enzimas pectinolíticas contidas na Pectinex-3XL	200
Tabela C-3: Recuperações (%) na fase de fundo para o sistema PEG/fosfato de potássio (20-15%) a pH 7,0 e 4°C	201

Tabela C-4: Fatores de Purificação n fase de fundo para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	201
Tabela C-5: Resultados da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Pectinex-3XL pelo sistema PEG 400/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7 e 4°C	202
Tabela C-6: Resultados da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Pectinex-3XL pelo sistema PEG-600/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7 e 4°C	202
Tabela C-7: Resultados da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Pectinex-3XL pelo sistema PEG-1000/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7 e 4°C	202
Tabela C-8: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Pectinex-3XL pelo sistema PEG-1450/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7 e 4°C	203
Tabela C-9: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Pectinex-3XL pelo sistema PEG-3350/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7 e 4°C	203
Tabela C-10: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Pectinex-3XL pelo sistema PEG-8000/fosfato de potássio (20-15%) a pH 7 e 4°C	203
Tabela C-11: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Pectinex-3XL pelo sistema PEG-10000/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7 e 4°C	204
Tabela C-12: Volume das fases para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C com NaCl (6%) para separar enzimas pectinolíticas contidas na Pectinex-3XL	204

Tabela C-13: Coeficientes de partição para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C com NaCl (6%) para separar enzimas pectinolíticas contidas na Pectinex-3XL	205
Tabela C-14: Recuperações (%) na fase de fundo para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C	205
Tabela C-15: Fatores de Purificação na fase de fundo para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C	206
Tabela C-16: Resultados da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Pectinex-3XL pelo sistema PEG 400/fosfato de potássio (20-15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C	206
Tabela C-17: Resultados da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Pectinex-3XL pelo sistema PEG-600/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C	206
Tabela C-18: Resultados da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Pectinex-3XL pelo sistema PEG-1000/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C	207
Tabela C-19: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Pectinex-3XL pelo sistema PEG-1450/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C	207
Tabela C-20: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Pectinex-3XL pelo sistema PEG-3350/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C	207
Tabela C-21: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Pectinex-3XL pelo sistema PEG-8000/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C	208

Tabela C-22: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Pectinex-3XL pelo sistema PEG-10000/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C	208
Tabela C-23: Volume das fases para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C para separar enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L	208
Tabela C-24: Coeficientes de partição para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C para separar enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L	209
Tabela C-25: Recuperações (%) na fase de fundo para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e	209
Tabela C-26: Fatores de Purificação na fase de fundo para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	210
Tabela C-27: Resultados da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-600/citrato de sódio (20/15%) a pH 7 e 4°C	210
Tabela C-28: Resultados da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-1000/citrato de sódio (20/15%) a pH 7 e 4°C	210
Tabela C-29: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-1450/citrato de sódio (20/15%) a pH 7 e 4°C	211
Tabela C-30: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-3350/citrato de sódio (20/15%) a pH 7 e 4°C	211

Tabela C-31: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-8000/citrato de sódio (20/15%) a pH 7 e 4°C	211
Tabela C-32: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-10000/citrato de sódio (20/15%) a pH 7 e 4°C	212
Tabela C-33: Volume das fases para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C para separar enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L	212
Tabela C-34: Coeficientes de partição para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C para separar enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L	212
Tabela C-35: Recuperações (%) na fase de fundo para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C	213
Tabela C-36: Fatores de Purificação na fase de fundo para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C	213
Tabela C-37: Resultados da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-600/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C	213
Tabela C-38: Resultados da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-1000/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C	214
Tabela C-39: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-1450/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C	214

Tabela C-40: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-3350/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 07 e 4°C	214
Tabela C-41: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na .Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-8000/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C	215
Tabela C-42: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-10000/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C	215
Tabela C-43: Volume das fases para o sistema PEG/maltodextrina (20/15%) a pH 7,0 e 4°C para separar enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L	215
Tabela C-44: Coeficientes de partição para o sistema PEG/maltodextrina (20/15%) a pH 7,0 e 4°C para separar enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L	216
Tabela C-45: Recuperações (%) na fase de fundo para o sistema PEG/maltodextrina (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	216
Tabela C-46: Fatores de Purificação na fase de fundo para o sistema PEG/maltodextrina (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	216
Tabela C-47: Resultados da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-600/maltodextrina (20/15%) a pH 7 e 4°C	217
Tabela C-48: Resultados da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-1000/maltodextrina (20/15%) a pH 7 e 4°C	217

Tabela C-49: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-1450/maltodextrina (20/15%) a pH 7 e 4°C	217
Tabela C-50: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-3350/maltodextrina (20/15%) a pH 07 e 4°C	218
Tabela C-51: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-8000/maltodextrina (20/15%) a pH 7 e 4°C	218
Tabela C-52: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-10000/maltodextrina (20/15%) a pH 7 e 4°C	218
Tabela C-53: Volume das fases para o sistema PEG/maltodextrina (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C para separar enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L	219
Tabela C-54: Coeficientes de partição para o sistema PEG/maltodextrina (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C para separar enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L	219
Tabela C-55: Recuperações (%) na fase de fundo para o sistema PEG/maltodextrina (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C	220
Tabela C-56: Fatores de Purificação na fase de fundo para o sistema PEG/maltodextrina (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C	220
Tabela C-57: Resultados da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-600/maltodextrina (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7e 4°C	220

Tabela C-58: Resultados da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-1000/maltodextrina (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C	221
Tabela C-59: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-1450/maltodextrina (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C	221
Tabela C-60: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-3350/maltodextrina (20/15%) com NaCl (6%) a pH 07 e 4°C	221
Tabela C-61: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-8000/maltodextrina (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C	222
Tabela C-62: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-10000/maltodextrina (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C	222
Tabela D-1: Resultados do comportamento do pH, concentração de proteína e glicose na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3122 em Fermentador Bioflo a 28°C e pH 5,0 em meio 03	224
Tabela D-2: Resultados da fermentação de pectina comercial tipo 8002 por <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3122 em fermentador Bioflo a 28°C e pH 4,5 em meio 03	225
Tabela D-3: Resultado da precipitação de Pectinex-3XL por álcool etílico absoluto a -20°C	226
Tabela D-4: Volume das fases para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C para separar enzimas pectinolíticas produzidas por <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3112	226

Tabela D-5: Coeficientes de partição para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C para separar enzimas pectinolíticas produzidas por <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3112	227
Tabela D-6: Recuperações (%) na fase de fundo para o sistema PEG/fosfato de potássio (20-15%) a pH 7,0 e 4°C	227
Tabela D-7: Fatores de Purificação na fase de fundo para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	227
Tabela D-8: Resultados da extração das enzimas pectinolíticas de <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3122 pelo sistema PEG-1000/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7 e 4°C	228
Tabela D-9: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas de <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3122 pelo sistema PEG-1450/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7 e 4°C	228
Tabela D-10: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas de <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3122 pelo sistema PEG-3350/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7 e 4°C	228
Tabela D-11: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas de <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3122 pelo sistema PEG-8000/fosfato de potássio (20-15%) a pH 7 e 4°C	229
Tabela D-12: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas de <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3122 pelo sistema PEG-10000/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7 e 4°C	229
Tabela D-13: Volume das fases para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C com NaCl (6%) para separar enzimas pectinolíticas de <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3122	229

Tabela D-14: Coeficientes de partição para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C com NaCl (6%) para separar enzimas pectinolíticas de <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3122	230
Tabela D-15: Recuperações (%) na fase de fundo para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C	230
Tabela D-16: Fatores de Purificação na fase de fundo para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C	230
Tabela D-17: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas de <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3122 pelo sistema PEG-3350/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C	231
Tabela D-18: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas de <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3122 pelo sistema PEG-8000/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C	231
Tabela D-19: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas de <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3122 pelo sistema PEG-10000/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C	231
Tabela D-20: Volume das fases para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C para separar enzimas pectinolíticas de <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3122	232
Tabela D-21: Coeficientes de partição para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C para separar enzimas pectinolíticas de <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3122	232
Tabela D-22: Recuperações (%) na fase de fundo para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	232
Tabela D-23: Fatores de Purificação na fase de fundo para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	233

Tabela D-24: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas de <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3122 pelo sistema PEG-1450/citrato de sódio (20/15%) a pH 7 e 4°C	233
Tabela D-25: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas de <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3122 pelo sistema PEG-3350/citrato de sódio (20/15%) a pH 7 e 4°C	233
Tabela D-26: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas de <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3122 pelo sistema PEG-8000/citrato de sódio (20/15%) a pH 7 e 4°C	234
Tabela D-27: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas de <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3122 pelo sistema PEG-10000/citrato de sódio (20/15%) a pH 7 e 4°C	234
Tabela D-28: Volume das fases para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C para separar enzimas pectinolíticas de <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3122	234
Tabela D-29: Coeficientes de partição para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C para separar enzimas pectinolíticas de <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3122	235
Tabela D-30: Recuperações (%) na fase de fundo para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C	235
Tabela D-31: Fatores de Purificação na fase de fundo para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C	235
Tabela D-32: Resultados da extração das enzimas pectinolíticas de <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3122 pelo sistema PEG-1000/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C	236

Tabela D-33: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas de <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3122 pelo sistema PEG-1450/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C	236
Tabela D-34: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas de <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3122 pelo sistema PEG-3350/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 07 e 4°C	236
Tabela D-35: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas de <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3122 pelo sistema PEG-8000/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C	237
Tabela D-36: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas de <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3122 pelo sistema PEG-10000/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C	237

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Estrutura detalhada da molécula de pectina (Sakai <i>et alli</i> , 1979).....	7
Figura 1.2: Mecanismo de ação da pectina-esterase. Fonte: Whitaker (1990)	10
Figura 1.3: Mecanismo de ação da poligalacturonase. Fonte: Whitaker (1990) ...	11
Figura 1.4: Mecanismo de ação da pectina-liase. Fonte: Whitaker (1990)	11
Figura 1.5: Esquema representativo de um diagrama de equilíbrio: linhas de amarração (—) e curva binodal (—) (Fonte: Silva <i>et alli</i> , 1994)	24
Figura 1.6: Estrutura química da molécula de maltodextrina	27
Figura 2.1: Avaliação da inativação térmica da enzima exo-PG	42
Figura 2.2: Atividade de PE pelo método espectrofotométrico em função do tempo de reação	43
Figura 2.3: Atividade de PE pelo método titulométrico em função do tempo de reação	43
Figura 2.4: Atividade de PL em função do tempo de reação	45
Figura 2.5: Atividade de exo-PG em função do tempo de reação	45
Figura 2.6: Redução da viscosidade de uma solução de Pectina 1% (p/v) em tampão acetato 0,1 M a pH 4,5 e 37°C pela ação da endo-PG em relação ao tempo	46
Figura 2.7: Atividade de endo-PG em relação ao tempo	47

Figura 2.8: Interferência dos constituintes das fases do sistema aquoso bifásico na concentração de proteína.	48
Figura 2.9: Interferência dos constituintes das fases do sistema aquoso bifásico na atividade de PL	49
Figura 2.10: Interferência dos constituintes das fases do sistema aquoso bifásico na atividade de exo-PG	49
Figura 2.11: Interferência dos constituintes das fases do sistema aquoso bifásico na atividade de endo-PG	50
Figura 3.1: Comportamento das atividades enzimáticas (PE-■, PL-▲, exo-PG-O e endo-PG-●), da concentração de massa seca (◆) e do valor do pH (△) na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por <i>Pichia canadensis</i> CCT-2636 a 28°C e pH inicial 5,0 (meio 3)	61
Figura 3.2: Comportamento do valor do pH (△) e das concentrações de proteína (□) e glicose (◇) na fermentação de pectina tipo 8002 por <i>Pichia canadensis</i> CCT-26364 a 28°C e pH inicial 5,0 (meio 3)	62
Figura 3.3: Comportamento das atividades enzimáticas (PE-■, PL-▲, exo-PG-O e endo-PG-●), das concentrações de massa seca (◆), de proteína (□) e de pectina (★) e do valor do pH (△) na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por <i>Penicillium italicum</i> IZ-1584 a 28°C e pH inicial 4,5 (meio 1)	63
Figura 3.4: Comportamento das atividades enzimáticas (PE-■, PL-▲, exo-PG-O e endo-PG-●) e das concentrações de massa seca (◆), de proteína (□) e de pectina (★) e do valor do pH (△) na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por <i>Penicillium italicum</i> IZ-1584 a 28°C e pH inicial 4,5 (meio 2)	65
Figura 3.5: Comportamento do valor do pH (△) e das concentrações de glicose (◇) e sacarose (+) na fermentação de pectina tipo 8002 por <i>Penicillium italicum</i> IZ-1584 a 28°C e pH inicial 4,5 (meio 2)	66

- Figura 3.6:** Comportamento das atividades enzimáticas (PE-■, PL-▲, exo-PG-O e endo-PG-●), da concentração de massa seca (◆), de proteína (□) e de pectina (★) e do valor de pH (△) na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Penicillium italicum* IZ-1584 a 28°C e pH inicial 5,0 (meio 3)67
- Figura 3.7:** Comportamento do valor do pH (△) e das concentrações de proteína (□) e glicose (◇) na fermentação de pectina tipo 8002 por *Penicillium italicum* IZ-1584 a 28°C e pH inicial 4,5 (meio 3)68
- Figura 3.8:** Comportamento das atividades enzimáticas (PE-■, PL-▲, exo-PG-O e endo-PG-●), das concentrações de massa seca (◆), de proteína (□) e de pectina (★) e do valor do pH (△) na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Humicola grisea* CCT-2664 a 28°C e pH inicial 4,5 (meio 1)70
- Figura 3.9:** Comportamento das atividades enzimáticas (PE-■, PL-▲, exo-PG-O e endo-PG-●) e das concentrações de massa seca (◆), de proteína (□) e de pectina (★) e do valor do pH (△) na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Humicola grisea* CCT-2664 a 28°C e pH inicial 4,5 (meio 2)71
- Figura 3.10:** Comportamento do valor do pH (△) e das concentrações de glicose (◇) e sacarose (+) na fermentação de pectina tipo 8002 por *Humicola grisea* CCT-2664 a 28°C e pH inicial 4,5 (meio 2)72
- Figura 3.11:** Comportamento das atividades enzimáticas (PE-■, PL-▲, exo-PG-O e endo-PG-●), da concentração de massa seca (◆), de proteína (□) e de pectina (★) e do valor do pH (△) na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Humicola grisea* CCT-2664 a 28°C e pH inicial 4,5 (meio 3)73
- Figura 3.12:** Comportamento do valor do pH (△) e das concentrações de proteína (□) e glicose (◇) na fermentação de pectina tipo 8002 por *Humicola grisea* CCT-2664 a 28°C e pH inicial 4,5 (meio 3)74

- Figura 3.13:** Comportamento das atividades enzimáticas (PE-■, PL-▲, exo-PG-O e endo-PG-●), das concentrações de massa seca (◆), de proteína (□) e de pectina (★) e do valor do pH (△) na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Aspergillus niger* NRRL-3122 a 28°C e pH inicial 4,5 (meio 1)76
- Figura 3.14:** Comportamento das atividades enzimáticas (PE-■, PL-▲, exo-PG-O e endo-PG-●) e das concentrações de massa seca (◆), de proteína (□) e de pectina (★) e do valor do pH (△) na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Aspergillus niger* NRRL-3122 a 28°C e pH inicial 4,5 (meio 2)77
- Figura 3.15:** Comportamento do valor do pH (△) e das concentrações de glicose (◇) e sacarose (+) na fermentação de pectina tipo 8002 por *Aspergillus niger* NRRL-3122 a 28°C e pH inicial 4,5 (meio 2)78
- Figura 3.16:** Comportamento das atividades enzimáticas (PE-■, PL-▲, exo-PG-O e endo-PG-●), da concentração de massa seca (◆), de proteína (□) e de pectina (★) e do valor do pH (△) na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Aspergillus niger* NRRL-3122 a 28°C e pH inicial 4,5 (meio 3)79
- Figura 3.17:** Comportamento do valor do pH (△) e das concentrações de proteína (□) e glicose (◇) na fermentação de pectina tipo 8002 por *Aspergillus niger* CNRRL-3122 a 28°C e pH inicial 4,5 (meio 3)80
- Figura 4.1:** Variação da porcentagem volumétrica da fase de topo (O) e de fundo (●) dos sistemas PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C92
- Figura 4.2:** Coeficientes de partição das proteínas totais (□) e enzimas pectinolíticas (PE ■, PL ▲, exo-PG O e endo-PG ●) nos sistemas PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C. Ordenada da esquerda: PL92
- Figura 4.3:** Variação da porcentagem volumétrica da fase de topo (O) e de fundo (●) dos sistemas PEG/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C98

Figura 4.4: Coeficientes de partição das proteínas totais (□) e enzimas pectinolíticas (PE ■, PL ▲, exo-PG ○ e endo-PG ●) nos sistemas PEG/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C	98
Figura 4.5: Variação da porcentagem volumétrica da fase de topo (○) e de fundo (●) dos sistemas PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	103
Figura 4.6: Coeficientes de partição das proteínas totais (□) e enzimas pectinolíticas (PL ▲, exo-PG ○ e endo-PG ●) nos sistemas PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	103
Figura 4.7: Variação da porcentagem volumétrica da fase de topo (○) e de fundo (●) dos sistemas PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C	108
Figura 4.8: Coeficientes de partição das proteínas totais (□) e enzimas pectinolíticas (PL ▲, exo-PG ● e endo-PG ●) nos sistemas PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C	108
Figura 4.9: Variação da porcentagem volumétrica da fase de topo (○) e de fundo (●) dos sistemas PEG/maltodextrina (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	113
Figura 4.10: Coeficientes de partição das proteínas totais (□) e enzimas pectinolíticas (PL ▲, exo-PG ● e endo-PG ●) nos sistemas PEG/maltodextrina (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	113
Figura 4.11: Variação da porcentagem volumétrica da fase de topo (○) e de fundo (●) dos sistemas PEG/maltodextrina (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C	118
Figura 4.12: Coeficientes de partição das proteínas totais (□) e enzimas pectinolíticas (PL ▲, exo-PG ● e endo-PG ●) nos sistemas PEG/maltodextrina (20/15%) com NaCL (6%) a pH 7,0 e 4°C	118
Figura 5.1: Fluxograma da concentração do caldo fermentado	126

Figura 5.2: Comportamento do valor do pH (Δ) e das concentrações de proteína ($\square$) e de glicose ($\diamond$) na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3122 a 28°C e pH inicial 4,5	131
Figura 5.3: Comportamento das atividades enzimáticas (PE-■; PL-▲, exo-PG-O e endo-PG-●), das concentrações de massa seca (◆) e de proteína ($\square$) e do valor do pH (Δ) na fermentação por <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3122 a 28°C e pH inicial 4,5	132
Figura 5.4: Precipitação de enzimas pectinolíticas contidas na enzima comercial Pectinex 3XL com etanol a -20°C em diferentes proporções de etanol e enzima	133
Figura 5.5: Variação da porcentagem volumétrica da fase de topo (●) e de fundo (O) dos sistemas PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C na separação de enzimas pectinolíticas de <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3112.	136
Figura 5.6: Coeficientes de partição das proteínas totais ($\square$) e enzimas pectinolíticas (PE-■, PL-▲, exo-PG-O e endo-PG-●) de <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3112 nos sistemas PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	137
Figura 5.7: Variação da porcentagem volumétrica da fase de topo (O) e de fundo (●) dos sistemas PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C na separação de enzimas pectinolíticas de <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3112	141
Figura 5.8: Coeficientes de partição das proteínas totais ($\square$) e enzimas pectinolíticas (PE-■, PL-▲, exo-PG-O e endo-PG-●) de <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3112 nos sistemas PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	142
Figura 5.9: Variação da porcentagem volumétrica da fase de topo (O) e de fundo (●) dos sistemas PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C na separação de enzimas pectinolíticas de <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3112	146

Figura 5.10: Coeficientes de partição das proteínas totais (□) e enzimas pectinolíticas (PE-■, PL-▲, exo-PG-O e endo-PG-●) de <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3112 nos sistemas PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C	147
Figura 5.11: Variação da porcentagem volumétrica da fase de topo (O) e de fundo (●) dos sistemas PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C na separação de enzimas pectinolíticas de <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3112	151
Figura 5.12: Coeficientes de partição das proteínas totais (□) e enzimas pectinolíticas (PE-■, PL-▲, exo-PG-O e endo-PG-●) de <i>Aspergillus niger</i> NRRL-3112 nos sistemas PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C	152
Figura A-1: Curva padrão de pectina pelo método de Dietz & Rouse (1953)	178
Figura A-2: Curvas binodais para o sistema PEG/fosfato com diferentes pesos moleculares de PEG (1- PEG-300, 2- PEG-600, 3- PEG-1450, 4- PEG-4000, 5- PEG-6000 e 6- PEG-20000) a 20°C. Fonte: Albertsson (1986)	179
Figura A-3: Curvas binodais para o sistema PEG/citrato com diferentes pesos moleculares de PEG a pH 7 e 25°C. Fonte: Vernau & Kula (1990)	180
Figura A-4: Diagrama de fase para o sistema PEG/maltodextrina a pH 7 e 25°C. Fonte: Silva & Meirelles (2000)	180

RESUMO

As enzimas pectinolíticas degradam as substâncias pécticas e são utilizadas na clarificação de sucos e vinhos. Dentre elas destacam-se a poligalacturonase (PG), pectina-esterase (PE) e pectina-liase (PL). Estas enzimas foram produzidas em fermentação submersa utilizando os microrganismos *Aspergillus niger* NRRL-3122, *Humicola grisea* CCT-2664, *Penicillium italicum* IZ-1584 e *Pichia canadensis* CCT-2636 em 3 diferentes meios de cultura (contendo pectina, pectina e sacarose e pectina e glicose). *A. niger* produziu maiores atividades de exo-PG (0,73 U/mL em meio contendo sacarose) e de endo-PG (56,83 U/mL em meio contendo glicose), já a PL foi produzida com maior atividade em meio contendo glicose (0,210 U/mL) utilizando-se *P. canadensis* e PE em meio contendo apenas pectina como fonte de carbono (0,076 U/mL) utilizando-se *H. grisea*. Sistemas aquosos bifásicos (SAB) são empregados no processo de purificação e fracionamento de enzimas. Foram formados sistemas Polietileno glicol (PEG)/fosfato de potássio, PEG/citrato de sódio e PEG/maltodextrina usando-se enzimas comerciais e enzimas produzidas através de fermentação com *A. niger*, estudou-se o efeito da massa molecular do PEG e da adição de NaCl sobre o fator de purificação (FP) em cada fase, a recuperação (R) em cada fase e o coeficiente de partição (K) das enzimas em SAB. Os sistemas com a enzima comercial apresentaram maiores FP em sistema PEG/fosfato na fase de topo, rica em PEG, sem adição de NaCl para PEG de alta massa molecular: PEG-8000 (exo-PG com FP= 16,64 vezes, R= 49,1% e K= 1,14) e PEG-10000 (PE com FP=14,27 vezes, R= 49,1% e K=1,14; PL com FP=14,27 vezes, R= 42,3% e K= 0,86 e endo-PG com FP= 16,28 vezes, R= 53,5% e K= 0,18). Utilizando-se o caldo de cultura fermentado obteve-se melhores resultados com adição de NaCl em sistemas PEG/citrato com PEG-3350 (PL com FP=13,61 vezes, R= 69,3% e K=1,93; exo-PG com FP=10,52 vezes, R= 53,6% e K= 0,98) e com PEG-10000 (endo-PG com FP= 4,41 vezes, R= 51,3% e K= 0,55) e sem adição de NaCl com PEG-3350 (PE com FP= 6,31 vezes, R= 47,9% e K= 0,62).

SUMMARY

Pectinolytic enzymes degrade molecules of pectic substances and are used to clear juices and wines. Among them we stand out poligalacturonase (PG), pectinesterase (PE) and pectinlyase (PL). These enzymes have been produced by submerged fermentation using *Aspergillus niger* NRRL-3122, *Humicola grisea* CCT-2664, *Penicillium italicum* IZ-1584 and *Pichia canadensis* CCT-2636 microorganisms in 3 different culture media (containing pectin, pectin and sucrose and pectin and glucose). *Aspergillus niger* has produced the best activities of exo-PG (0.73 U/mL in medium containing sucrose) and of endo-PG (56.83 U/mL in medium containing glucose). PL, through, has been produced better in medium containing glucose (0.210 U/mL) using *P. canadensis* and PE in medium containing just pectin as carbon source (0.076 U/mL) using *H. grisea*. Aqueous two-phase systems are used in the process of purification and fragmentation of enzymes. There has been formed PEG/phosphate, PEG/citrate and PEG/maltodextrin systems using commercial enzymes and produced by *A. niger* observing the effect of molecular weight of PEG and in addition of NaCl in the purification factor (FP), yield (R) and partition coefficient (K). The commercial enzyme systems have presented more FP in the upper phase without addition of NaCl in PEG/phosphate system with a high molecular PEG weight: PEG-8000 (exo-PG with FP = 16.64 times, R = 49,1% and K = 1.14) and PEG-10000 (PE with FP=14,27 times, R = 49,1% and K=1,14; PL with FP=14,27 times, R = 42,3% and K = 0.86 and endo-PG with FP = 16.28 times, R = 53,5% and K = 0.18). Using the fermented broth of culture there has been better results in addition of NaCl in the systems PEG/citrato with PEG-3350 (PL with FP=13,61 times, R = 69,3% and K=1,93; exo-PG with FP=10,52 times, R = 53,6% and K = 0.98) and with PEG-10000 (endo-PG with FP = 4,41 times, R = 51,3% and K = 0.55) and without addition of NaCl with PEG-3350 (PE with FP = 6,31 times, R = 47,9% and K = 0.62).

INTRODUÇÃO

As enzimas são catalisadores biológicos produzidos por células vivas, formadas por aminoácidos unidos por ligações peptídicas. Têm a propriedade de acelerar as reações químicas vitais destes microrganismos, que de outra maneira ocorreria de forma bastante lenta. Uma vez sintetizada, a enzima pode atuar independentemente da célula. Portanto, podem ser utilizadas para outras finalidades em diversos setores.

A utilização industrial de enzimas aumentou rapidamente nos últimos anos, porém a busca de novas estratégias para produção, obtenção de novas enzimas está apenas iniciando. O grande sucesso da aplicação destes biocatalisadores está relacionado com a sua eficiência, precisão e com sua ação em condições ambientes.

Dentre os vários tipos de enzimas pode-se destacar as enzimas pectinolíticas, responsáveis pela quebra das substâncias pécticas. Estas substâncias encontram-se em todos os tipos de frutas e bagas e atuam como uma espécie de cola unindo as fibras. Nas frutas verdes, a pectina encontra-se na sua forma insolúvel e é responsável pela firmeza do fruto. No processo de amadurecimento, as enzimas pectinolíticas são produzidas pra promover a transformação da protopectina em pectina, seguida da sua degradação para que a textura da fruta torne-se branda. As enzimas pectinolíticas podem ser classificadas de acordo com o seu ataque às substâncias pécticas, são hidrolases (poligalacturonase) liases (pectina-liase) e esterases (pectina-esterase). A principal aplicação industrial destas enzimas encontra-se no ramo alimentício na extração de sucos, redução de viscosidade de sucos concentrados, quebra de

emulsão de óleo essencial que se forma após a extração do suco, clarificação de vinhos e na indústria têxtil como agente degomante de fibras.

Vários microrganismos têm a capacidade de produzir estas enzimas, entretanto, os fungos, principalmente o *Aspergillus niger* têm maior utilização industrial. Por serem enzimas de ação extracelular, são lançadas no caldo de fermentação onde estão presentes diversas outras enzimas e biomoléculas. Por isso o emprego destas enzimas na indústria de alimentos está vinculado à sua pureza. Assim técnicas de purificação precisam ser aplicadas ao caldo fermentado.

Os métodos de purificação de enzimas requerem uma seqüência de passos que são responsáveis pelo alto custo de produção. As principais técnicas de purificação são a precipitação, diálise e vários tipos de cromatografias. Uma nova técnica que vem sendo empregada na purificação de proteínas e, recentemente, na purificação de enzimas é a extração líquido-líquido através de sistemas aquosos bifásicos.

Os sistemas aquosos bifásicos são formados por polímero/polímero ou polímero/sal incompatíveis que geram duas fases. Dentre os principais constituintes do sistema encontram-se o polietileno glicol (PEG) com diferentes massas moleculares, dextrana (que vem sendo substituída devido ao seu alto preço) e sais como fosfato de potássio e citrato de sódio. Recentemente, vem sendo relatado na literatura, o uso de sistemas bifásicos com a utilização de maltodextrina. Estes sistemas apresentam inúmeras vantagens de utilização como o baixo custo do processo, simplicidade de operação, facilidade de ampliação de escala e baixa tendência de desnaturação das biomoléculas devido ao alto teor de água na formação das fases. No processo, os principais fatores que afetam a partição dos biocompostos são o pH, temperatura, massa molecular dos polímeros e adição de eletrólitos. A eficiência do processo é avaliada através do coeficiente de partição, da recuperação e do fator de purificação do composto de interesse.

OBJETIVOS

No presente trabalho teve-se como objetivos principais:

Determinar o melhor microrganismo e meio de cultura, dentre os estudados, para a produção de enzimas pectinolíticas por fermentação submersa.

Determinar os coeficientes de partição, recuperações e fatores de purificação para as enzimas pectinolíticas contidas em complexos multienzimáticos comerciais e em caldo fermentado, estudando-se os efeitos da massa molecular do PEG (400, 600, 1000, 1450, 3350, 8000 e 10000 Da) e da adição de cloreto de sódio aos sistemas PEG/fosfato de potássio, PEG/citrato de sódio e PEG/maltodextrina.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS

Os vegetais possuem um conjunto de compostos denominados substâncias pécticas. Elas são encontradas nas paredes celulares e nas lamelas médias (espaço intercelular) e atuam como uma espécie de cola unindo as paredes celulares, portanto têm como principal função biológica fornecer o caráter estrutural aos vegetais (Novo Nordisk, 1995; Naidu & Panda, 1999).

As substâncias pécticas são polissacarídeos ácidos de alta massa molecular formados por uma grande quantidade de unidades de ácido galacturônico anidro. Os grupamentos carboxila podem ser esterificados por grupos metila e ainda ser parcial ou totalmente neutralizados por uma ou mais bases (Sakai *et alii*, 1979). Estas substâncias formam um grupo heterogêneo de derivados de carboidratos coloidais. A pectina, por exemplo, possui cerca de 2-4% de raminose unidos por ligações β -1,2 e vários resíduos de arabinose, galactose e β -xilose (Kapoor *et alii*, 2000).

Alguns termos são utilizados para denominar tais substâncias (Whitaker, 1990; Sakai *et alii*, 1979).

Protopectinas: Nas frutas verdes as substâncias pécticas encontram-se na sua forma insolúvel em água. Elas são denominadas protopectina e são responsáveis pela firmeza do fruto. A insolubilidade da protopectina é devida ao tamanho do polímero e das ligações com cátions ou outros polissacarídeos. Sob determinadas condições de hidrólise formam pectina e ácido pectínico.

Ácidos pectínicos: São ácidos poligalacturônicos coloidais contendo menos que 75% de grupos metil-ésteres. São capazes de formar géis com açúcares e ácidos sob condições adequadas.

Pectinatos: Geralmente denominado de pectina (Figura 1.1), são os sais ácidos e normais do ácido pectínico.

Ácidos pécticos: São ácidos poligalacturônicos coloidais completamente livres de grupamentos metil-ésteres.

Pectatos: São os sais ácidos e normais do ácido péctico.

A massa molecular apresentada pelas substâncias pécnicas é bastante ampla, depende da forma como foi produzida ou extraída, do grau de esterificação e da acetilação e da quantidade, do tipo e da distribuição dos compostos formados. Pode-se encontrar estas substâncias pécnicas com massa molecular entre 30 e 300 kDa (Rombouts & Pilnik, 1978; Sakai *et alii*, 1979).

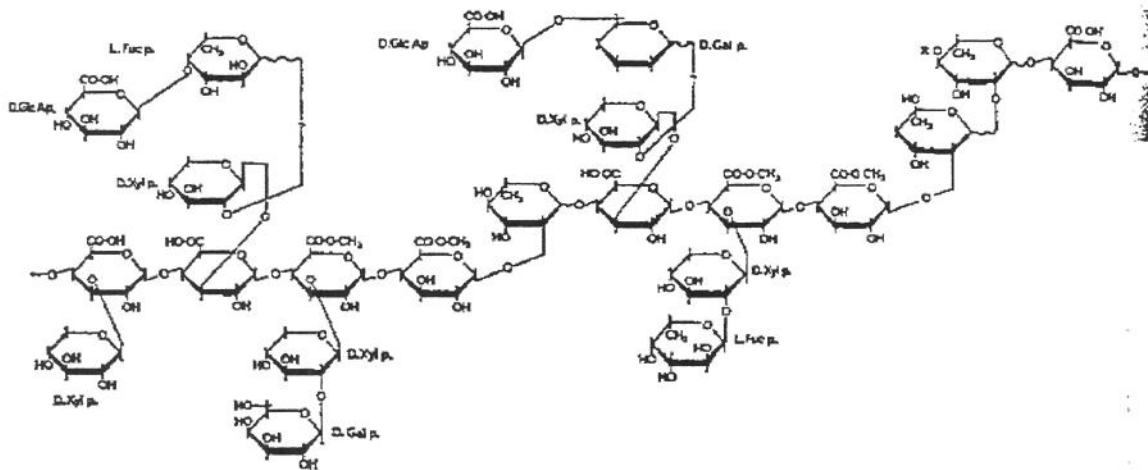


Figura 1.1: Estrutura detalhada da molécula de pectina (Sakai *et alii*, 1979).

Elas são sintetizadas nos estágios iniciais de desenvolvimento dos vegetais e sua concentração varia de acordo com o tipo (Tabela 1.1), variedade e grau de maturação destes vegetais.

O grau de metilação varia de acordo com o vegetal do qual a substância pécica foi extraída. A pectina de maçã apresenta 50 a 80% de esterificação, já as de frutas cítricas possuem 45 a 60%. As substâncias pécnicas são solúveis em água, dimetilsulfóxidos, formamida e glicerol aquecido e são insolúveis na maioria dos solventes orgânicos. Portanto, podem ser precipitadas através da adição de solventes miscíveis em água, de polímeros básicos solúveis em água ou de cátions polivalentes. Os materiais pécnicos são mais estáveis na faixa de pH 3 a 4 e fora desta faixa, ocorre degradação química. Sob temperatura baixa prevalece a hidrólise das ligações ésteres com pequena degradação do polímero (Fogarty & Ward, 1974; MacMillan & Sheiman, 1974).

Tabela 1.1: Teor de pectina em vegetais.

Fonte	Substâncias pécticas (%) ^a	Pectina (%) ^b
Tomate	2,4 - 4,6	0,2 - 0,5
Morango	0,6 - 0,7	0,6 - 0,7
Pêssego	0,1 - 0,9	0,3 - 1,2
Uva	-	0,2 - 1,0
Pêra	0,9 - 1,4	0,5 - 0,8
Banana	0,7 - 1,2	0,7 - 1,2
Lima	-	3,0 - 4,0
Limão (semente)	-	6,0
Limão (casca)	-	32,0
Limão (polpa)	-	25,0

Fonte: ^a Sakai *et alii* (1979), ^b Fogarty & Ward (1974)

1.2. ENZIMAS PECTINOLÍTICAS

São enzimas capazes de degradar os poliuronídeos das moléculas das substâncias pécticas e estão envolvidas nos processos fisiológicos e patológicos dos vegetais. As enzimas são produzidas por plantas, insetos, nematóides, protozoários, fungos, leveduras e bactérias (Kumar & Palanivelu, 1998; MacMillan & Sheiman, 1974).

As pectinases são classificadas de acordo com a atuação sobre as substâncias pécticas, dividindo-se em dois grupos principais: esterases e despolimerases. As esterases atuam sobre o grupamento metil-éster desesterificando a pectina por hidrólise. As despolimerases quebram as ligações glicosídicas α -1,4 da cadeia principal. Esta despolimerização ocorre por hidrólise ou transeliminação (β -eliminação), de tal forma que as enzimas podem ser classificadas em hidrolases e liases, que se subdividem conforme a preferência pelo substrato ou forma de ação (Fogarty & Kelly, 1979). A Tabela 1.2 ilustra a classificação.

Tabela 1.2: Classificação das enzimas pectinolíticas.

Esterases

Pectina-esterase (PE)

Despolimerases

Com atuação sobre a pectina

Polimetilgalacturonase (PMG): Endo-PMG e Exo-PMG

Polimetilgalacturonato liase (PML): Endo-PML e Exo-PML

Com atuação sobre o ácido péctico

Poligalacturonase (PG): Endo-PG e Exo-PG

Poligalacturonato liase (PL): Endo-PL e Exo-PL

(Fonte: Fogarty & Kelly, 1979).

As pectinases são encontradas em diversas plantas, particularmente nos frutos, catalisando as alterações das substâncias pécticas, cujas enzimas mais encontradas são as PG e PE. Já os microrganismos, produzem mais facilmente a PL, PG e PE (bactérias), sendo que nos fungos a endo-PG é a enzima de maior ocorrência (Fogarty & Ward, 1974).

Abaixo segue uma descrição das características de cada uma das enzimas pectinolíticas.

Pectina-esterase (PE) (EC 3.1.1.11): hidrolisa a pectina removendo o grupo metoxílico da unidade do ácido D-galacturônico, proporcionando assim sua desesterificação (Figura 1.2). A depender da intensidade da hidrólise produz ácido pectínico, ácido péctico e também metanol. O pH ótimo da PE fúngica é menor que o da bacteriana e o daquela produzida por vegetais, situa-se na faixa de 3,5 a 7,5. Sua síntese pode ser reprimida por glicose (Whitaker, 1990). Nos frutos apresentam grande atividade no início do amadurecimento, seguido de uma queda acentuada após a colheita até uma perda de atividade a partir do décimo dia (Faria *et alii*, 1994).

Polimetilgalacturonase (PMG): sua existência tem sido discutida por alguns pesquisadores. Entretanto Fogarty & Ward (1974) relataram a existência de duas frações de endo-PMG, uma com pH ótimo 4 e outra 7, ambas hidrolisando pectina

altamente esterificada. Riou *et alii* (1990) produziram exo-PMG, com massa molecular de 140 kDa, utilizando *Sclerotinia sclerotiorum*. Na fermentação a condição ótima de produção foi obtida a pH 5 e temperatura de 45°C. Nas frutas as poligalacturonase apresentam atividade praticamente nula no estágio verde maturo, aumentando a atividade com o tempo (Faria *et alii*, 1994).

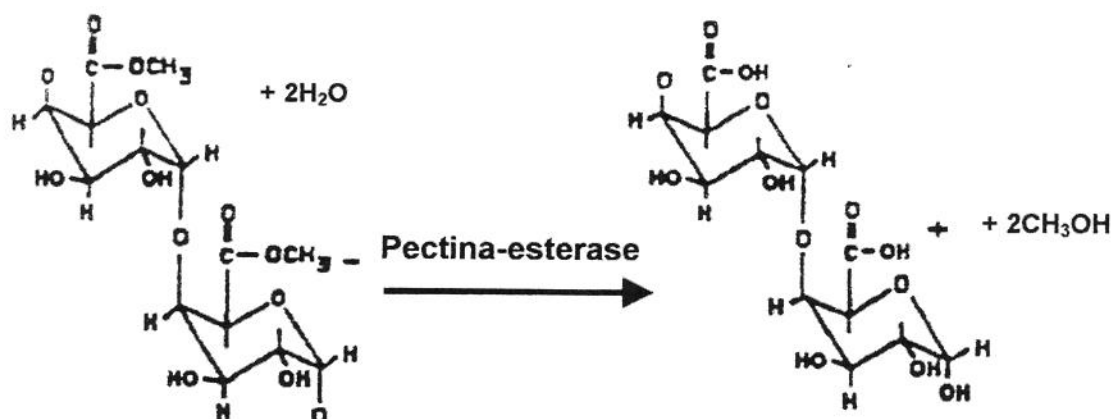


Figura 1.2: Mecanismo de ação da pectina-esterase. Fonte: Whitaker (1990).

Poligalacturonase (PG): dividem-se em endo (EC 3.2.1.15) e exo-PG (EC 3.2.1.67) e atuam especificamente em ácido péctico. As endo-PG caracterizam-se pela forte redução da viscosidade (50%) da solução de pectina e por uma baixa produção de grupos redutores (1-3%) (Schwann *et alii*, 1997). Para Fogarty & Ward (1974), as endo-PG têm a capacidade de hidrolisar ligações glicosídicas internas dos poligalacturonatos de uma forma randômica, produzindo, primeiramente, uma série de oligogalacturonatos e depois mono e digalacturonatos dependendo do tempo de ação da enzima (Figura 1.3). O pH ótimo está, geralmente, entre 4,0 e 5,5, a temperatura ótima entre 30 e 40°C, a massa molecular entre 30 e 50 kDa, o ponto isoelétrico entre 3,8 e 7,6 e o Km (constante de Mikaelis-Menten) entre 0,14 e 2,7 mg/mL para pectato. Tais variações decorrem das fontes de extração (plantas e microrganismos) e sua atividade é influenciada pela presença de íons Ca^{+2} . As exo-PG dividem-se em exo-PG1 e exo-PG2, produzem como hidrolisado o ácido monogalacturônico e o

digalacturônico, respectivamente (Whitaker, 1990). Segundo Schwann *et alii* (1997) para que a exo-PG reduza a viscosidade de maneira semelhante a endo-PG é necessário que ela consiga hidrolisar mais de 20% das ligações glicosídicas.

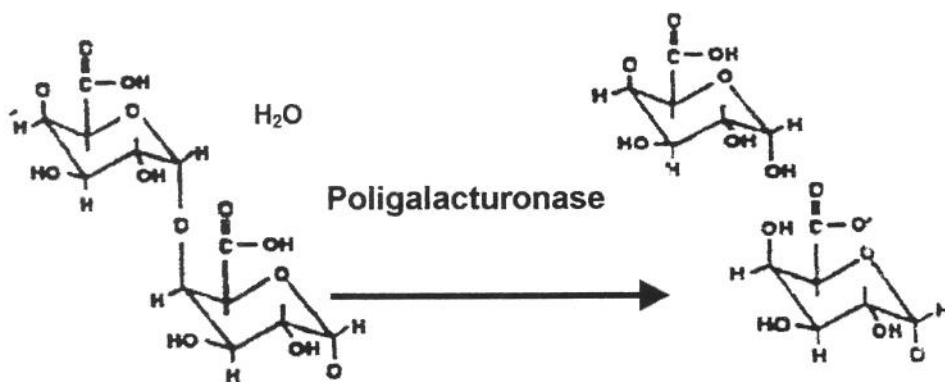


Figura 1.3: Mecanismo de ação da poligalacturonase. Fonte: Whitaker (1990)

Poligalacturonato liase (PL) (EC 4.2.2.10): a endo-PL é produzida por microrganismos e atua sobre poligalacturonato. Possui pH ótimo entre 8,0 e 10,0, apresenta massa molecular na faixa de 30 a 40 kDa e ponto isoelétrico normalmente de 9,0. A forma exo é produzida apenas extracelularmente por pouquíssimas bactérias; libera oligogalacturonatos insaturados (Figura 1.4) e é ativada por cátions bivalentes (Sakai *et alii*, 1979).

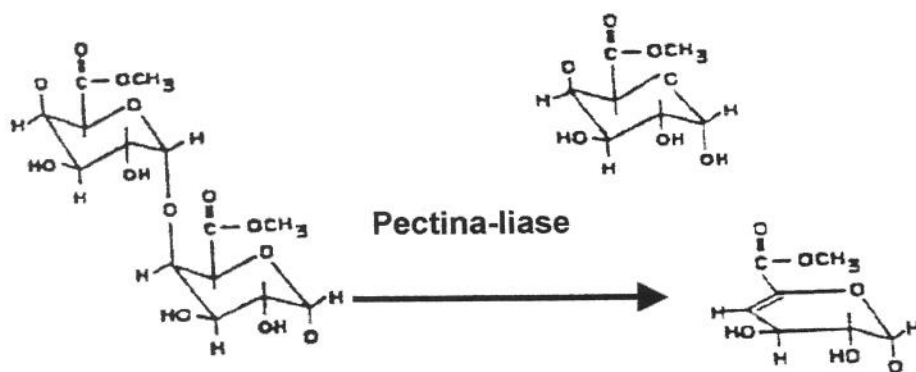


Figura 1.4: Mecanismo de ação da pectina-liase. Fonte: Whitaker (1990).

Polimetilgalacturonato liase (PML): degrada pectina de forma randômica, produzindo metil-oligogalacturonatos insaturados. As endo-PML são produzidas basicamente por fungos, têm massa molecular de aproximadamente 30 kDa, ponto isoelétrico 3,5 a 8,9, pH ótimo na região ácida e Km entre 0,9 a 5,0 mg/mL (Whitaker, 1990).

1.2.1. Produção

Muitos microrganismos possuem a capacidade de produzir enzimas pectinolíticas como, por exemplo, *Aspergillus niger* (0,341 U), *Penicillium italicum* (0,453) e *Humicola* sp. (0,017 U). Em diferentes isolados do mesmo microrganismo pode-se encontrar atividades enzimáticas diferentes (Baracat *et alii*, 1989).

Ugwuanyi & Obeta (1997) fizeram uma seleção de microrganismos produtores de pectinases e observaram que *Aspergillus niger* IMI 359763 e *Botryodiplodia theobromae* IMI 359764 produziram as mais altas atividades enzimáticas dentre os microrganismos isolados. Já Gainvors *et alii* (1994) isolaram várias cepas de *Saccharomyces cerevisiae* produtoras de enzimas pectinolíticas. A produção de PL nestas cepas ocorria após 10 dias de fermentação e uma delas produziu PE com atividade máxima de 3,77 nmol de metanol/mL após 3 dias a 30°C.

Os *Penicillium adametzii*, *citrinum* e *janthinellum* foram utilizados em fermentação submersa com diferentes fontes de carbono. O meio contendo pectina, na ausência de glicose, foi o melhor para produção das enzimas. Para estes microrganismos a síntese enzimática ocorreu após 24, 48 e 72 h, respectivamente. Entretanto, 80% da biomassa de *P. Janthinellum* já havia sido produzida em 48 h de fermentação (Mikhailova *et alii*, 1994).

Singh *et alii* (1999a) produziram pectinases utilizando *Bacillus* sp, em substrato contendo 0,5% de pectina cítrica. A máxima atividade ocorreu a 25 h. *Lachnospira multipares* produzia PE e PL extracelularmente, porém também

apresentou algumas frações intracelulares após 72 h de fermentação, porém, não produziu PG (Silley, 1985).

Loera *et alii* (1999) utilizaram mutantes de *Aspergillus niger* para produzirem enzimas pectinolíticas. Encontraram máxima atividade enzimática a 72 h (132 U/g massa seca). Já Castilho *et alii* (2000) também usaram *A. niger* na fermentação com diferentes fontes de carbono, como farelo de soja, óleo de soja e farelo de trigo, que rendeu a maior atividade após 22h.

Adição de açúcares no meio de cultura produzem diferentes efeitos na obtenção de pectinases, entretanto aumenta a biomassa na fermentação. Silva *et alii* (1993) observaram que adicionar sacarose ao meio, que continha pectina como indutor, estimulou a atividade de PL de *Penicillium griseoroseum*, com máxima atividade após 120 h de fermentação. PL, PE e PG, produzidas por *Aspergillus niger*, tiveram atividade aumentada com a concentração de sacarose. Elevando a concentração de 1,5 para 15% a atividade passou de 1,8 para 20 U/mL, a de PL passou de 0,14 para 0,65 U/mL e a de PE não apresentou atividade (Friedrich *et alii*, 1992). Brumano *et alii* (1993) verificaram também que a combinação de sacarose e pectina constituiu-se no melhor meio de cultura. Kumar & Palanivelu (1998) observaram que a ótima produção das enzimas pectinolíticas (199,80 mU/mL) e o ótimo crescimento microbiano (11,8 mg/mL) de fungos termofílos *Thermomyces lanuginosus* foram encontrados com a utilização de 1% (p/v) de sacarose com 1% (p/v) de pectina.

A adição de sacarose no substrato de bagaço de laranja lavado levou a rendimentos de atividade iguais aos obtidos com bagaço não lavado em fermentação com *Penicillium italicum*. Já adição de glicose e frutose produziu valores de atividade 54% menores (Rizzatto, 1999). Levin & Forchiassin (1998) e Tachet & Fevre (1996) observaram que glicose contribui para o decréscimo da atividade enzimática.

Segundo Channe & Shewale (1995) baixas atividades de pectinase ocorreram quando glicose, maltose, manitol, celobiose, sacarose, sorbitol, rafinose e glicose foram usadas como fontes de carbono. Glucanas, como celulose e xilana, não melhoraram a produção enzimática. Já Kapoor *et alii* (2000) não

observaram efeito significativos na produção de pectinases quando se utilizou como fonte de carbono maltose, sacarose e manitol, porém ocorria inibição quando se utilizava raminose, arabinose, gluciose e galactose, devido à repressão catabólica ocorrida nas fermentações com *Bacillus* MG-cp-2.

Bacillus GK-8 produz três tipos de exo-pectinases (PI, PII e PIII) com pH ótimo de 5,4; 7,4 e 10,4, respectivamente, na temperatura ótima de 60°C. A adição de glicose aumentou a atividade enzimática (PI – 42×10^3 U/mL a 20°C, PII – $51,5 \times 10^3$ U/mL a 24 h e PIII – $46,5 \times 10^3$ U/mL a 24 h, com U igual a 1 μ mol de ácido galacturônico/h), entretanto, meios com frutose e sacarose produziram atividades menores. Pectina (1%, p/v) como a única fonte de carbono proporcionou 12,5; 23 e 24% a mais de atividades das enzimas PI, PII e PII, respectivamente (Dosanjh & Hoondal, 1996).

Alaña *et alii* (1989) observaram que a produção máxima de PL ocorria utilizando 1% (p/v) de pectina (67 mU/mL). A pectina nesta concentração atua como agente indutor na produção de pectinases por *Kluyveromyces fragilis*. Cruz-Guerrero *et alii* (1999) e Levin & Forchiassim (1998) obtiveram este mesmo resultado utilizando diferentes microrganismos.

Uma outra forma de enriquecer o meio é adicionar outras substâncias pécticas, as quais induzem a produção de pectinases, o que pode ser visto pelo acompanhamento da atividade na presença e ausência destas substâncias, como fizeram vários autores que observaram que estas substâncias realmente induziam a atividade pectinolítica. Segundo Shevchick *et alii* (1992) a atividade de PL aumentou na presença de pectato de sódio em cerca de 15 vezes para *Erwinia caryophyllae* e 5 vezes para *E. carotovora*. PME foi obtida em alta concentração (10 vezes maior) com pectato e constituía 30 a 40% da proteína extracelular, produzida na fermentação. Ácido galacturônico a 2% melhora a produção de pectinase de *Lentinus edodes* (Zheng & Shetty, 2000), mas segundo Tachet & Fevre (1996) ele, também, teve efeito repressor quando o limite de capacidade de utilização pelo microrganismo é ultrapassado. Pereira *et alii* (1993) observaram que a produção de exo-PG, por *Aspergillus niger*, era induzida pela adição de ácido galacturônico em diferentes fontes de carbono e que ocorria decréscimo na

atividade das enzimas produzidas após 72 h de fermentação. As atividades da exo e endo-PG foram 3 e 11 vezes maiores, respectivamente, quando em fermentação semi-sólida, o que está de acordo com Argüelles *et alii* (1995), que verificaram aumento na produção de PL neste tipo de fermentação. Além disso, as enzimas apresentaram maior estabilidade a pH e temperaturas elevadas.

Zheng & Shetty (2000) utilizaram substratos complexos, como maçã, morango e cramberry, obtendo 1,5, 2,2 e 1,1 U/mL de atividade enzimática, respectivamente, em fermentações com *Lentinus edodes*. Galiotou-Panayotou *et alii* (1997) utilizaram açúcar de beterraba e bagaço de laranja. Este último gerou altas atividades de endo-PG após 5 dias, enquanto que o açúcar de beterraba apresentou melhores resultados após 6 dias.

Bagaço de laranja não lavado, fermentado com *Penicillium italicum* e *Aspergillus niger*, apresentou 21 e 25% a mais de atividade, respectivamente, que os valores obtidos com bagaço lavado, sendo que os valores obtidos com *P. italicum* foram maiores. A composição de 75% de bagaço lavado com 25% de não lavado rendeu atividades mais elevadas (20,72 UI/g MFU) (Rizzatto, 1999). Subprodutos agrícolas como fibra de trigo produz aumento significativo da atividade enzimática (188,8 U/mL) produzida por *Bacillus* MG-cp-2 (Kapoor *et alii*, 2000).

Os substratos utilizados pelos microrganismos e formados por fontes de carbono complexas, como bagaço de laranja e morangos, têm diferentes composições de substâncias pécicas, e como visto tais substâncias agem como indutor da produção enzimática. Portanto, o substrato que melhor oferecer a composição de fonte de carbono e indutor produzirá as enzimas em maior quantidade e que substratos com diversas fontes de carbono também levam a grande produção de enzimas pectinolíticas, que é o caso do morango (Zheng & Shetty, 2000), bagaço de laranja (Galiotou-Panayotou *et alii*, 1997) e bagaço de laranja não lavado (Rizzatto, 1999). No caso da lavagem do substrato, parte dos carboidratos e pectina (parcialmente solúvel em água) podem ter sido removidos durante o processo, tornando o substrato mais pobre que aquele onde não ocorreu o processo de lavagem.

Channe & Schewale (1995) utilizaram várias fontes de nitrogênio e observaram que $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gerou as maiores atividades, já Levin & Forchiassin (1998) verificaram que a concentração de proteína extracelular na fermentação com *Trametes trogii* foi extremamente alta quando nitrogênio orgânico era utilizado.

Na fermentação com *Aspergillus aliaceus*, a máxima atividade ocorreu com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,7%), KH_2PO_4 (0,1%) e MgSO_4 (0,04%), já KNO_3 e NaNO_3 inibiram a produção enzimática (Sapunova *et alii*, 1997). As fermentações com *Bacillus* MG-cp-2 em meio contendo 1% (p/v) de pectina produzem atividade máxima de 47 U/mL após 24 h com 0,704 (A_{600}) e 160 $\mu\text{g/mL}$ de densidade ótica para massa seca e concentração de proteína, respectivamente. O enriquecimento do meio com extrato de levedura e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ aumenta a atividade enzimática para 98 U/mL após 20 h com 2,103 (A_{600}) e 2200 $\mu\text{g/mL}$ de densidade ótica para massa seca e concentração de proteína, respectivamente.

O valor de pH igual a 5,0 foi ótimo para as fermentações de bagaço de laranja com *Penicillium italicum* (Hennies, 1996) e para aquelas que utilizavam maçã, morango ou cramberry com 2g de ácido galacturônico, utilizando *Lentinus edodes* (Zheng & Shetty, 2000). Já Aguilar *et alii* (1991) verificaram que pH 2,5 rendia alta atividade de pectinase (14 U/mg) com massa molecular de 43 kDa. Mesmo sendo baixo, o valor do pH diminuía com o tempo. Isto também foi observado por Schmidt *et alii* (1995), contudo outros autores observaram aumento do pH ao final da fermentação (Levin & Forchiassin, 1998).

Segundo Garcia-Garibay *et alii* (1987) as enzimas pectinolíticas, produzidas por *Kluyveromyces fragilis*, foram obtidas com maior atividade em condições microaeróbicas. Mas Cruz-Guerrero *et alii* (1999) afirmaram que o oxigênio dissolvido não é um fator limitante para a produção de biomassa.

Inóculo com idade de 9 dias produziu ótima atividade de PL, mas não influenciava a concentração de massa seca. Concentrações altas de esporos e o aumento da concentração de pectina no meio a ser fermentado diminuía a atividade de PL, mas por outro lado, a massa seca aumentava (Brumano *et alii*, 1993). Friedrich *et alii*. (1992) observaram que o aumento da concentração do inóculo inibe a síntese de PG e para PL o inverso ocorria, enquanto que para a PE

não havia nenhuma correlação entre o tamanho do inóculo e a atividade enzimática.

Para Membre & Burlot (1994) a produção de PL aumentou com a temperatura, já Hennies (1996) afirmou que a temperatura tinha pouca influência na produção das enzimas. Valores ótimos de atividade foram encontrados a 40°C na fermentação com *Lentinus edodes* (Zheng & Shetty, 2000) e 35°C para a fermentação com *Kluyveromyces marxianus* (Cruz-Guerrero *et alii*, 1999). Naidu & Panda (1999) obtiveram ótimo de produção de PMG, PG e PL nas temperaturas e pH's de 30°C e 5,3 (0,191 U); 26°C e 6,6 (0,498) e 35°C e 4,85 (0,0028 U), respectivamente, nas fermentações com *Aspergillus niger*.

Utilizando *Aspergillus fumigatus*, Baracat-Pereira *et alii* (1993) observaram que as PG eram estáveis a 65°C, o que permitia uma aplicação a altas temperaturas.

A atividade de PG aumentou com o tempo de fermentação, quando se utilizou *Byssochlamys fulva*, sendo máxima a 240 h (Kotzekidou, 1991). Ros *et alii* (1991) verificaram que num período entre 8 e 14 dias de fermentação a atividade de PG era máxima. Segundo Manachini *et alii* (1988) as liases foram produzidas em maior quantidade em pectina de alto grau de metoxilação na fase de crescimento exponencial, já as hidrolases tinham atividade máxima na fase de crescimento estacionário.

Os fungos são mais utilizados na produção das enzimas pectinolíticas, apesar da capacidade de leveduras e bactérias, contudo o estudo e comparação da produção das enzimas pectinolíticas com diferentes tipos de microrganismos engrandecem o conhecimento sobre a produção destas enzimas.

1.2.2. Aplicação industrial

Os vegetais, no estado não maturado, apresentam substâncias pécticas na forma de protopectina. Quando amadurecem ocorre uma hidrólise parcial desse material formando um composto parcialmente solúvel, muitas vezes, a pectina, que amolece a estrutura da fruta. Devido à solubilidade do novo composto, parte

da pectina passa para o suco durante o processo de prensagem, resultando em um aumento da viscosidade e dificultando a obtenção do suco. O suco extraído é pobre com respeito à cor e a compostos aromatizantes, além de ser difícil de ser filtrado e clarificado (Novo Nordisk, 1995).

Para evitar estas dificuldades, as indústrias têm utilizado pectinases, que segundo Gerhartz (1990) apresentam como principais vantagens a diminuição da viscosidade, diminuição do tempo de processamento em muitos estágios do processo, redução de gasto com energia para aquecimento, prensagem e centrifugação, aumento da remoção de pigmentos e ácidos orgânicos, melhoria da qualidade do produto evitando alterações indesejáveis na cor e sabor, além da maior estabilidade e inibição da geleificação do suco concentrado.

Alaña *et alii* (1990) afirmaram que as enzimas pécticas PL e PNL possuem grande aplicação industrial na extração e clarificação de sucos de frutas, mostos, maceração de vegetais e frutas para produção de refrigerantes límpidos. A importância da PNL é devida à clivagem da pectina sem ação paralela de outras enzimas, diminuindo a viscosidade e não danificando os ésteres voláteis, responsáveis pelo aroma e sabor. Ruiz *et alii* (1988) compararam a utilização de endo-PG de *Kluyveromyces fragilis* e comercial na clarificação de suco de maçã, não determinando diferenças estatísticas nos resultados para as enzimas obtidas das duas fontes.

A despectinização completa através do uso de um complexo enzimático apropriado assegura uma adequada clarificação e filtragem de suco, bem como uma boa estabilidade. Por isso estas enzimas são aplicadas na clarificação de vinho, apresentando bons resultados durante o processamento (Fogarty & Ward, 1972).

As enzimas pectinolíticas são usadas também na indústria de sucos cítricos. Além de reduzir a viscosidade, e conseqüentemente evitar a gelificação, aumentam o rendimento da extração e clarificação do suco. Podem ser empregadas na extração de óleos essenciais e na produção de extratos turvos da casca, que são empregados na fabricação de refrigerantes. Outra aplicação é o

descascamento enzimático dos frutos para produzir frutas frescas descascadas, saladas de frutas e gomos que apresentaram maior frescor e aparência.

Os complexos enzimáticos comerciais, muitas vezes, apresentam atividade de PE que quebram a cadeia de pectina e formam metanol (indesejável na industrialização de sucos). Por isso desenvolver um processo de separação e purificação enzimática é de fundamental importância.

Estas enzimas são também utilizadas na indústria têxtil na degomagem de fibras naturais, pois atacam as substâncias pécicas que ficam entre as fibras atuando como goma (Baracat-Pereira *et alii*, 1993). Kapoor *et alii* (2000) apresentam a aplicação das enzimas pectinolíticas na degomagem de ramie (*Boehmeria nivea*), linho (*Linum usitatissimum*) e cânhamo (*Canabis sativa*).

As águas residuárias das indústrias, que processam vegetais e frutas, contêm grande quantidade de substâncias pécicas. Kapoor *et alii* (2000) reporta a aplicação das enzimas no tratamento destas águas residuárias.

1.2.3. Purificação

Os processos fermentativos geram, além do composto desejado, subprodutos que impedem, muitas vezes, a utilização do caldo bruto da fermentação nos procedimentos industriais. Por esta razão várias técnicas de purificação foram desenvolvidas e aplicadas na separação de biocompostos. Os métodos de separação são geralmente executados em muitas etapas e requerem procedimentos complexos como precipitação, centrifugação, diferentes tipos de cromatografia e diálise (Camperi *et alii*, 1996).

Singh *et alii* (1999 b), comparando três tipos de separação, observaram que a ultrafiltração promovia uma boa concentração das enzimas pectinolíticas, mas a presença de polissacarídeos promove o aumento da viscosidade da solução a ser concentrada e podia dificultar o processo devido à obstrução dos poros da membrana. Não puderam liofilizar o caldo fermentado devido à presença dos polissacarídeos que impedia a remoção de água devido ao aumento da viscosidade. A precipitação com etanol absoluto a -20°C gerava uma perda de

atividade por desnaturação enzimática. Polizeli *et alii* (1991) também precipitaram poligalacturonase com etanol absoluto e obtiveram rendimento de 42,72%.

Singh *et alii* (1999a) precipitaram exopoligalacturonase liase com sulfato de amônio, com saturação entre 55-90%, obtendo perda de atividade devido à solubilização do precipitado. Kumar & Palanivelu (1998) verificaram, que a precipitação das pectinases com sulfato de amônio era instável quando comparada com a precipitação com acetona. Os peletes formados, neste último tipo de precipitação, foram bem estáveis quando submetidos ao processo de diálise em tampão acetato 0,1 M pH 5,5 e 4°C. Já Kapoor *et alii* (2000) obtiveram um fator de purificação de 2,5 vezes na purificação de pectinases com *Bacillus* MG-cp-2 através de precipitação com sulfato de amônio a 90% de saturação.

Outra forma de separar as enzimas pectinolíticas é a precipitação por afinidade. Gupta *et alii* (1993) misturaram pectinase comercial (Pectinex-3XL, Novo Nordisk) com uma solução de alginato de pH 3,8 na proporção 2:1, e iniciaram a precipitação com a adição de CaCl_2 . Obtiveram um precipitado com mais de 75% de enzima. Utilizando este processo em duas etapas conseguiram 85,8% e 8,8 de rendimento e fator de purificação, respectivamente, na primeira etapa e 4,4% e 3,8 de rendimento e fator de purificação, respectivamente, na segunda etapa. A enzima assim precipitada tinha massa molecular de 55 kDa.

O processo de precipitação de pectinases com etanol, apesar das diferentes formas de concentração das enzimas pectinolíticas, foi o mais comumente utilizado nos artigos consultados.

Sakamoto *et alii* (1994) propuseram uma sequência de purificação constituída de cromatografia por hidrofobicidade, troca iônica e de exclusão. Purificaram duas protopectinases de *Bacillus subtilis* denominados Ppase-N e Ppase-R, que tiveram como fator de purificação valores de 549 e 505, respectivamente, e rendimentos de 30,9% e 2,2%, respectivamente. As massas moleculares destas enzimas foram 43000 e 35000 Da, respectivamente. Outra sequência constituída por cromatografia por afinidade, ligação cruzada com alginato, por troca iônica, por focalização e de permeação em gel, foi utilizada por Kester & Visser (1990) para purificar a pectinase comercial K2B078 (rapidase).

Obtiveram cinco frações de endo-PG e uma de exo-PG. Apenas duas frações de endo-PG apresentaram rendimentos consideráveis, 23% e 72%, com massa molecular de 35 e 38 kDa, respectivamente. Lobarzewski *et alii* (1985) utilizaram como ligante ácido poligalacturônico em diferentes matrizes. A queratina apresentou o melhor rendimento (95,8%) e fator de purificação (4,88). Esta matriz apresenta como vantagem o baixo custo. Camperi *et alii* (1996) utilizaram a cromatografia por afinidade de metal imobilizado (IMAC), com três diferentes íons. Com íons Cu^{+2} os rendimentos de PE e PL foram de 98,9% e 99,7%, respectivamente. Após a seleção do tampão de adsorção (fosfato de sódio a pH 7,0 com 100 mM NaCl), e o eluente (acetato de sódio a pH 3,0 com 100mM NaCl) aplicaram estas condições à separação. Cerca de 80% da PE ficou retida na matriz cromatográfica, enquanto a PL foi completamente recuperada.

Nikaidou *et alii* (1995) purificaram pectina liase (massa molecular de 34000 Da) de *Pseudomonas marginalis* N6301 com rendimento de 20% e fator de purificação de 452 após cromatografias em coluna. Já Nozaki *et alii* (1997) purificaram três frações de exo-PG de *Alternaria mali*, que tinham massa molecular entre 51-80 kDa. O maior fator de purificação encontrado foi 111.

1.3. SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS (SAB)

Alguns dos principais requisitos para a produção, em escala comercial, de compostos de origem biotecnológica são a pureza e a integridade física e química destes compostos. Estas características tornam as etapas de separação onerosas (Monteiro Filho *et alii*, 1998) e as exigências do mercado, no tocante às características do produto, geraram o desenvolvimento de processos de separações com sistemas não convencionais (Koba *et alii*, 1998).

Dentre os processos de separação podemos destacar a extração líquido - líquido com sistema aquoso bifásico. Este processamento foi primeiramente utilizado na década de 1950 na Suécia para separar macromoléculas, células e organelas. Desde então vem sendo desenvolvidos e aplicados na separação e purificação de biocompostos (Gupta *et alii*, 1999).

1.3.1. Tipos de Sistemas

Os sistemas aquosos bifásicos são formados quando pares de polímeros solúveis em água, ou um polímero solúvel e um soluto de pequena massa molecular são misturados acima de uma concentração crítica. A principal característica do sistema é o elevado conteúdo de água nas fases (cerca de 85 a 99%), permitindo a partição de biomoléculas e partículas celulares de diversas origens em condições não-desnaturantes (Diamond & Hsu, 1993; Albertsson *et alii*, 1990; Johansson, 1989). As Tabelas 1.3 e 1.4 mostram exemplos de pares de compostos formadores de SAB.

Tabela 1.3: Sistemas aquosos bifásicos formados por dois polímeros.

Sistema	
Polipropileno glicol	Metoxi-propilenoglicol
	Polietileno glicol
	Álcool polivinílico
	Hidroxipropil dextrana
	Dextrana
	Hidroxipropil amido
	Maltodextrina
Polietileno glicol	Álcool polivinílico
	Polivinilpirrolidona
	Dextrana
	Ficoll
Metilcelulose	Hidroxipropil dextrana
	Dextrana
Etilhidroxietilcelulose	Hidroxipropil dextrana
	Dextrana
Hidroxipropil dextrana	Dextrana
Ficoll	Dextrana

Fonte: Albertsson, 1986.

Há vários anos, vem sendo aplicado como alternativa aos sistemas mais estudados, a preparação de SAB com PEG e sal, principalmente nos processos de grande escala, pois apresentam menor custo e maior seletividade. O sistema, com sal, mais efetivamente estudado é o obtido com fosfato de potássio e PEG. Outro sistema testado é o que utiliza citrato de sódio, porém existem poucos dados na literatura sobre os diagramas de partição (Vernau & Kula, 1990; Greve & Kula, 1991).

Tabela 1.4: Sistemas aquosos bifásicos formados por um polímero e um soluto de pequena massa molecular.

Sistema	
Polipropileno glicol	Fosfato de potássio
	Glicose
	Glicerol
Polietileno glicol	Fosfato de potássio
	Aminoácidos
	Mono/dissacarídeos
	Peptídeos/proteína
	Cloreto de sódio
Metoxi-propilenoglicol	Fosfato de potássio
Dextrana	Álcool propílico

Fonte: Albertsson, 1986.

Outra possibilidade é a utilização de maltodextrina para formar o sistema. Este sistema é similar ao obtido com dextrana/PEG, porém a maltodextrina tem um valor bem abaixo do preço da dextrana (Silva & Meirelles, 2000).

Existem dois métodos para extração de enzimas do caldo fermentado. O primeiro emprega um fermentador e um extrator separadamente. Após o produto ter sido separado, o caldo é descartado. O segundo é a extração líquido - líquido de produtos diretamente do caldo de fermentação. Nesse caso o solvente é introduzido no fermentador, onde ocorre o contato com os metabólicos, não havendo a necessidade de uso de um extrator adicional (Job & Blass, 1994).

1.3.2. Diagrama de Fases

As composições dos sistemas de duas fases são representadas por diagramas triangulares que expressam a concentração dos componentes do sistema (polímeros, sais e solvente). Para o sistema aquoso bifásico, onde a concentração de água é bastante elevada, costuma-se utilizar a forma de eixos cartesianos para representar o sistema (Figura 1.5). A representação cartesiana tem como única diferença, dos diagramas triangulares, a omissão da composição da água (Silva, 2000; Albertsson *et alii*, 1990).

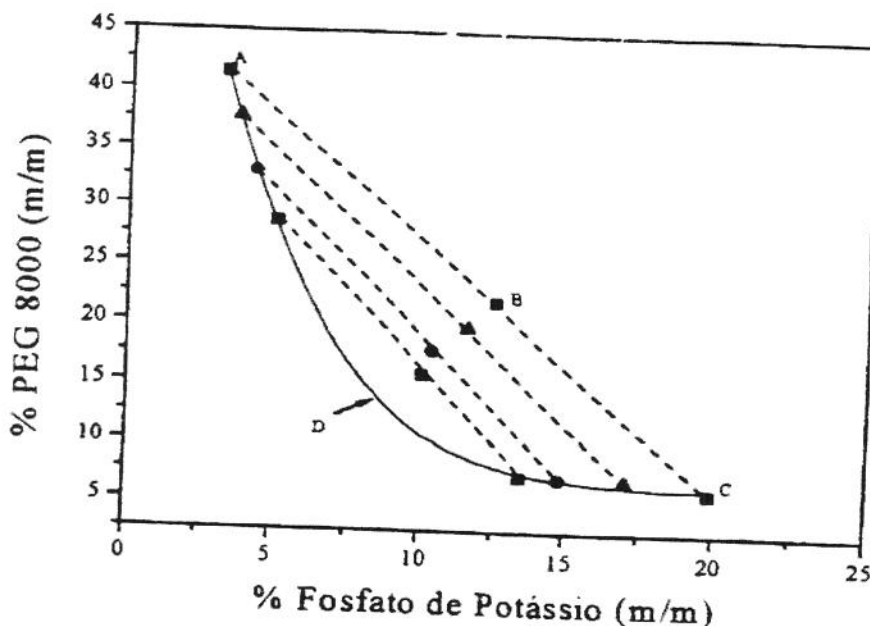


Figura 1.5: Esquema representativo de um diagrama de equilíbrio: linhas de amarração (---) e curva binodal (—) (Fonte: Silva *et alii*, 1994).

A composição total da mistura dos compostos é representada pelo ponto B. A mistura separa-se em duas fases, que contêm as frações dos constituintes formadores. As composições destas duas fases são representadas pelos pontos A (fase de topo) e C (fase de fundo). A união destes pontos (A, B e C), forma a linha de amarração. Para cada composição de mistura uma nova linha de amarração é formada (desde que o ponto de mistura não esteja sobre a mesma linha de amarração). A partir da união dos pontos extremos de cada linha de amarração

(ex. pontos A e C) obtém-se a curva binodal. Esta curva separa o diagrama em duas regiões; acima da curva binodal tem-se a região bifásica e abaixo a região monofásica. O ponto D, ponto crítico, corresponde à região da curva onde teoricamente a composição e o volume das fases coexistentes são iguais. Outra característica do diagrama, e o ponto de assintocidade, que é o ponto no qual a curva binodal tangencia um dos eixos do diagrama. (Zaslavsky, 1995).

Na separação de macromoléculas de caldo fermentado e extratos biológicos uma aproximação parcial é suficiente para o sistema aquoso bifásico, porém a biomassa tem forte influência na posição da curva binodal. Muitas vezes devido ao acúmulo de biomoléculas em uma fase ocorre o aumento do volume desta fase e conseqüentemente da razão volumétrica entre elas (Rito-Palomares & Cueto, 2000).

A melhor forma para se construir o diagrama de fases é através da análise química dos componentes formadores do sistema em cada fase para um certo número de composições de mistura. Para expressar numericamente a diferença de composições das fases pode-se usar o comprimento da linha de amarração (TLL), que é calculada pela equação 1.1.

$$TLL = \sqrt{(\Delta P_1)^2 + (\Delta P_2)^2} \quad 1.1$$

onde ΔP_1 e ΔP_2 são as diferenças de concentração do componente 1 e 2 entre as fases, respectivamente (Zaslavsky, 1995).

Uma outra característica do diagrama de fase é a inclinação da curva binodal (STL), que é calculada de acordo com a equação 1.2.

$$STL = \frac{\Delta P_1}{\Delta P_2} \quad 1.2$$

Em sistemas aquosos bifásicos o valor de STL é praticamente constante, indicando que as linhas de amarração são aproximadamente paralelas (Albertsson, 1986).

1.3.3. Componentes do Sistema

Como anteriormente citado, os sistemas aquosos bifásicos são formados por polímeros ou por polímero e soluto de pequena massa molecular. Os constituintes dos sistemas formados neste trabalho são polietileno glicol, maltodextrina, fosfato de potássio e citrato de sódio. Como as características dos sais são amplamente divulgadas na literatura (Bamberger *et alii*, 1985; Harris & Yalpani, 1985), mostram-se aqui apenas as principais características dos polímeros empregados.

1.3.3.1. Polietileno glicol

Os polietilenos glicóis (PEG) são compostos que se apresentam como líquidos claros e viscosos ou sólidos na forma de pós-secos e flocos. São altamente higroscópicos, não tóxicos, relativamente estáveis como soluções ou na forma sólidas e solúveis em benzeno, diclorometano, tetrafurano e água (Bamberger *et alii*, 1985).

Os PEG's apresentam-se como polímeros sintéticos de estrutura linear, com fórmula geral $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_n\text{H}$, com n maior ou igual a 4. São produzidos por polimerização de óxido de etileno com catalisador ácido ou básico. Existe, entretanto, dificuldade de preparar PEG de massa molecular maior que 10000 Da, devido à fácil desidratação do terminal hidroxietileno que gera um alceno na parte terminal da polimerização. Os de massas moleculares maiores que 10000 Da são, então, produzidos pela ligação de cadeias de pequena massa molecular. Neste processamento introduz-se ramificações ou sítios hidrofóbicos na molécula, o que afetará as propriedades do polímero formado (Harris & Yalpani, 1985). Muitos PEG's comerciais são materiais puros, que contêm como únicas impurezas água, etileno glicol, dietileno glicol e antioxidante. Este último é adicionado para impedir a auto-oxidação. Estes compostos são amplamente utilizados nas indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica (Bamberger *et alii*, 1985).

1.3.3.2. Maltodextrina

A dextrana é o polímero mais utilizado no processo de separação com sistema aquoso bifásico, porém devido ao seu alto custo outros polímeros vêm sendo utilizados, dentre estes se destaca a maltodextrina.

A maltodextrina é um produto obtido por hidrólise de amido por meio de tratamento térmico e/ou ácido ou enzimático. As fontes de amido utilizada na produção são milho, aveia, arroz, mandioca, batata e trigo. As maltodextrinas apresentam-se como uma mistura de sacarídeos com ampla distribuição de massas moleculares. Sua massa molecular médio varia entre 900 a 18000 g/mol. A estrutura química da maltodextrina pode ser vista na Figura 1.6 (Chronakis, 1998).

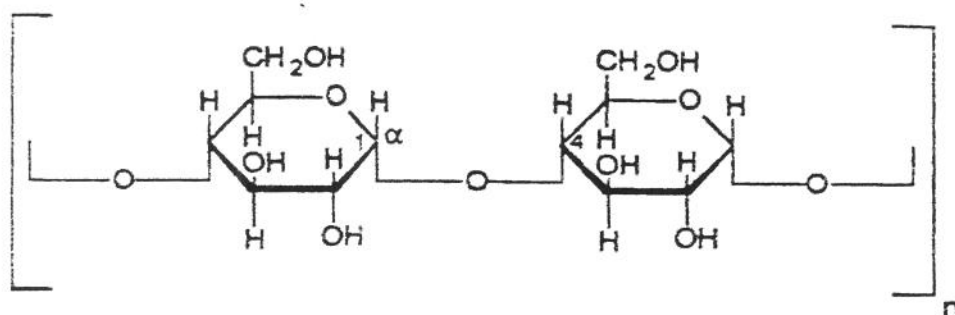


Figura 1.6: Estrutura química da molécula de maltodextrina.

A molécula é caracterizada de acordo com a dextrose equivalente (DE), que é a medida dos açúcares redutores presentes expressos como porcentagem de matéria seca. O valor do DE do amido é zero, enquanto o valor da glicose é 100. Pode ser classificada ainda pelo grau de polimerização (DP), calculado pela equação 1.3 (Dokic *et alii*, 1998).

$$DP = \frac{100}{DE} \quad 1.3$$

São empregadas como agentes fornecedores de textura, agentes encapsulantes, substitutos de gorduras, formadores de filmes, agentes controladores da cristalização no congelamento ou ainda como fornecedor de valor nutricional a alimentos (Chronakis, 1998,).

1.3.4. Coeficiente de Partição

No processo de separação em sistema aquoso bifásico é necessário que os compostos a serem separados distribuam-se seletivamente nas fases. Para verificar esta distribuição pode-se calcular o coeficiente de partição (K) que é a relação entre a concentração da substância na fase de topo pela concentração da mesma na fase de fundo como mostra a equação 1.4.

$$K = \frac{C_{S,topo}}{C_{S,fundo}} \quad 1.4$$

onde $C_{S,topo}$ e $C_{S,fundo}$ são as concentrações da substância nas fases de topo e de fundo, respectivamente (Albertsson, 1986).

Um grande número de diferentes interações químicas e físicas estão envolvidas no processo de partição em sistemas aquosos bifásicos, por exemplo, ligações de hidrogênio, interações de carga, forças de van der Waals, interações hidrofóbicas e efeitos estéricos. De forma mais ampla o coeficiente de partição é expresso pela soma destes fatores.

$$\ln K = \ln K_e + \ln K_{\text{hidrofóbico}} + \ln K_{\text{hidrofilico}} + \ln K_{\text{conformação}} + \ln K_{\text{outros fatores}} \quad 1.5$$

onde: K_e , $K_{\text{hidrofóbico}}$, $K_{\text{hidrofilico}}$, $K_{\text{conformação}}$, $K_{\text{outros fatores}}$ correspondem ao coeficiente de partição devido a fatores de interação eletrostática, hidrofóbica, hidrofílica, fatores de conformação e a outros não determinados, respectivamente (Zaslavsky, 1995).

Entretanto, é necessária uma comparação dos coeficientes de partição dos componentes do sistema, para que se verifique a separação da substância desejada daquelas consideradas contaminantes.

O coeficiente de partição depende de uma série de fatores: massa molecular do polímero, presença de eletrólitos, temperatura, tamanho da proteína e concentração das substâncias formadoras do sistema (Silva, 2000).

1.3.5. Separações

Gonzalez *et alii* (1990) utilizaram o sistema PEG/fosfato para eliminar células rompidas de cultura de *Kluyveromyces fragilis* com o objetivo de purificar β -galactosidase. As células foram para a fase inferior e as enzimas para a fase superior. O melhor sistema foi formado por sal (6-9%) e PEG (25-29%), independentemente da massa molecular do polímero. A recuperação da enzima na fase superior foi de 60 a 87%, porém nenhuma separação de enzima e proteína foi verificada. Monteiro Filho *et alii* (1998) separaram células de *Lactobacillus acidophilus* do caldo fermentado de forma eficiente, utilizando o sistema PEG-4000/maltodextrina (12/20%). O coeficiente de partição foi 60 e o tempo para separar as fases foi de 8 minutos.

Para Baskir *et alii* (1989) a escolha do polímero deve determinar a composição das fases e a natureza das interações polímero-proteína. A partição de biopartículas está relacionada com as propriedades superficiais do material e algumas vezes se emprega a partição como método para determinar a hidrofobicidade relativa de algumas proteínas.

A partição é favorecida utilizando-se polímeros com massa molecular baixo, mas esse efeito depende da massa molecular da substância a ser separada, pois as que possuem maior massa molecular são mais facilmente separadas. Portanto, polímeros com diferentes massas moleculares podem ser utilizados para otimizar o processo de partição de substâncias de diferentes tamanhos (Albertsson *et alii*, 1990). Isso também foi verificado por Tanuja *et alii* (1997) quando separaram amiloglicosidase de *Aspergillus niger* CFTRI-1105 em sistemas PEG/fosfato.

Gonzalez *et alii* (1990) verificaram que a massa molecular do PEG influenciava a recuperação de β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis*, e que a massa molecular de 400 proporcionava a maior recuperação (73 a 96% de enzima e 78 a 100% de proteína). Lahore *et alii* (1995) observaram que com o aumento da massa molecular do PEG, o coeficiente de partição da protease de *Mucor bacilliformis* decrescia 500 vezes.

O coeficiente de partição de α -lactoalbumina (α -La) e de albumina bovina padrão, em sistemas PEG/maltodextrina, decresceu com a massa molecular do PEG. Os valores para α -La foram maiores que os de β -lactoglobulina em PEG-1450 e similares nos sistemas com PEG-8000 e PEG-10000 (Silva & Meirelles, 2000). Com os PEG's de pequena massa molecular obteve-se um coeficiente de partição de 19,95 para lipase (Bradoo *et alii*, 1999). Os coeficientes de partição das proteínas e de penicilina acilase decresceram com a massa molecular do PEG, o que foi devido ao aumento de hidrofobicidade da fase de topo e ao aumento da cadeia do polímero, ou seja, a diminuição dos grupamentos hidroxila. Este aumento da cadeia diminuiu o volume excluído. A maior seletividade da extração ocorreu com PEG-1000, com rendimento de 83% e fator de purificação de 2,6 (Marcos *et alii*, 1999).

Aumentando a concentração do polímero, desloca-se o sistema de fases para longe do ponto crítico e ocorre o aumento da viscosidade das fases e do fator de separação (Albertsson *et alii*, 1990). Porém, Papamichael *et alii* (1992) verificaram que o rendimento de extração de fumerase diminuía de 85% para 42% e o coeficiente de partição passava de 1,2 para 0,35; quando a porcentagem de PEG passava de 18 para 17%, ou seja, quando se aproximava do ponto crítico. Tanuja *et alii* (1997) verificaram a mesma dependência.

Segundo Paquet *et alii* (1994) o coeficiente de partição de pristinamicina, em sistemas dextrana-70000/PEG-600, aumentava significativamente com a concentração dos polímeros, entretanto a massa molecular dos polímeros não alterava o valor deste coeficiente. Desta forma o sistema a ser formado era menos viscoso e conseqüentemente poderia ser usado em fermentações extrativas. Alves

et alii (2000) verificaram que o aumento da concentração do polímero aumentava o coeficiente de partição da insulina suína.

Marcos *et alii* (1998) estudaram o efeito da razão volumétrica das fases na separação de penicilina acilase de *Escherichia coli* em sistemas PEG/citrato e observaram que utilizando PEG-1000 ocorria decréscimo dos coeficientes de partição das proteínas totais e da enzima com a diminuição da razão volumétrica, já no sistema com PEG-3350 com NaCl o coeficiente de partição das proteínas totais aumentava e o da enzima diminuía.

Segundo Lahore *et alii* (1995) a diminuição do pH aumentava o coeficiente de partição, quando se utilizava sistema PEG-8000/fosfato e PEG-3350/fosfato para separar protease acida de *Mucor bacilliformis*. No sistema PEG-1450/fosfato o coeficiente de partição diminuía até pH 5. Devido a este fato, sugeriram que a variação do pH resultava na exposição de resíduos hidrofóbicos das proteínas, o que provocava o aumento da preferência da enzima pela fase polimérica. Gündüz & Korkamz (2000) observaram a mesma tendência, quando separaram albumina bovina padrão em sistemas PEG/dextrana.

A separação de penicilina acilase em sistema PEG/citrato apresentou uma diminuição do coeficiente de partição das enzimas e proteínas com o aumento do pH. Esta interferência era devida à variação das cargas do soluto ou à alteração da razão das cargas das espécies presentes no sistema estudado (Marcos *et alii*, 1999).

Para Albertsson *et alii* (1990) existe uma diferença significativa no coeficiente de partição quando se utilizam diferentes sais, o que significa dizer que diferentes íons têm diferentes afinidades pelas fases. Cátions decrescem o coeficiente de partição de proteínas de cargas negativas na ordem $\text{Li}^+ < \text{NH}_4^+ < \text{Na}^+ < \text{Cs}^+ < \text{K}^+$ e os ânions monovalentes na ordem $\text{F}^- < \text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{I}^-$. Os ânions bivalentes HPO_4^{2-} , SO_4^{2-} e Citrato^{2-} aumentam o coeficiente de partição, em comparação com os ânions monovalentes. Para proteínas de carga positiva a ordem dada acima é invertida. Kroner & Kula (1978) verificaram que KCl decrescia e Na_2SO_4 aumentava o coeficiente de partição da α -glucosidase no sistema formado por 7% (p/p) de PEG-400 e 2,5% (p/p) de dextrana T-500.

Adição de NaCl não alterou a partição de proteases de *Mucor bacilliformes* em sistema PEG/fosfato. Utilizando PEG de massas moleculares pequenas as enzimas concentraram-se na fase polimérica e as proteínas distribuíram-se equitativamente nas fases. Com o aumento da massa molecular as enzimas tinham comportamento igual ao das proteínas totais em PEG de massa molecular pequena, as proteínas ficavam na fase salina (Lahore *et alii*, 1995).

Ariga *et alii* (1994) notaram que a adição de NaCl afetava grandemente o coeficiente de partição de β -galactosidase de *Echerichia coli*; que baixos massas moleculares de PEG e concentração alta de fosfato favoreciam a partição e que adição de glicina no sistema aumentava o coeficiente de partição, devido à hidrofobicidade deste aminoácido, fazendo com que a enzima se deslocasse para a fase superior.

Bim & Franco (2000) observaram que o melhor sistema para purificar xilanase foi PEG-6000/fosfato (22-13%), com incorporação de 12% de NaCl. Os valores dos coeficientes de partição da enzima e das proteínas totais foram de 47 e 0,1 respectivamente, com fator de purificação e rendimento da enzima na fase de topo de 33 e 98%, respectivamente.

Bradoo *et alii* (1999) variaram a concentração de NaCl entre 1 e 4%. A concentração de 3% aumenta em 3 vezes o valor do coeficiente de partição de lipase (75,86), enquanto o valor para os contaminantes era de 0,66. Falco *et alii* (2000) observaram que a adição de 6% (p/v) de NaCl ao sistema PEG-1500/fosfato (16/16%), na separação de α -galactosidase de *Sesbania marginata*, aumentava o fator de purificação e a recuperação de 2,6 e 120% a 5,4 e 144%, respectivamente. Entretanto a incorporação de 12% de NaCl levava à diminuição do fator de purificação da enzima (4,8%) e aumento da recuperação (131%).

Segundo Marcos *et alii* (1999) a adição de NaCl aumentava a diferença de hidrofobicidade das fases, promovendo a partição de mais proteínas hidrofóbicas para a fase de topo. Separando penicilina acilase em sistema PEG/citrato, verificaram que a hidrofobicidade da enzima era maior que a das outras proteínas presentes no extrato, pois o coeficiente de partição da enzima aumentava mais

que o das proteínas totais. A maior seletividade ocorreu com 1,5 M de NaCl, tendo a enzima um fator de purificação de 5,7 e recuperação de 85%.

Bradoo *et alii* (1999) separaram uma mistura de lipases em sistema PEG-600/fosfato (70-40%) com 3% de NaCl a pH 7, e obtiveram 5,27 e 15,25% de rendimento para lipase ácida e neutra, respectivamente.

Proteínas são desnaturadas pelo calor, sendo suas estruturas secundária e terciária deterioradas. Neste caso as ligações covalentes são quebradas e eventualmente toda a estrutura é destruída, seguindo-se da agregação das mesmas. Regiões hidrofóbicas do interior da proteína podem se tornar expostas ao solvente e combinar-se formando aglomerados. Com esta coagulação provocada pela temperatura, a viscosidade do meio aumenta. Este fenômeno foi verificado para proteínas e células rompidas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus cereus*, que coagulavam em temperaturas entre 60 e 70°C e 45 e 60°C, respectivamente. Entretanto não foi observada nenhuma agregação para esse último microrganismo (Greve & Kula, 1991). Esta desnaturação pelo calor mostra que no processo de separação de proteínas totais e enzimas em sistema aquoso bifásico, deve-se levar em consideração a temperatura em que se realizará o processo.

Uma maneira de reduzir o consumo de produtos químicos e o custo do processo de partição é promover a reciclagem da solução de PEG e de sal (Papamichael *et alii*, 1992). Sob condições apropriadas o sistema de fases primário contendo células rompidas, sal e PEG, separa-se em fase inferior, que contém as células rompidas, e fase superior, contendo o produto. Nesta última, adiciona-se sal e forma-se um segundo sistema de fases, que por alteração do pH e/ou comprimento da linha de amarração, promove a migração do produto para a fase de fundo, sendo a fase superior reciclada para o início do processo. A fase inferior é processada por ultrafiltração, separando-se assim o produto da solução salina, que retorna ao segundo sistema formado. Segundo Gupta *et alii* (1999) o reciclo de reagentes é uma condição necessária pra adotar uma técnica em larga escala de forma econômica. Papamichael *et alii* (1992) aumentaram gradualmente a taxa de reciclo até 27 dm³/h o que causou redução do consumo das soluções de

PEG e fosfato de 50 e 22%, respectivamente. Já o fluxo de água diminuiu de 13 para 3 dm³/h.

Apesar da aplicação do sistema aquoso bifásico na separação de várias enzimas, ainda não foi estudado o comportamento de partição das enzimas pectinolíticas nestes sistemas. Estas enzimas são purificadas nos procedimentos convencionais, formados por seqüências complexas utilizando vários passos, como precipitação, diálise e muitas cromatografias. Assim, a aplicação de sistemas simples como o sistema aquoso bifásico, neste trabalho, traz uma nova alternativa para a separação e purificação das enzimas pectinolíticas.

1.3.6. Vantagens do Processo

Para Kula (1990), a extração em sistemas aquosos bifásicos freqüentemente apresenta vantagens como proporcionar alto rendimento de atividade, aproximação rápida do equilíbrio, facilidade de ampliação de escala e possibilidade de conduzir o processo de forma contínua. Já Eggers *et alii* (1989) afirmaram que a maior vantagem dos sistemas aquosos bifásicos é evitar a perda da estabilidade enzimática devido ao menor contato entre enzima e o solvente orgânico.

Segundo Gupta *et alii* (1999) o uso de sistema aquoso bifásico reduz substancialmente o número inicial de passos de purificação como clarificação, concentração e parcial purificação, que podem ser integrados em um passo.

Vernau & Kula (1990) observaram que sistemas formados por PEG/citrato podem ser aplicados na extração de proteínas e enzimas, pois apresentam como vantagens o baixo custo e baixa toxidez do citrato.

CAPÍTULO 2

ESTUDO DAS ANÁLISES EMPREGADAS NA PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS ENZIMAS PECTINOLÍTICAS

2.1. INTRODUÇÃO

Ao se iniciar um trabalho científico é necessário o prévio conhecimento das análises que serão feitas para que os objetivos do trabalho sejam alcançados com êxito. A literatura científica oferece uma grande quantidade de técnicas, que se pode empregar ou não ao trabalho proposto. Dessa forma, cabe ao pesquisador ter o discernimento na escolha dos métodos analíticos. Uma vez selecionado, ainda é necessário testá-lo e definir parâmetros como tempo, temperatura e pH, mesmo que muitas vezes já tenham sido fixados pela literatura. Muitas vezes a técnica a ser empregada é influenciada por compostos presentes na solução em que a substância vai ser quantificada.

Os compostos produzidos por fermentações são obtidos junto com uma série de outras substâncias e, para que sejam corretamente quantificados é preciso que se conheça a aplicabilidade do método selecionado. Nos processos de separação por meio de sistemas aquosos bifásicos além da substância que será purificada, existe a presença dos formadores das fases que podem ou não exercer influência nas determinações das concentrações do material estudado.

Por esta razão este capítulo tem o objetivo de avaliar o grau de pureza do substrato das fermentações, verificar o tempo real de inativação enzimática das exo-PG, selecionar o melhor método para a determinação da atividade de PE e a concentração do substrato na quantificação desta enzima, definir o intervalo de tempo no qual a condição de velocidade inicial é satisfeita e avaliar a influência dos constituintes das fases do sistema aquoso bifásico nas atividades enzimáticas das pectinases e da concentração das proteínas totais.

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1. Determinação da Concentração de Proteínas Totais

As proteínas totais foram determinadas pelo método de Lowry (1952) e pelo método de Bradford (1976), utilizando Albumina Bovina como padrão.

2.2.2. Determinação da Concentração de Pectina

A concentração de pectina foi determinada pelo método de Dietez & Rouse (1953). Tomou-se 1 ml da solução de pectina e adicionou-se 0,5 ml de solução alcoólica carbazole (0,1%), formou-se um precipitado branco. Adicionaram-se 6 ml de ácido sulfúrico concentrado e homogeneizou-se a mistura, que foi deixada em repouso por 10 min para o desenvolvimento da coloração. A absorbância foi lida a 525 nm. O branco foi feito com álcool etílico e a curva padrão com pectina cítrica purificada.

2.2.3. Determinação da Concentração dos Açúcares Redutores

A concentração de açúcares redutores foi determinada pelo método de Somogy (1952).

2.2.4. Determinação da Concentração de Metanol

A concentração de metanol foi determinada pelo método de Wood & Siddiqui (1971). Alíquotas de 0,5 ml da solução de concentração de metanol desconhecida foram usadas no ensaio. Adicionou-se 0,5 ml de ácido sulfúrico 2 N. A essa mistura acrescentou-se 0,2 ml de permanganato de potássio (2%, p/v). Agitou-se a mistura e manteve-a em banho de gelo por 15 min. Após esse tempo adicionou-se 0,2 ml de arsenito de sódio 0,5 M e 0,6 ml de água destilada, a

mistura foi deixada em repouso por 1 h a temperatura ambiente. Ao final desse tempo adicionou-se 2 ml de pentano-2,4-dione (0,02M, dissolvido em solução com ácido acético 0,05 M e acetato de amônio 2 M e aqueceu-se a mistura na temperatura entre 58-60°C por 15 min. A solução foi resfriada a temperatura ambiente e a absorbância da mesma foi lida a 412 nm. A curva padrão foi feita com metanol puro.

2.2.5. Determinação da Atividade de Poligactoronase (PG)

As atividades de endo e exo-PG foram determinadas de acordo com Kotzekidou (1991) e Pereira *et alii* (1993).

Para endo-PG misturou-se 18 mL de solução de pectina 2% (p/v) em tampão acetato (0,2 M pH 4,5) e 1 mL de solução enzimática e incubou-se à 37°C. A atividade foi determinada pela redução da viscosidade, que foi medida através de um viscosímetro de Brookfield. Uma unidade de endo-PG foi definida como a quantidade de enzima que reduz a viscosidade da solução a 50% por min.

Para exo-PG misturou-se 1 mL de solução de pectina 1% (p/v), o mesmo volume de tampão acetato (pH 4,5) e 0,5 mL de preparado enzimático e incubou-se a 37°C por 15 min. A atividade enzimática foi determinada pela quantidade de ácido galacturônico produzido, que foi determinado como açúcar redutor pelo método de Somogy. Uma unidade de exo-PG foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de ácido galacturônico por min a 37°C e pH 4,5.

2.2.6. Determinação da Atividade de Pectina-liase (PL)

A atividade de PL foi determinada pelo monitoramento do aumento da absorbância a 235 nm, devido à produção de compostos 4,5 insaturados (Albersheim & Killias, 1962; Alaña *et alii*, 1989).

Em 1 mL de solução de pectina 1% (p/v) adicionou-se 1,25 mL de tampão citrato-fosfato (0,15 M pH 5,5) e 0,25 mL de preparado enzimático. Incubou-se a

mistura a 40°C por 15 min. Uma unidade de PL foi definida como a quantidade de enzima que produz um aumento de uma unidade de absorbância a 235 nm por minuto.

2.2.7. Determinação da Atividade de Pectina-esterase (PE)

A atividade da PE foi determinada por dois métodos o espectrofotométrico pelo qual era quantificado o metanol liberado no meio, de acordo com Wood & Siddiqui (1971) e o titulométrico segundo Kotzekidou, 1991 e Alaña *et alii*, 1989.

Em 2 mL de solução de pectina 0,1% (p/v) adicionou-se 4 mL de tampão acetato pH 7,5 com 0,001 M de CaCl₂ e 2 mL de preparado enzimático. A mistura foi incubada a 25°C por 40 min. Uma unidade de PE foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de metanol por min a 40°C.

Pelo método titulométrico foi determinado, por titulação potenciométrica, o número de moles de grupos carboxil que eram formados pela deesterificação da pectina.

Em 5 mL de pectina cítrica (0,5%, p/v) adicionou-se 3 mL de água destilada e 1 mL de preparado enzimático. A mistura de reação foi mantida a 30°C por 15 min. O ácido liberado pela reação foi titulado continuamente até pH 7,0 com NaOH 0,1N. Uma unidade de PE foi definida como a quantidade de ácido liberado em μmol por min.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. Determinação da Porcentagem de Pureza do Substrato Comercial

A fonte de carbono empregada nos processos fermentativos para a produção de enzimas pectinolíticas foi a pectina comercial tipo 8002 de baixo grau de esterificação obtida da Braspectina SA. Para usar esse material como substrato, fez-se necessário quantificar o real teor de pectina, ou seja, a pureza do substrato comercial utilizado, através do método descrito no item 2.2.2. O grau de pureza foi determinado pela equação 2.1.

$$\% \text{ Pureza} = \frac{\text{massa do substrato} \times 100}{\text{massa de pectina}} \quad 2.1$$

Através da curva-padrão de pectina obtida pelo método (Figura A-1 do Apêndice A) obteve-se a equação 2.2 com coeficiente de correlação linear de 0,995.

$$C_{\text{pectina}} = \frac{A - 0,1540}{4,4787} \quad 2.2$$

onde, $A \Rightarrow$ Absorbância a 525 nm.

A percentagem de pureza foi determinada em três amostras com diferentes concentrações de substrato. Obteve-se um valor médio de $80,32 \pm 1,94$ % de pureza, como mostra a Tabela 2.1. Com esse valor pode-se corrigir a massa de pectina a ser adicionada na fermentação para que se obtenha 1% (p/v) da mesma.

Tabela 2.1. Porcentagem de Pureza da pectina comercial tipo 8002.

Amostra	M _{substrato} (g)	M _{pectina} (g)	% Pureza
1	0,0152 ± 0,0001	0,0119 ± 0,0007	78,20 ± 4,77
2	0,0305 ± 0,0001	0,0253 ± 0,0001	82,89 ± 0,18
3	0,0457 ± 0,0001	0,0365 ± 0,0004	79,87 ± 0,97

2.3.2. Teste da inativação Enzimática

O teste foi realizado para verificar o tempo necessário para inativar termicamente a exo-PG, quando se utilizou a enzima comercial Pectinex-3XL (Novo Nordisk). A enzima foi mantida em banho-maria em ebulição em intervalos de tempo variando de 5 a 25 min na ausência de substrato e depois aplicada nesse para ver o efeito na produção de açúcares redutores, tomando-se como padrão a enzima sem inativação.

Observou-se que a porcentagem de açúcares redutores, expresso em ácido galacturônico, utilizando a enzima inativa foi em média $31,70 \pm 0,78$ % menor que a amostra com enzima ativa (Figura 2.1 e Tabela A-1 do Apêndice A), comprovando que não houve ação enzimática em todos os tempos utilizados e que na estrutura da pectina há açúcares redutores. Ceci & Lozano (1998) verificaram que a temperatura acima de 50°C propiciava o início da inativação enzimática de endo-PG comercial após a enzima estar a 30 min na temperatura indicada e que a 70°C a atividade relativa caia a menos de 20%.

Com base neste resultado aplicou-se o tempo de 10 min para proceder à inativação enzimática de exo-PG e extrapolou-se o resultado para endo-PG e PL. Não foi possível aplicar este procedimento para inativar PE nos ensaios realizados por espectrofotometria, pois era necessário avaliar o número de moles de metanol produzido pela ação da enzima e como o metanol tem ponto de ebulição de 64,5°C, a inativação térmica não se aplicava. Neste caso, inativou-se a enzima através da adição de ácido sulfúrico 2 M na proporção 1:1. Ceci & Lozano (1998) obtiveram uma redução da atividade relativa de PE comercial de aproximadamente 10% em pH 5,5 e de aproximadamente 5% a pH 6,0 para

Pectinol A1 e Rôhapest D5s, respectivamente. Já Zheng & Shetty (2000) observaram que a enzima exo-PG de *Lentinus edodes* era inativada a 85°C por incubação durante 20 min.

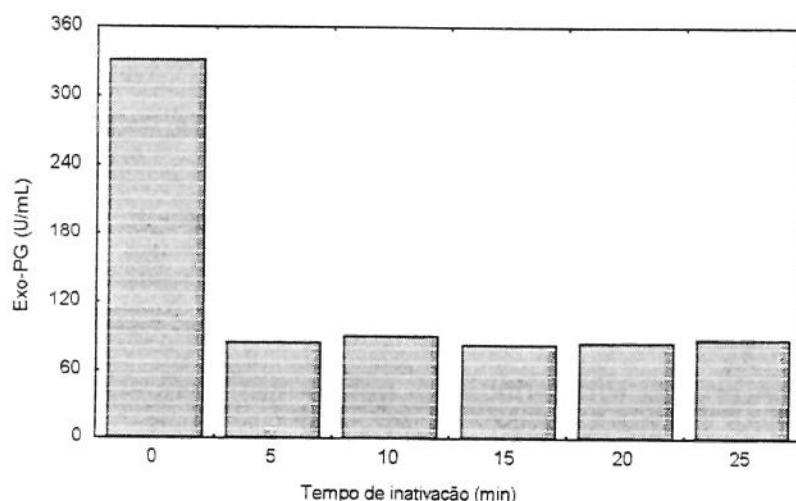


Figura 2.1: Avaliação da inativação térmica da enzima exo-PG.

2.3.3. Avaliação das Atividades Enzimáticas

2.3.3.1. Atividade de PE

A avaliação da atividade enzimática de PE foi realizada por dois métodos diferentes: o espectrofotométrico (Wood & Siddiqui, 1971) pelo qual foi quantificado o metanol liberado pela ação da enzima e o titulométrico (Kotzekidou, 1991; Alaña *et alii*, 1989) pelo qual se avaliou o grupo carboxila produzido pela ação da enzima. Os resultados da atividade enzimática de PE em Pectinex-3XL são mostrados nas Figura 2.2 e 2.3 e nas Tabela A-2 e A-3 do apêndice A. A amostragem foi feita a 40 e 60 min de reação.

Na determinação realizada em espectrofotômetro a reação enzimática se processava em condições de velocidade inicial de reação até 60 min, já no método titulométrico a condição era verificada apenas nos primeiros 15 min da reação. Além disso, o método espectrofotométrico teve maior erro na determinação da

atividade a 15 e 40 min de reação (18,9 e 6,9%, respectivamente) que no procedimento em espectrofotômetro a 40 e 60 min de reação (2,9 e 1,0%, respectivamente). O método espectrofotométrico apresentou atividade enzimática inferior à obtida pelo método titulométrico, o que está de acordo com Ceci & Lozano (1998) que verificaram a mesma diferença quando detectaram atividade de PE de enzimas comerciais por métodos titulométrico e espectrofotométricos.

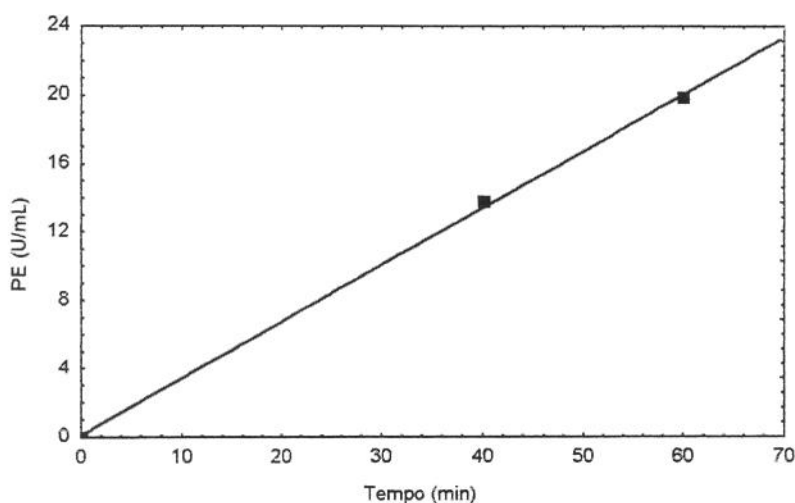


Figura 2.2: Atividade de PE pelo método espectrofotométrico em função do tempo de reação.

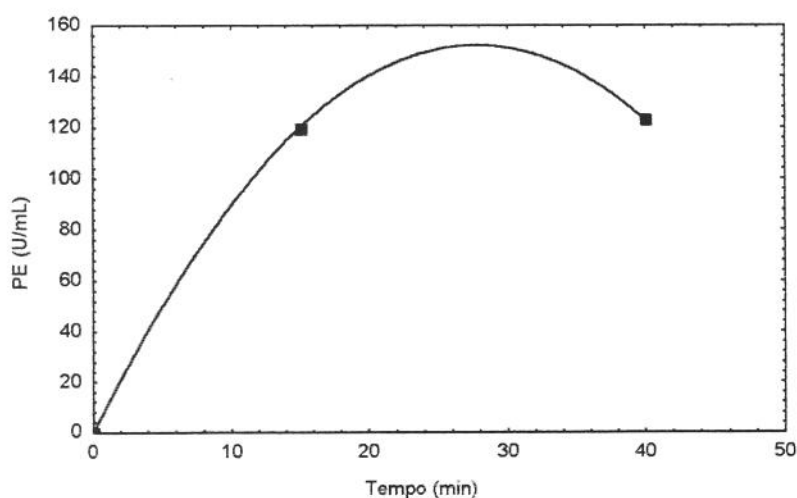


Figura 2.3: Atividade de PE pelo método titulométrico em função do tempo de reação.

Nos ensaios de fermentação necessitou-se de tempo de reação longo o suficiente para que se pudesse detectar a menor atividade de enzima possível, mas de forma que a atividade enzimática fosse determinada de forma precisamente e nas condições de velocidade inicial, por isso passou-se a utilizar o método espectrofotométrico.

Na determinação da PE a concentração de pectina recomendada foi de 0,1%, entretanto a pectina obtida da Sigma continha baixo grau de esterificação, ou seja, a quantidade de metanol a ser liberado poderia ser tão pouco que prejudicaria a determinação da atividade enzimática, por isso estudou-se o efeito da variação da concentração da solução de pectina na atividade enzimática. Os resultados desta variação são mostrados na Tabela 2.2.

As soluções apresentaram praticamente a mesma liberação de metanol, desta forma a concentração de pectina não alteraria a atividade enzimática, mas a solução tornar-se-ia muito viscosa. Passou-se, entretanto, a utilizar a concentração de 1% de pectina (p/v).

Tabela 2.2: Atividade enzimática de PE pelo método titulométrico em diferentes concentrações de pectina.

C_{pectina} (% p/v)	C_{metanol} ($\mu\text{mol/mL}$)	PE (U/mL)
0,1	$0,132 \pm 0,00$	$13,19 \pm 0,00$
0,5	$0,133 \pm 0,00$	$13,35 \pm 0,00$
1,0	$0,137 \pm 0,00$	$13,75 \pm 0,40$

2.3.3.2. Atividade de PL

Os valores das atividades enzimáticas de PL em diferentes tempos de reação são dados na Figura 2.4 e Tabela A-4 do Apêndice A.

Observa-se que a partir de 15 min de reação a enzima sofre inibição, pois ocorre redução da atividade enzimática. A condição de velocidade inicial para determinar a atividade enzimática é apenas satisfeita nos primeiros 15 min de

reação. Portanto, esse foi o tempo de reação, utilizado na determinação da atividade enzimática de PL.

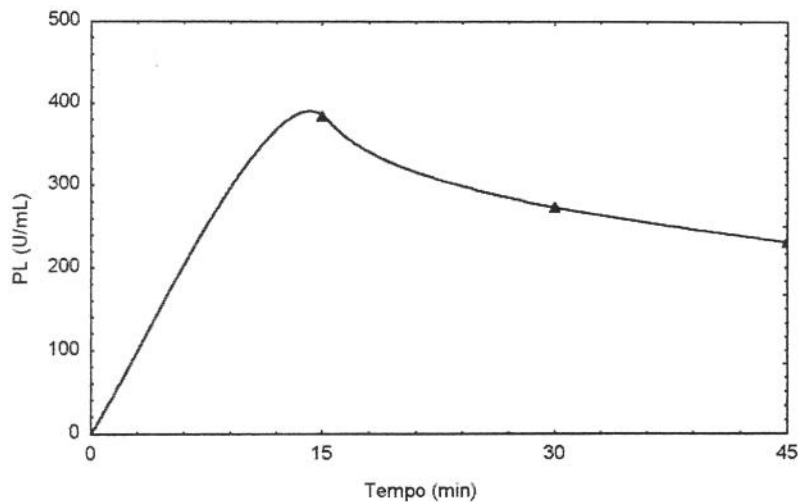


Figura 2.4: Atividade de PL em função do tempo de reação.

2.3.3.3. Atividade de Exo-PG

Variando-se o tempo de reação enzimática entre 15 e 60 min observou-se aumento da atividade enzimática como mostra a Figura 2.5 e Tabela A-5 do Apêndice A. Os resultados indicam que a reação nos tempos de até 30 min encontrava-se em condições iniciais de velocidade enzimática.

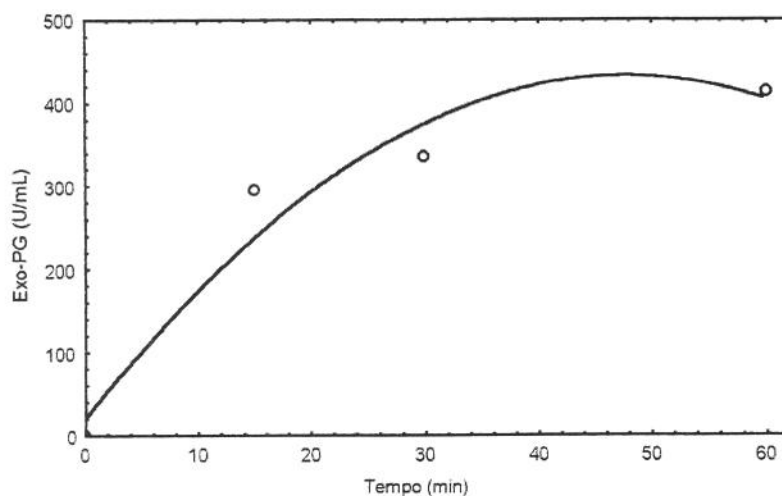


Figura 2.5: Atividade de exo-PG em função do tempo de reação.

Para a determinação das atividades enzimáticas das pectinases comerciais utilizou-se o tempo de 15 min, já para as obtidas por fermentação usou-se o tempo de 30 min de reação para que fosse possível detectar a atividade enzimática mesmo no início da fermentação quando a atividade era muito baixa.

2.3.3.3. Atividade de Endo-PG

A endo-PG tem a capacidade de reduzir a viscosidade de soluções que contém pectina. Na determinação da atividade desta enzima define-se uma unidade de endo-PG como a quantidade de enzima que reduz a viscosidade da solução do substrato a 50% por min. Na Figura 2.6 (Tabela A-6 do Apêndice A) observa-se a redução da viscosidade de uma solução de pectina 1% em tampão acetato 0,1 M a pH 4,5 e 37°C pela ação da enzima comercial Pectinex-3XL. Observa-se que a redução da viscosidade da solução atingiu 50% da inicial apenas no tempo de 160 min. Este tempo é bastante elevado para determinar a atividade da endo-PG, e nos experimentos de fermentação em tempos iniciais, no qual a atividade enzimática é muito baixa a determinação estaria comprometida.

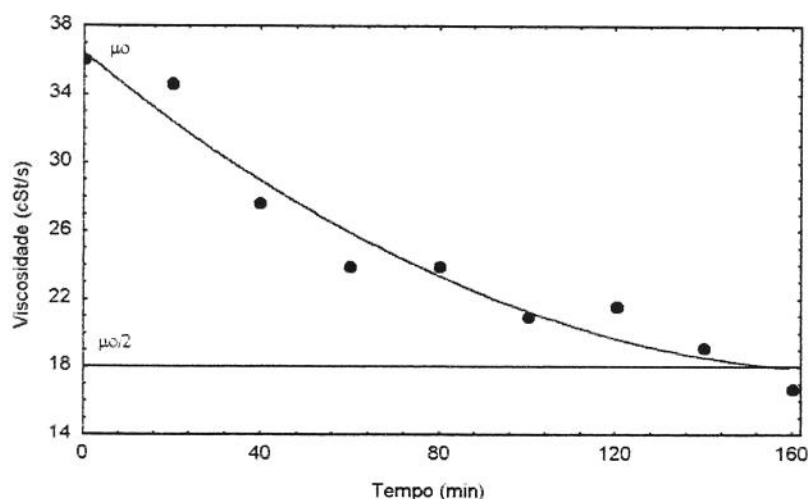


Figura 2.6: Redução da viscosidade de uma solução de Pectina 1% (p/v) em tampão acetato 0,1 M a pH 4,5 e 37°C pela ação da endo-PG em relação ao tempo.

Por estas razões modificou-se a definição da unidade de endo-PG. Manteve-se constante o tempo 15 min e determinou-se a porcentagem de redução da viscosidade da solução. Uma unidade de atividade de endo-PG foi definida como a quantidade de enzima que reduz 1% da viscosidade da reação enzimática por min.

A condição de velocidade inicial foi mantida até o tempo de 60 min quando a enzima passava a sofrer inibição, como mostra a Figura 2.7 e Tabela A-7 do Apêndice A. Assim manteve-se o tempo de reação em 15 min para as enzimas comerciais e 30 min para a enzima produzida por fermentação.

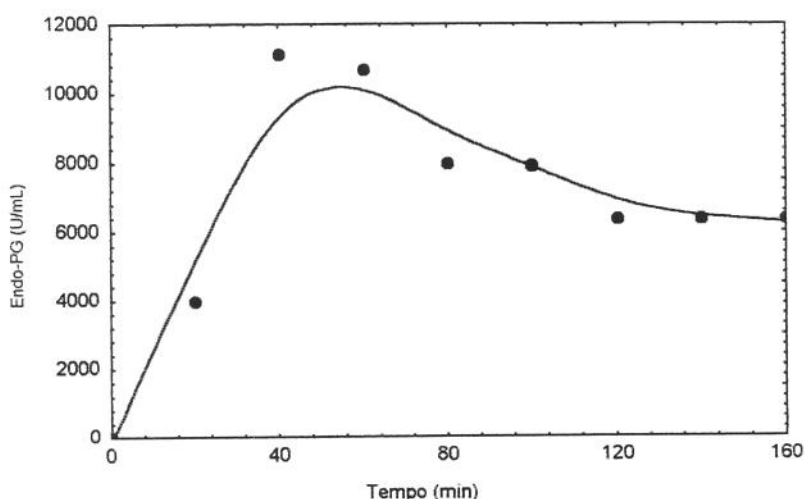


Figura 2.7: Atividade de endo-PG em relação ao tempo.

2.3.4. Influência dos constituintes dos sistemas aquosos bifásicos na atividade enzimática e nas concentrações de proteína totais

A influência dos constituintes do sistema na atividade das enzimas pectinolíticas (enzima comercial Citrozym Cloudy 100L, que não contém PE) e na concentração de proteínas totais foi estudada mais detalhadamente em sistemas monofásico, utilizando os constituintes nas mesmas concentrações que apresentaram nas fases ricas em cada um para sistemas formados com ponto de mistura na concentração de 20% do primeiro constituinte (PEG) e 15% do

segundo constituinte (fosfato de potássio, citrato de sódio e maltodextrina): PEG (41%), fosfato de potássio (22%), citrato de sódio (25%) e maltodextrina (60%). Estes valores foram obtidos através dos diagramas de equilíbrio reportados por Albertsson (1986), Vernau & Kula (1990) e Silva (2000) mostrados nas Figuras A-2 a A-4 do Apêndice A. Os valores de referência foram obtidos com a dissolução da enzima em água destilada. Os resultados podem ser vistas pelas Figuras 2.8 a 2.11 e Tabelas A-8 a A-11 do Apêndice A.

À medida que aumentou a massa molecular do PEG o valor da concentração das proteínas totais aumentou e ficou próximo daquele obtido com a água (referência), já para os sais, o fosfato apresentou menor interferência (-0,8%), como mostra a Figura 2.8.

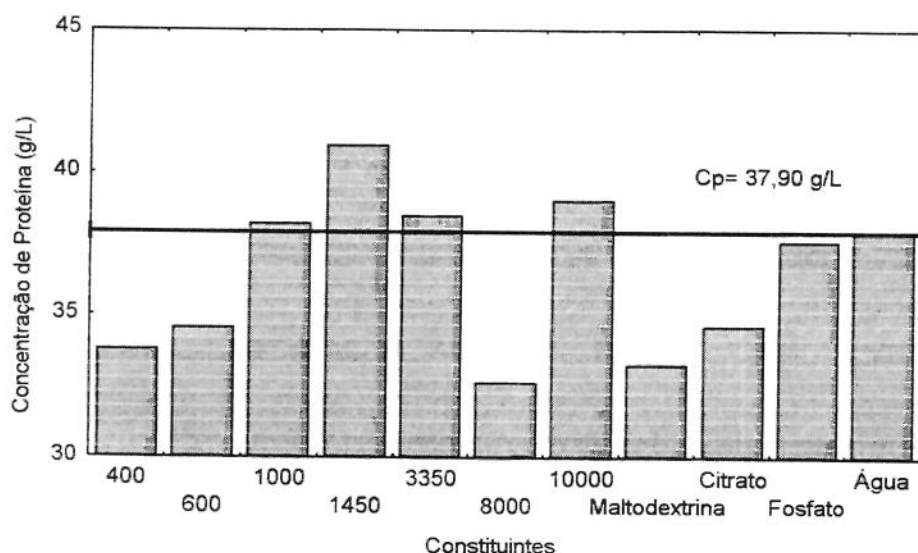


Figura 2.8: Interferência dos constituintes das fases do sistema aquoso bifásico na concentração de proteína.

Exceto com PEG-400 (12,7% de aumento) as atividades de PL foram inferiores à referência. A maltodextrina influenciou a atividade de exo-PG (1135,7%), e exceto para fosfato e citrato todos os constituintes do sistema induziram a redução da atividade de exo-PG em relação à referência. Aumento de atividade enzimática na presença de PEG foi também observado por diversos autores. Levin & Forchiassin (1998) verificaram que o aumento de atividade de poligalacturonase de *Trametes trogii* por PEG era devido à permeabilidade e/ou

promoção da liberação da enzima. Chen & Lee (1999) obtiveram aumento da atividade de quitanase de 13,6 para 25,8 U/mL e Bradoo *et alii* (1998) observaram aumento de 3,5 vezes na detecção de lipase.

A interferência provocada pelos componentes das fases na atividade de endo-PG foi relativamente baixa (máximo de -3,7%), pois ela sempre ficou próxima àquela atividade obtida em água.

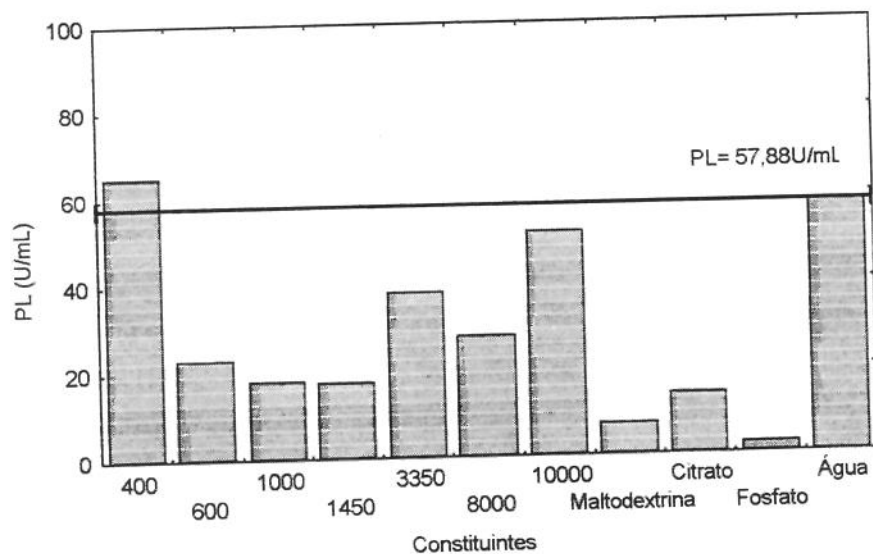


Figura 2.9: Interferência dos constituintes das fases do sistema aquoso bifásico na atividade de PL.

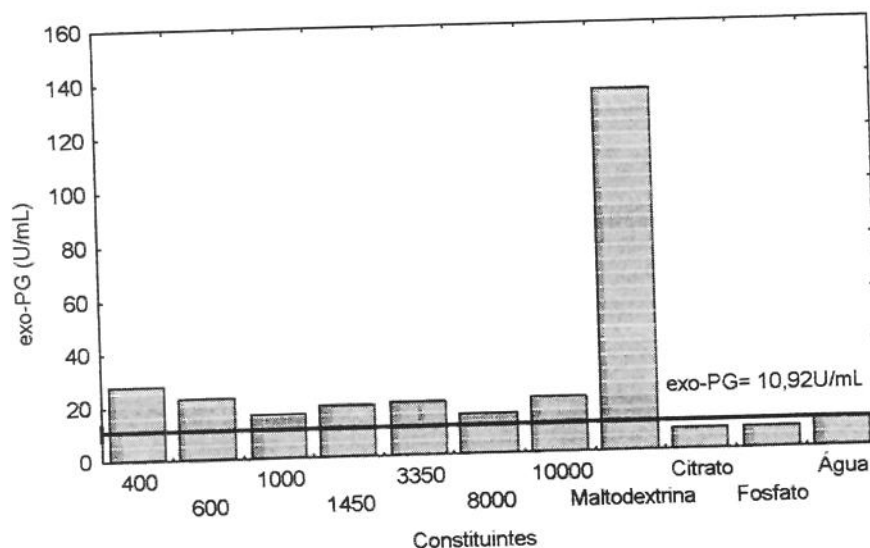


Figura 2.10: Interferência dos constituintes das fases do sistema aquoso bifásico na atividade de exo-PG.

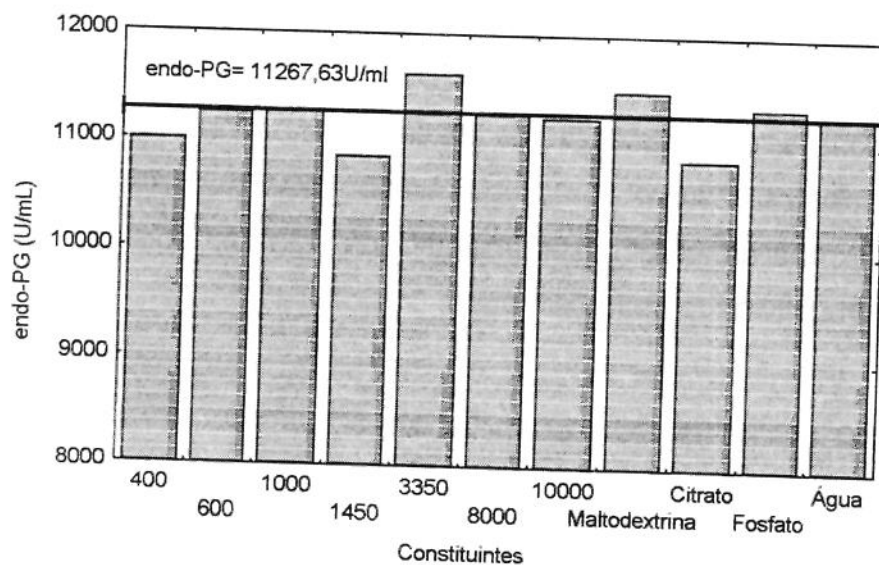


Figura 2.11: Interferência dos constituintes das fases do sistema aquoso bifásico na atividade de endo-PG.

2.4. CONCLUSÕES PARCIAIS

A pectina comercial, tipo 8002 com baixo teor de esterificação, apresenta $80,32 \pm 1,94$ % de pureza.

A inativação da exo-PG em banho-maria em ebulição mostra-se eficiente mesmo em tempos curtos como 5 min. Porém, deve ser aplicado tempo de inativação igual a 10 min, para se ter certeza da inativação.

Na determinação de PE ocorre diferenças no valor da atividade enzimática calculada. O método espectrofotométrico apresenta o menor erro quando comparado com o método titulométrico. Este pode ser executado sem alterar a condição de velocidade inicial enzimática até 60 min, enquanto aquele apenas até 15 min. O método espectrofotométrico mostra-se mais flexível com relação ao tempo de execução da reação enzimática. Não há grande diferença de atividade enzimática com diferentes concentrações de substrato (pectina em tampão acetato 0,2 M com CaCl_2 0,001 M a pH 7,5). Entretanto foi utilizado a concentração de 1% (p/v).

A reação enzimática, para determinação de PL, pode ser realizada em condições de velocidade inicial até o tempo de 15 min, quando então passa a sofrer inibição. Já para a exo-PG e endo-PG a reação pode ser executada até 30 min de reação.

A redução da viscosidade da solução de pectina 2% (p/v), pela ação da endo-PG, requer tempos elevados (acima de 160 min) para atingir 50% da viscosidade inicial, por isso deve-se fixar o tempo de 15 min e 30 min para a enzima comercial e produzida por caldo fermentado, respectivamente.

O aumento da massa molecular dos PEG's diminui a interferência destes na determinação da concentração de proteína, exceto para PEG-8000. Já para o segundo constituinte, o fosfato é o que apresenta menor interferência. Exceto PEG-400 todos os constituintes do sistema inibem a atividade de PL. Já a atividade de exo-PG é ativada, sendo que a maltodextrina aumenta mais de 10 vezes a atividade enzimática. Endo-PG praticamente não sofre influência dos constituintes formadores do sistema aquoso bifásico.

CAPÍTULO 3

PRODUÇÃO DAS ENZIMAS PECTINOLÍTICAS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

3.1. INTRODUÇÃO

Enzimas são biocatalizadores que podem acelerar a velocidade de reação. São conhecidos diversos tipos de enzimas com atuação em diferentes substratos, dentre estas, pode-se citar as pectinases que são capazes de degradar pectina. Estas enzimas são responsáveis pelo processo de maturação de frutos na natureza. São produzidas por uma grande variedade de microrganismos e utilizadas em muitos processos industriais. Estão divididas segundo seu modo de atuação no substrato e podem ser hidrolases, liases e esterases. Dentre suas aplicações destaca-se a redução de viscosidade, o que facilita a obtenção de sucos concentrados e no processo de clarificação de vinhos, por isso a importância da produção de poligalacturonases.

Comercialmente, as enzimas pectinolíticas são produzidas por fungos, sendo quase exclusivamente obtidas por *Aspergillus niger*, e apresenta-se como complexo multienzimático. Para sua aplicação em processos de purificação faz-se necessário o conhecimento da cinética de produção enzimática para a correta escolha do tempo de fermentação bem como das melhores condições a serem empregadas.

O objetivo deste capítulo é selecionar o melhor microrganismo produtor de pectinases entre três diferentes fungos e uma levedura, e do melhor meio de cultura dentre os utilizados na literatura, buscando a determinação do tempo de fermentação onde ocorre a máxima atividade enzimática. Estes resultados são usados nos capítulos subseqüentes.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Microrganismos e Meio de Cultura

Utilizou-se *Picchia canadensis* CCT-2636, *Penicillium italicum* IZ-1584, *Humicola grisea* CCT-2664 e *Aspergillus niger* NRRL-3122 para produzir as enzimas pectinolíticas. Estes microrganismos foram obtidos da Fundação de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello” e do Instituto Zimotécnico da ESALQ. Os microrganismos foram mantidos em estoque em ágar inclinado de acordo com o catálogo da Fundação “André Tosello”. A composição dos meios de cultura testados é mostrada na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Composição dos meios de cultura.

Componentes	Composição		
	Meio 01 ^(a)	Meio 02 ^(b)	Meio 03 ^(c)
	% (p/v)	% (p/v)	% (p/v)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,66	-	0,1
NaNO ₃	-	0,2	-
KH ₂ PO ₄	0,35	0,005	0,05
K ₂ SO ₄	-	0,035	-
FeSO ₄	0,015	0,001	-
MgCl ₂	-	0,02	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,01	-	0,05
Pectina	1	1	1
Extrato de levedura	-	-	0,2
Glicose	-	-	9
Sacarose	-	3	-

^(a)Pereira *et alii* (1993), ^(b)Alaña *et alii* (1990); ^(c)Ruiz *et alii* (1988).

3.2.2. Condições das Fermentações

Utilizou-se um fermentador de bancada (Fermentador LSL - Biolafite SA de 6 L de capacidade) com volume de trabalho de 4 L. As fermentações com os fungos ocorreram a pH inicial de 4,5; agitação de 200 rpm, inóculo contendo aproximadamente 4×10^{11} esporos/mL (10% do volume do meio a ser fermentado), aeração de 0,5 vvm e temperatura de 28°C. A fermentação, com levedura, foi realizada a pH 5,0, agitação de 400 rpm, temperatura de 28 °C, aeração de 0,5 vvm e inóculo composto de caldo de cultura fermentado por 96 h (10% do volume do meio).

3.2.3. Determinação da Massa Celular Seca

As células de leveduras foram separadas do meio de cultura por centrifugação e as de fungo foram separadas por filtração em papel de filtro Whatmann nº 52. Em seguida as células foram secas em estufa a vácuo a 60°C até peso constante.

3.2.4. Determinação da Concentração de Proteínas Totais

As proteínas totais foram determinadas pelo método de Lowry (1952) utilizando Albumina Bovina como padrão.

3.2.5. Determinação da Concentração de Pectina

Pectina foi determinada pela quantificação da concentração de ácido galacturônico, antes e depois da ação de 0,25 mL de Pectinex 3XL em 25 mL de caldo de cultura. A concentração de pectina foi calculada pela equação 3.1.

$$C_{\text{pectina}} = C_{\text{acd}} - C_{\text{aca}} \quad 3.1$$

onde: $C_{\text{pectina}} \Rightarrow$ Concentração de pectina (g/L).

C_{aca} e $C_{\text{acd}} \Rightarrow$ Concentração de ácido galacturônico antes e depois da ação da Pectinex 3XL, respectivamente.

3.2.6. Determinação da Concentração dos Açúcares Redutores

A concentração de açúcares redutores foi determinada pelo método de Somogy (1952).

3.2.7. Determinação da Concentração de Metanol

A concentração de metanol foi determinada pelo método de Wood & Siddiqui (1971).

3.2.8. Determinação da Concentração de Glicose

A concentração de glicose foi determinada conforme o procedimento do catálogo técnico do reagente Glicose Enz-Color. Em 20 μL da amostra foram adicionadas 2,5 mL do reagente e a mistura foi incubada a 37°C por 10 min. A absorbância foi lida a 510 nm. Esta leitura foi comparada com a de uma solução padrão de glicose (0,1%, p/v). A concentração de glicose foi calculada pela equação 3.2.

$$C_{\text{glicose}} = \frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{padrao}}} \quad 3.2$$

onde: $C_{\text{glicose}} \Rightarrow$ Concentração de glicose (g/L).

A_{amostra} e $A_{\text{padrao}} \Rightarrow$ Absorbância da amostra e do padrão, respectivamente.

3.2.9. Determinação da Concentração de Sacarose

A sacarose foi hidrolisada pela adição de 2 mL de HCl 2 M em 2 mL de amostra, que foram levados a banho-maria em ebulição por 5 min. A mistura foi posta em banho de gelo e adicionado 2 mL de NaOH 2 M.

Determinou-se a concentração da glicose antes e depois da hidrólise (item 3.2.8). A concentração de sacarose foi determinada por estequiometria, levando-se em consideração a glicose produzida apenas pela hidrólise ácida da sacarose (diferença entre a concentração de glicose depois e antes da hidrólise) como mostra a equação 3.3.

$$C_{\text{sacarose}} = C_{\text{gd}} - C_{\text{ga}} \quad 3.3$$

onde: $C_{\text{sacarose}} \Rightarrow$ Concentração de sacarose (g/L).

C_{gd} e $C_{\text{ga}} \Rightarrow$ Concentração de glicose depois e antes da hidrólise.

3.2.10. Determinação da Atividade de Poligactoronase (PG)

As atividades de endo e exo-PG foram determinadas de acordo com Kotzekidou (1991) e Pereira *et alii* (1993).

As misturas de reação foram descritas nos itens 2.2.5 e 2.2.6 do capítulo 2. Uma unidade de endo-PG foi definida como a quantidade de enzima que reduz 1% da viscosidade da reação enzimática por min, e uma unidade de exo-PG foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido galacturônico por min a 37°C e pH 4,5.

3.2.11. Determinação da Atividade de Pectina-liase (PL)

A atividade de PL foi determinada pelo monitoramento do aumento da absorbância a 235 nm, devido à produção de compostos 4,5 insaturados (Albersheim & Killias, 1962; Alaña *et alii*, 1989).

A mistura de reação enzimática foi descrita no item 2.2.7 do capítulo 2 e uma unidade de PL foi definida como a quantidade de enzima que produz um aumento de uma unidade de absorbância a 235 nm por min.

3.2.12. Determinação da Atividade de Pectina-esterase (PE)

A atividade da PE foi determinada pela quantificação do metanol liberado no meio.

A mistura de reação enzimática foi descrita no item 2.2.8 do capítulo 2, e uma unidade de PE foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de metanol por min a 40°C.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Fermentação com *Pichia canadensis* CCT-2636

Utilizando a composição dos meios 1 e 2 em tubos com agar inclinado observou-se que *Pichia canadensis* CCT-2636 não cresceu nestes meios, o que está de acordo com Espinosa *et alii* (1992), que verificaram apenas a produção de pectinases de *Kluyveromyces marxianus* quando glicose e lactose estavam presentes no meio fermentado.

Na fermentação do meio 3 por *Pichia canadensis* CCT-2636, como mostram as Figuras 3.1 e 3.2 e Tabelas B-1 e B-2 do Apêndice B. Observou-se que ocorria fase estacionária de crescimento celular entre 24 e 96 h de fermentação, sem, no entanto, aumentar a atividade das enzimas pectinolíticas produzidas. Cruz-Gurrero *et alii* (1999) verificaram que a máxima biomassa produzida na fermentação com *kluyveromyces marxianus* foi de 2,16 g/L a 35°C. As enzimas pectinolíticas foram produzidas de forma irregular, exceto a endo-PG que teve um aumento de atividade com o tempo, chegando a $18,28 \pm 1,85$ U/mL em 168 h. Schwann *et alii* (1997) observaram que, utilizando leveduras, as PG's eram produzidas na fase estacionária e que PL e PE não eram produzidas.

A exo-PG apresentou duas regiões de produção, uma no início da fermentação e outra após 120 h. A atividade máxima foi $0,15 \pm 0,03$ U/mL a 144 h, Gainvors *et alii* (1994) obtiveram atividade de 1 U/mL de exo-PG em fermentações com *Saccharomyces cerevisiae*, já Cruz-Guerreiro *et alii* (1999) observaram uma atividade de 0,27 μ U/mL com *Kluyveromyces marxianus*. PL foi produzida somente na fase estacionária de crescimento celular com atividade máxima de $0,210 \pm 0,002$ U/mL a 96 h. A produção de PE teve um comportamento oscilatório durante a fermentação, com atividade máxima a 96 h ($0,028 \pm 0,001$ U/mL), Gainvors *et alii* (1994) obtiveram atividade de 0,038 U/mL após 3 dias de fermentação. O pH da fermentação iniciado em 5,0 decresceu, mas após 72 h de fermentação aumentou gradativamente. Na fermentação com *Kluyveromyces*

fragilis, Garcia-Garibay *et alii* (1987) verificaram que o pH decrescia continuamente com o tempo de fermentação.

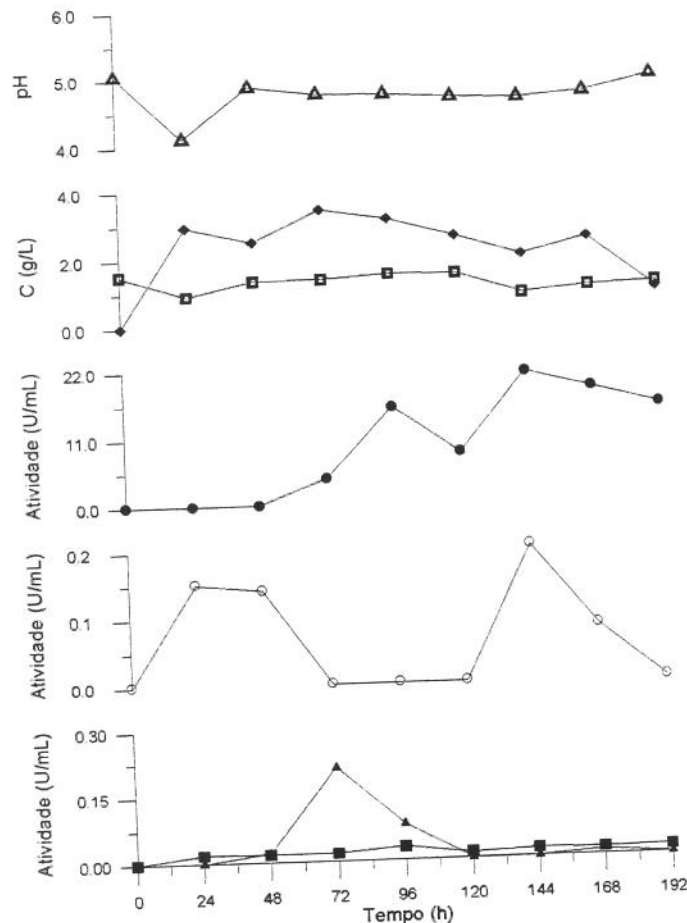


Figura 3.1: Comportamento das atividades enzimáticas (PE-■, PL-▲, exo-PG-O e endo-PG-●), da concentração de massa seca (◆) e do valor do pH (△) na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Pichia canadensis* CCT-2636 a 28°C e pH inicial 5,0 (meio 3).

O consumo de glicose nas primeiras 24 h foi bastante elevado (73,53%), pois sendo de mais fácil assimilação pelo microrganismo foi rapidamente degradado, contribuindo para produção de massa celular. O decréscimo da concentração de proteína foi devido, possivelmente, ao consumo das proteínas contidas no extrato de levedura durante as primeiras 24 h de fermentação, após

este período a concentração de proteínas no meio aumentou devido, provavelmente, à produção de enzimas pécnicas e de outras enzimas e matéria protéica.

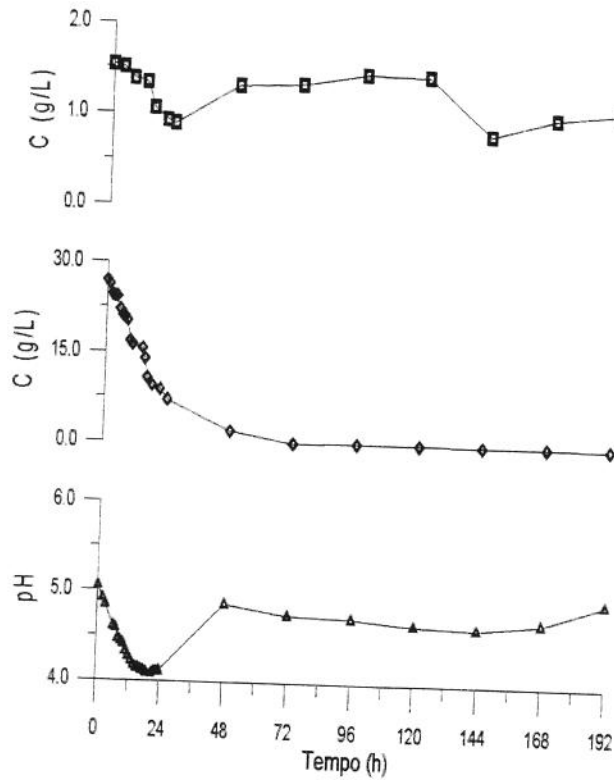


Figura 3.2: Comportamento do valor do pH ($\triangle$) e das concentrações de proteína ($\square$) e glicose ($\diamond$) na fermentação de pectina tipo 8002 por *Pichia canadensis* CCT-26364 a 28°C e pH inicial 5,0 (meio 3).

3.3.2. Fermentações com *Penicillium italicum* IZ-1584

Quando o meio 1 foi fermentado utilizando-se *Penicillium italicum* IZ-1584 (Figura 3.3 e Tabela B-3 do Apêndice B), houve uma nítida fase de crescimento estacionário entre 48 e 120 h de fermentação.

Verificou-se o crescente aumento das atividades enzimáticas com o tempo e o simultâneo consumo de pectina mesmo após o microrganismo ter entrado em fase de morte celular, o que está de acordo com Brumano *et alii* (1993), que utilizando *Penicillium griseoroseum*, verificaram que a atividade de PL aumentava somente após a fase de morte.

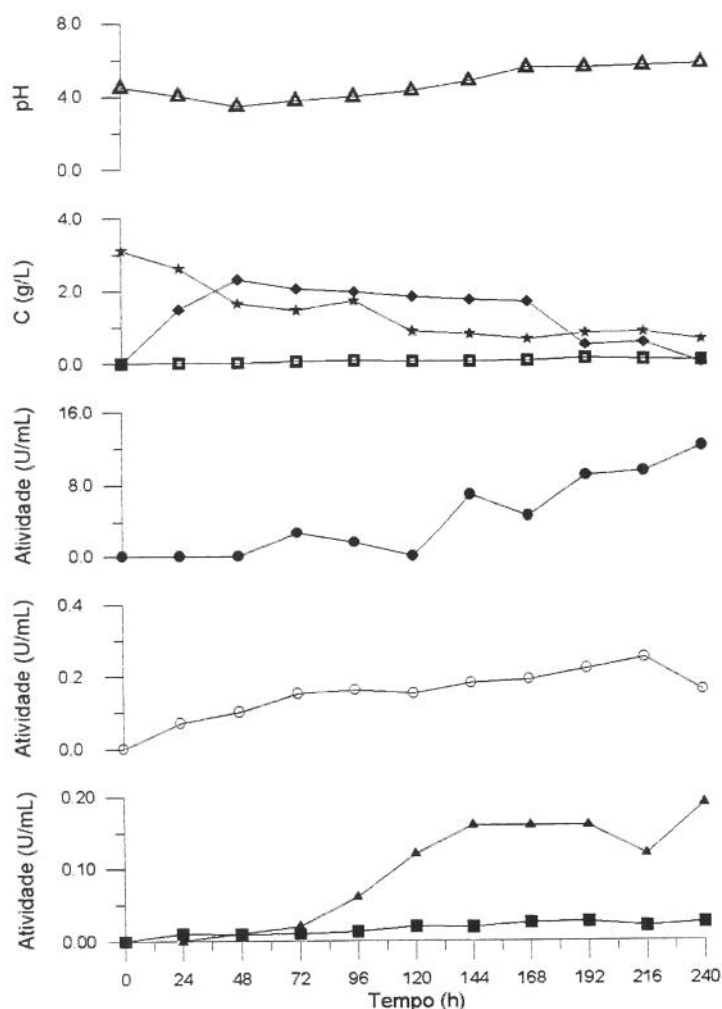


Figura 3.3: Comportamento das atividades enzimáticas (PE-■, PL-▲, exo-PG-○ e endo-PG-●), das concentrações de massa seca (♦), de proteína (□) e de pectina (★) e do valor do pH (△) na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Penicillium italicum* IZ-1584 a 28°C e pH inicial 4,5 (meio 1).

Este aumento de atividade no final da fermentação deve estar relacionado com a tentativa do microrganismo metabolizar o restante de pectina presente no caldo. Foi também ao final da fermentação que se obteve a maior atividade enzimática para PE ($0,026 \pm 0,000$ U/mL a 192h), PL ($0,190 \pm 0,030$ U/mL a 240 h), endo-PG ($12,21 \pm 0,00$ U/mL a 240 h) e exo-PG ($0,25 \pm 0,02$ U/mL a 216 h). Notou-se também que nestes tempos de fermentação a concentração de proteína foi máxima ($0,11 \pm 0,02$ e $0,09 \pm 0,02$ g/L a 216 e 240 h, respectivamente). O pH final da fermentação atingiu valores acima do pH inicial. Alaña *et alii* (1989) observaram o aumento do pH da fermentação somente após 144 h e que atividade máxima de PL ocorria na fase exponencial de crescimento ($31,6 \mu\text{U/mL}$) que esta muito abaixo do valor obtido neste trabalho.

Os resultados da fermentação do meio 2 com *Penicillium italicum* IZ-1584 são mostrados nas Figuras 3.4 e 3.5 e Tabelas B-4 e B-5 do Apêndice B. Estes resultados demonstraram que o microrganismo estendeu sua fase de crescimento exponencial até 96 h com a mais alta produção de PE ocorrendo a 72 h ($0,067 \pm 0,005$ U/mL). Singh *et alii* (1999a) verificaram que a máxima atividade de pectinase de *Bacillus* sp. ocorria na fase estacionária de crescimento celular. Entretanto, no presente trabalho, foi após esta fase que se obteve a maior atividade de exo-PG ($0,59 \pm 0,07$ U/mL a 144 h) e onde PL foi detectada, apesar de ter uma atividade bem baixa ($0,020 \pm 0,000$ U/mL a 120 h).

A pectina foi consumida lentamente durante a fermentação, já que o meio continha açúcares mais fáceis de serem degradados. No caso da proteína a maior concentração entre 24 e 120 h, quando ocorreu a produção simultânea de exo-PG e PE. A sacarose foi consumida gradativamente ao longo das 48 h iniciais de fermentação. Para ser consumida ela foi primeiramente transformada em glicose e frutose pela provável ação de invertase (que foi, possivelmente, produzida no início da fermentação), o que justifica a flutuação no valor da concentração de glicose, como mostra a Figura 3.5. O pH da fermentação apresentou um acréscimo após 144 h, devido ao consumo de substâncias de caráter ácido geradas pela ação da PE.

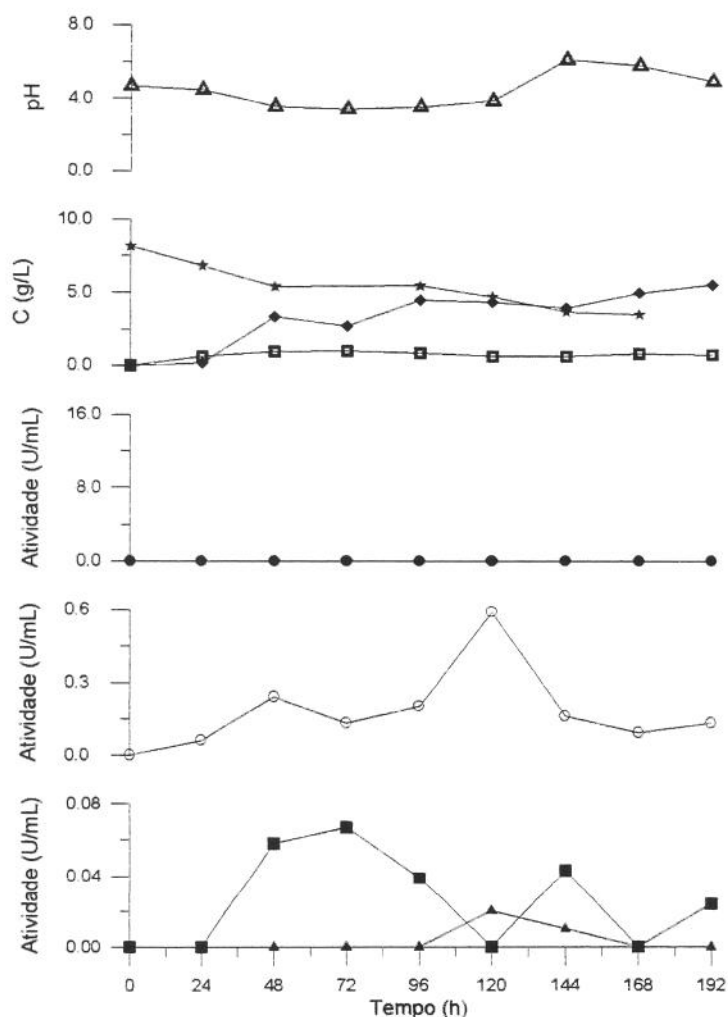


Figura 3.4: Comportamento das atividades enzimáticas (PE-■, PL-▲, exo-PG-○ e endo-PG-●) e das concentrações de massa seca (◆), de proteína (□) e de pectina (☆) e do valor do pH (△) na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Penicillium italicum* IZ-1584 a 28°C e pH inicial 4,5 (meio 2).

Quando o meio 3 foi fermentado por *Penicillium italicum* IZ-1584 (Figuras 3.6 e 3.7 e Tabelas B-6 e B-7 do Apêndice B), verificou-se que ocorria uma fase de crescimento estacionário entre 48 e 192 h de fermentação. As enzimas endo-PG e PE apresentaram atividade máxima na fase de morte celular, $8,37 \pm 0,00$

U/mL e $0,011 \pm 0,001$ U/mL, respectivamente, embora a endo-PG tenha apresentado uma região com atividade elevada na fase de crescimento estacionário. As enzimas exo-PG e PL tiveram máximo de atividade dentro da fase de crescimento estacionário, $0,17 \pm 0,00$ U/mL a 96 h e $0,240 \pm 0,000$ U/mL a 72 h, respectivamente. Manachin *et alii* (1998) obtiveram aumento da atividade de PG na fase de crescimento exponencial com *Aureobasidium pullulans*.

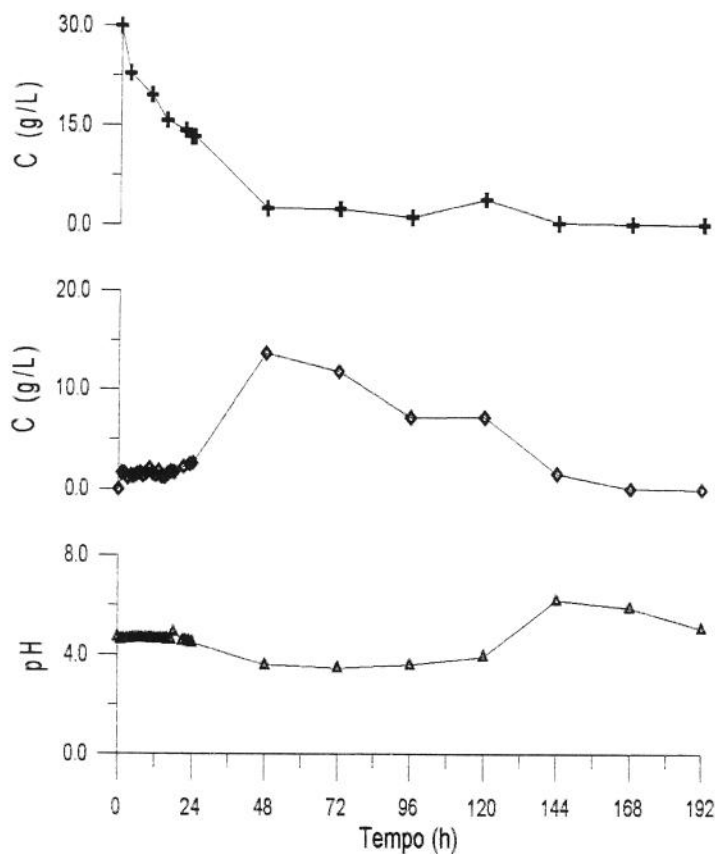


Figura 3.5: Comportamento do valor do pH ($\triangle$) e das concentrações de glicose ($\diamond$) e sacarose (+) na fermentação de pectina tipo 8002 por *Penicillium italicum* IZ-1584 a 28°C e pH inicial 4,5 (meio 2).

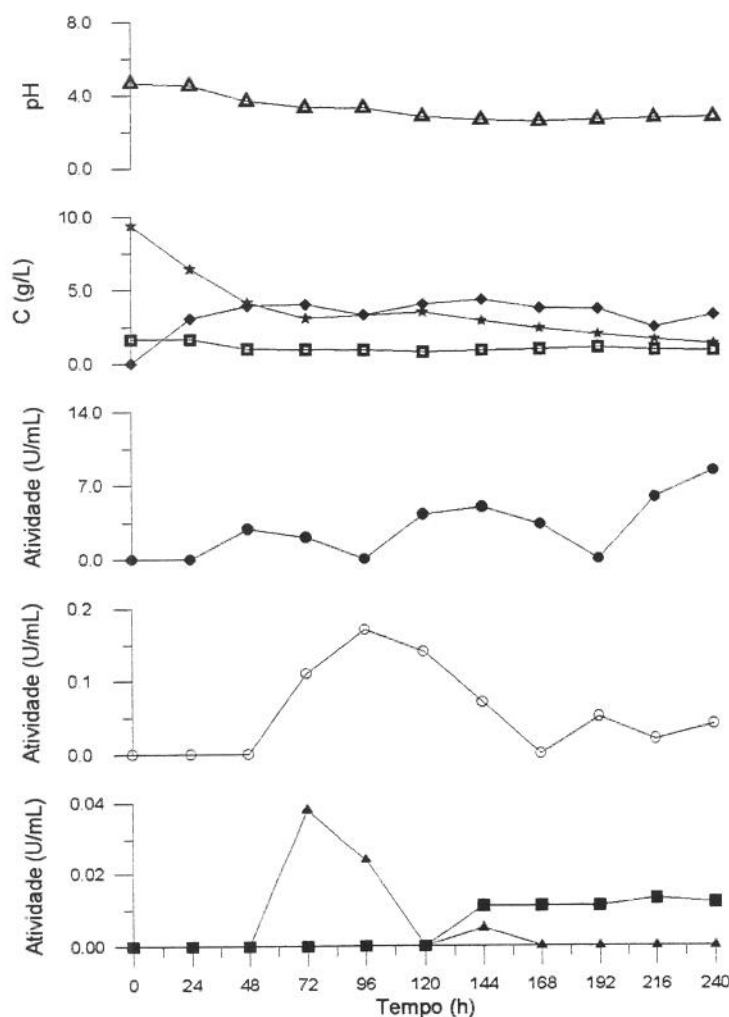


Figura 3.6: Comportamento das atividades enzimáticas (PE-■, PL-▲, exo-PG-○ e endo-PG-●), da concentração de massa seca (◆), de proteína (□) e de pectina (★) e do valor de pH (△) na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Penicillium italicum* IZ-1584 a 28°C e pH inicial 5,0 (meio 3).

A glicose foi praticamente toda consumida até 144 h de fermentação e o pH decresceu gradativamente, como mostra a Figura 3.7. Apesar da produção de enzimas pectinolíticas, a concentração de proteína total diminuiu até 144 h, isto devido ao consumo das substâncias protéicas presente no extrato de levedura que estava presente no meio. O valor do pH da fermentação decresceu com o tempo e

manteve-se constante após 120 h, já a concentração de pectina foi fortemente consumida durante a fermentação.

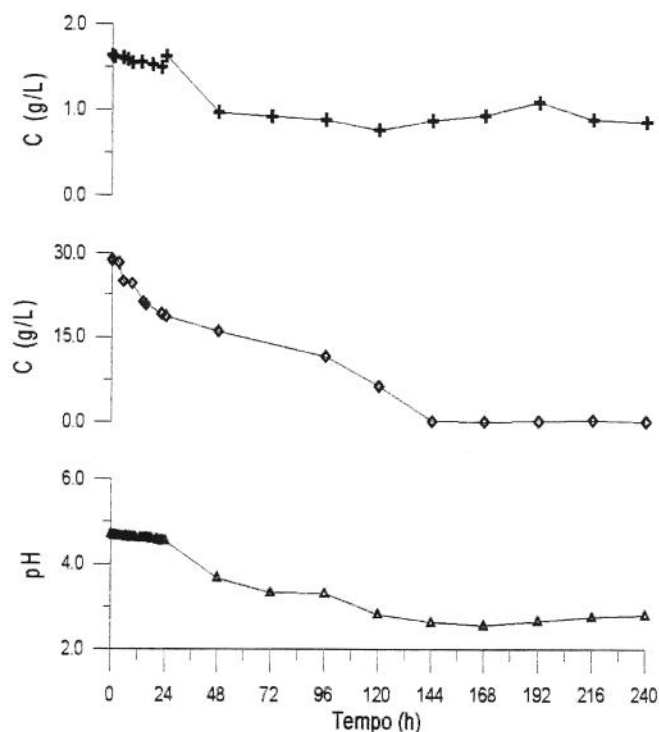


Figura 3.7: Comportamento do valor do pH ($\triangle$) e das concentrações de proteína ($\square$) e glicose ($\diamond$) na fermentação de pectina tipo 8002 por *Penicillium italicum* IZ-1584 a 28°C e pH inicial 4,5 (meio 3).

Comparando-se as fermentações com *Penicillium italicum* IZ-1584 observa-se que o meio contendo glicose (meio 3) foi o mais efetivo para a produção de biomassa e de PE ($0,067 \pm 0,005$ U/mL a 72 h) que o meio contendo apenas pectina como fonte de carbono e indutor ($0,013 \pm 0,005$ U/mL a 192h) e que o meio contendo sacarose ($0,013$ U/mL). Exo-PG foi produzida com maior atividade no meio contendo sacarose, já endo-PG e PL não sofreram repressão pela adição de sacarose e glicose. Chane & Shewale (1995) observaram que o meio contendo apenas pectina como fonte de carbono foi o mais propício a produção de PE.

Os pHs das fermentações aumentaram ao final desta e a concentração de proteína foi menor no meio contendo pectina como fonte de carbono, possivelmente devido a menor produção de outras enzimas neste meio.

3.3.3. Fermentações com *Humicola grisea* CCT-2664

Na fermentação do meio 1 com *Humicola grisea* CCT-2664 verificou-se, pela Figura 3.8 e Tabela B-8 do Apêndice B, que a concentração de pectina decresceu gradativamente durante a fermentação, já a massa seca atingiu a máxima concentração em 72 h (6,36 g/L).

O teor de proteína oscilou durante a fermentação entre $0,01 \pm 0,000$ a $0,23 \pm 0,028$ g/L. O pH decresceu atingindo o menor valor em 48 h de fermentação (2,86), porém, ao final do processo fermentativo, encontrava-se em 4,43.

Esta fermentação apresentou baixa atividade de PL, sendo que sua atividade máxima ocorreu a 24 h ($0,02 \pm 0,000$ U/mL). A exo-PG teve uma produção praticamente constante após 96 h com maior atividade obtida a 192 h ($0,16 \pm 0,01$ U/mL). A endo-PG foi produzida ao final da fermentação, com atividade máxima de $15,87 \pm 3,32$ U/mL a 240 h. Nozaki *et alii* (1997) observaram, nas fermentações com *Alternaria mali*, que atividades elevadas de exo-PG foram obtidas após 216 h de fermentação e que os valores máximos de PE e PL eram 0,009 U/mL e 0,008 U/mL, respectivamente, que são menores que os obtidos com *Humicola grisea* CCT-2664 neste trabalho.

Os resultados da fermentação de meio 2 por *Humicola grisea* CCT-2664 são mostrados nas Figuras 3.9 e 3.10 e Tabelas B-9 e B-10 do Apêndice B.

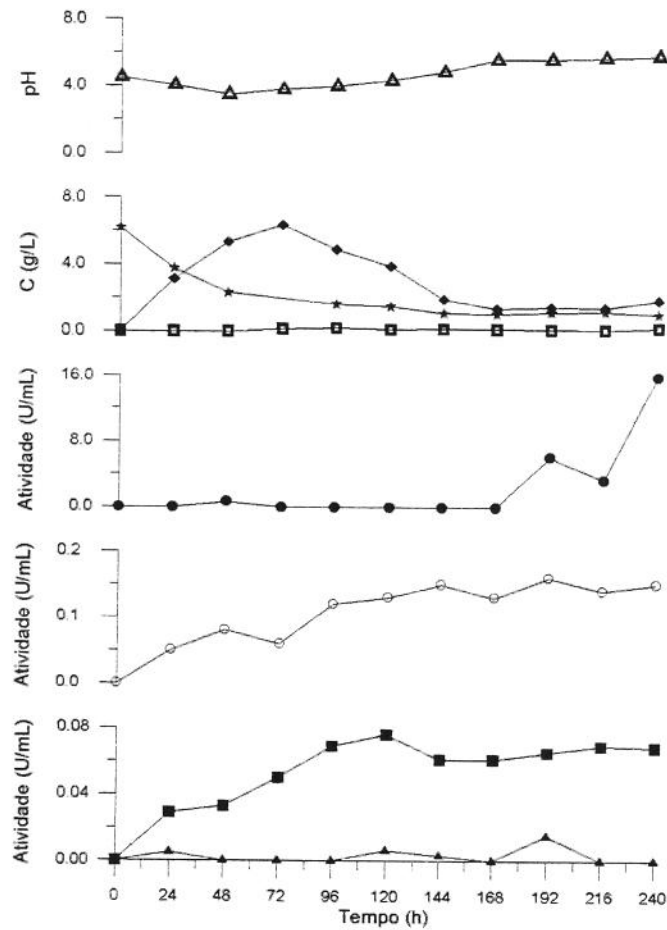


Figura 3.8: Comportamento das atividades enzimáticas (PE-■, PL-▲, exo-PG-○ e endo-PG-●), das concentrações de massa seca (◆), de proteína (□) e de pectina (★) e do valor do pH (Δ) na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Humicola grisea* CCT-2664 a 28°C e pH inicial 4,5 (meio 1).

A concentração de pectina manteve-se praticamente inalterada até 72 h quando o consumo de sacarose foi muito elevado. Após este intervalo de tempo, a pectina passou a ser consumida mais rapidamente. A concentração de proteína aumentou com o tempo devido à produção de enzimas e massa protéica geradas na fermentação.

A PE apresentou produção constante entre 48 e 144 h de fermentação com valor de $0,030 \text{ U/mL}$, enquanto PL e endo-PG não foram detectadas. Exo-PG foi produzida irregularmente e teve atividade máxima em 240 h ($0,11 \pm 0,03 \text{ U/mL}$). Fonseca *et alii* (1995) somente detectaram máximos de atividade de exo-PG após 48 h de fermentação. Kotzekidou (1991) não conseguiu produzir PE e PL nas fermentações com *Byssoschlamys fulva* o que demonstra que cada microrganismo tem características próprias na produção de determinado tipo de pectinase.

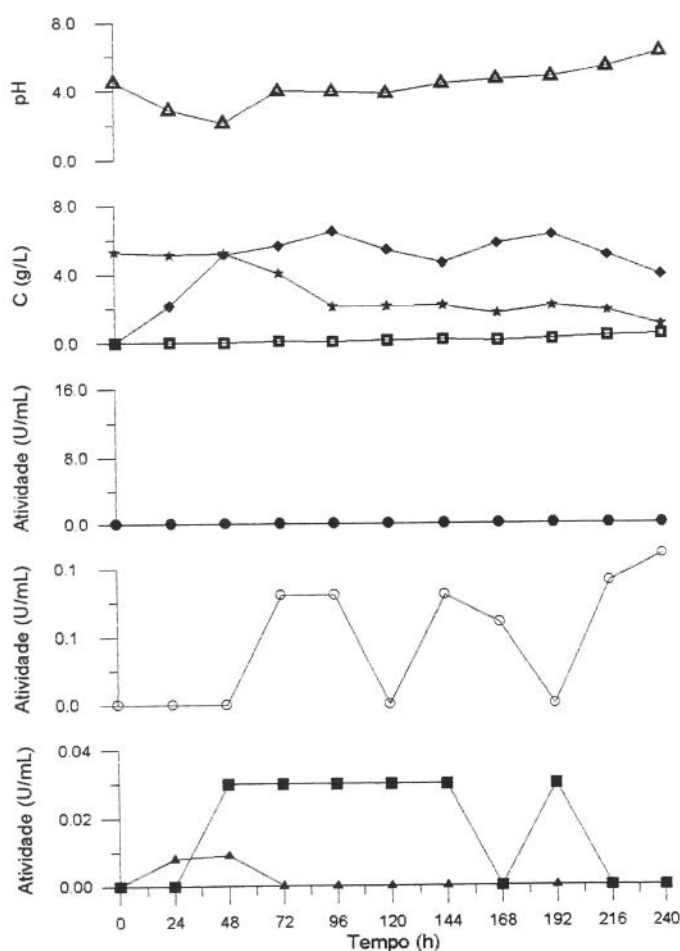


Figura 3.9: Comportamento das atividades enzimáticas (PE-■, PL-▲, exo-PG-○ e endo-PG-●) e das concentrações de massa seca (◆), de proteína (□) e de pectina (★) e do valor do pH (Δ) na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Humicola grisea* CCT-2664 a 28°C e pH inicial 4,5 (meio 2).

O consumo de sacarose foi contínuo e gradativo. Após 3 h houve uma redução de 60% da sua concentração inicial. Novamente verificou-se uma variação da concentração de glicose, devido à liberação desta pela quebra da sacarose e subsequente consumo da mesma, como mostra a Figura 3.10.

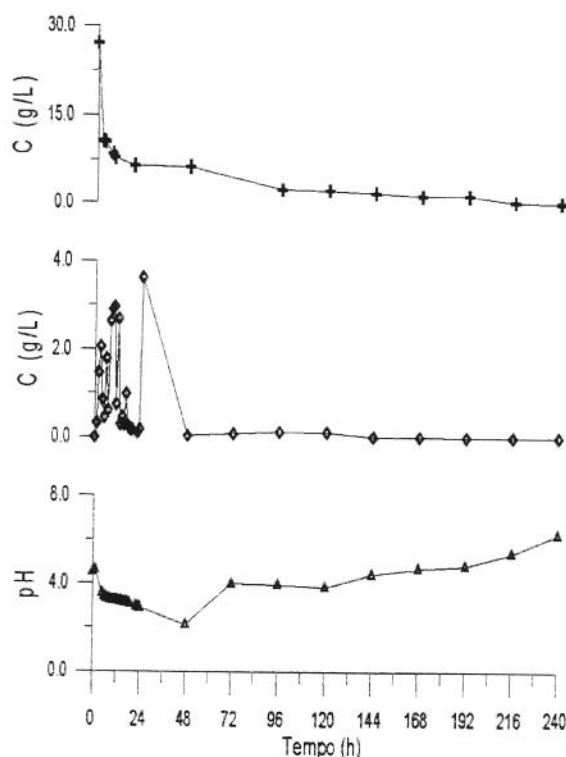


Figura 3.10: Comportamento do valor do pH ($\triangle$) e das concentrações de glicose ($\diamond$) e sacarose (+) na fermentação de pectina tipo 8002 por *Humicola grisea* CCT-2664 a 28°C e pH inicial 4,5 (meio 2).

Os resultados obtidos na fermentação do meio 3 por *Humicola grisea* CCT-2664 são apresentados nas Figuras 3.11 e 3.12 e Tabelas B-11 e B-12 do Apêndice B. Verificou-se que entre 96 e 216 h o microrganismo estava em fase de crescimento estacionário. A concentração de proteína diminuiu com o tempo, indicando que houve consumo do nitrogênio do extrato de levedura, uma vez que este foi determinado como proteína. Ao final da fermentação a concentração de proteína sofreu flutuação provavelmente devido à produção de outras enzimas (que não são determinadas) e compostos protéicos.

Para a PE, a fermentação apresentou duas etapas de produção, uma no início da fermentação e outra com atividade estável após 168 h com maior atividade ocorrendo a 240 h ($0,043 \pm 0,000$ U/mL). Endo-PG foi detectada somente após 120 h de fermentação com aumento contínuo de atividade até o final da fermentação ($30,67 \pm 0,00$ U/mL), Ros *et alii* (1991) verificaram a atividade máxima de endo-PG de *Rhizopus nigra* igual a 18 U/mL que corresponde aproximadamente à metade da atividade encontrada neste trabalho.

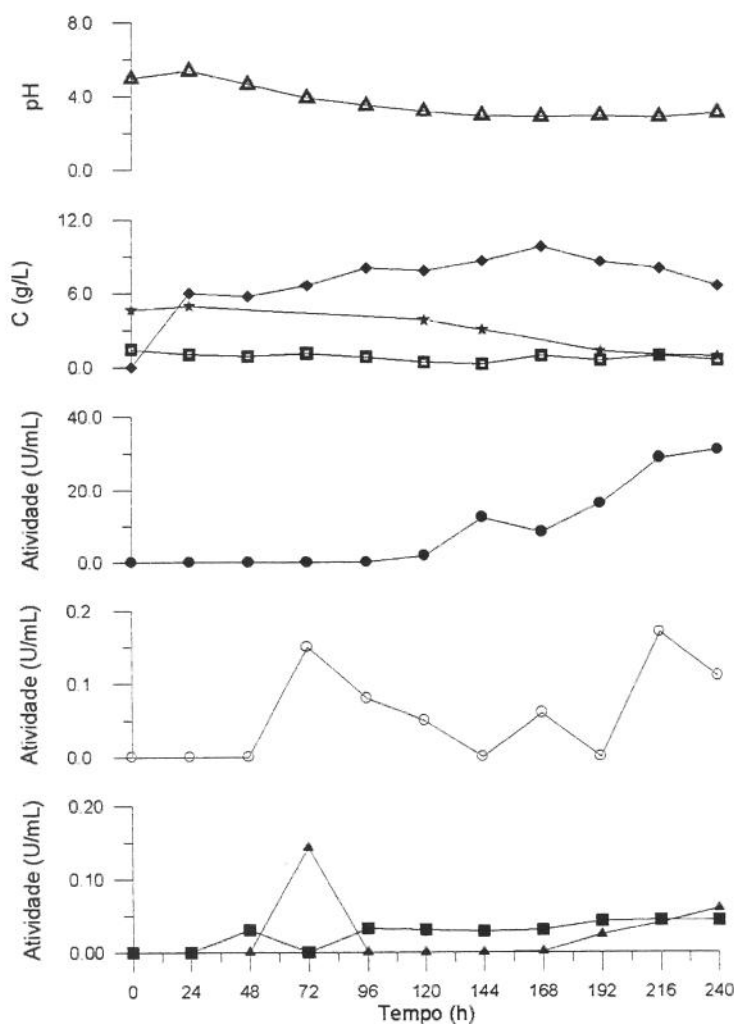


Figura 3.11: Comportamento das atividades enzimáticas (PE-■, PL-▲, exo-PG-O e endo-PG-●), da concentração de massa seca (◆), de proteína (□) e de pectina (★) e do valor do pH (Δ) na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Humicola grisea* CCT-2664 a 28°C e pH inicial 4,5 (meio 3).

No caso da PL obteve-se um valor elevado no início da fermentação ($0,140 \pm 0,002$ U/mL), mas produção contínua só foi verificada apenas a partir de 192 h. Já a exo-PG também teve duas regiões de produção com maior atividade de $0,15 \pm 0,07$ U/mL a 72 h. Comparando-se os resultados das atividades de exo-PG de *Humicola grisea* CCT-2664 com os obtidos por Baracat *et al.* (1989), verificou-se que o menor valor de atividade encontrado ($0,05$ U/mL) foi 29 vezes maior que o obtido pelos autores, que utilizaram *Humicola* sp. ($0,017$ U/mL).

A pectina foi consumida rapidamente somente após 168 h quando não era detectada a presença de glicose. Durante o consumo de pectina na ausência de glicose verificou-se a maior produção enzimática.

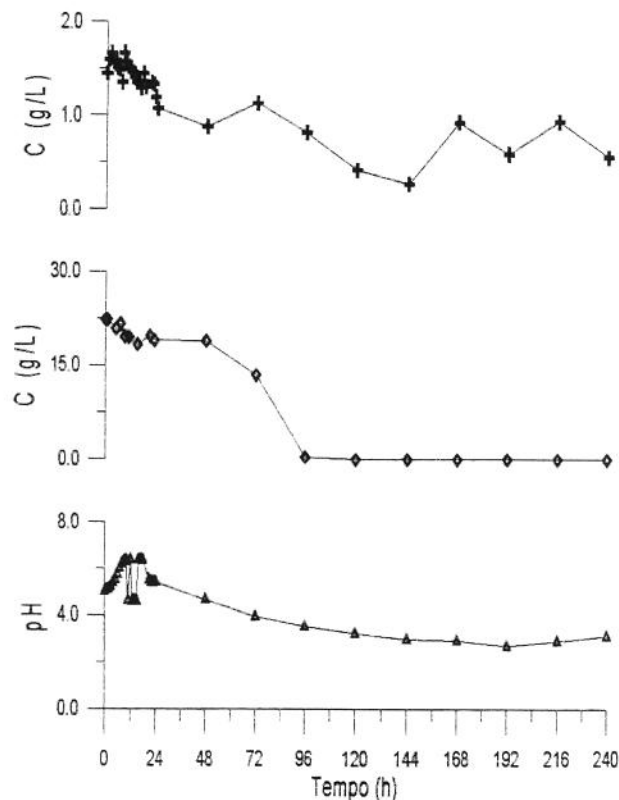


Figura 3.12: Comportamento do valor do pH ($\triangle$) e das concentrações de proteína ($\square$) e glicose ($\diamond$) na fermentação de pectina tipo 8002 por *Humicola grisea* CCT-2664 a 28°C e pH inicial 4,5 (meio 3).

Nos meios de cultura contendo glicose (meio 3) observou-se a maior produção das PG. A PE foi reprimida pela presença de glicose e sacarose sendo produzida com maior atividade no meio 1 (contendo apenas pectinas) diferentemente da PL que teve maior produção em meio contendo glicose. Esta maior atividade da enzima na presença de glicose foi verificada também por Alaña *et alii* (1989) nas fermentações com *Aspergillus niger* em um fator de 2 vezes. Tachet & Fevre (1996) atribuem o efeito de repressão de glicose na produção de algumas pectinases ao decréscimo de secreção de proteínas. O meio 3 continha extrato de levedura o que fez a concentração de proteína ser mais elevada e declinar com o tempo devido ao consumo das proteínas do extrato de levedura na produção das enzimas necessárias ao crescimento do microrganismo.

3.3.4. Fermentações com *Aspergillus niger* NRRL-3122

Nas fermentações do meio 1 utilizando *Aspergillus niger* NRRL-3122, observou-se, através da Figura 3.13 e Tabela B-13 do Apêndice B, que houve um aumento do pH do meio após 96 h, atingindo valores acima do inicial (4,5) ao final da fermentação (5,73). A maior concentração de massa seca ocorreu a 144 h (3,96 g/L), com crescimento estacionário ocorrendo entre 24 e 168 h.

A pectina foi consumida lentamente até 96 h, quando houve uma redução acentuada da sua concentração. Schmidt *et alii* (1995) observaram que o consumo de pectina no meio fermentado era contínuo e passava de 20,9 g/L no início da fermentação para 0,8 g/L ao final da mesma. A concentração de proteína foi máxima a 72 h ($0,45 \pm 0,026$ g/L). As enzimas apresentaram maior atividade na fase de morte celular. PL teve $0,080 \pm 0,005$ U/mL (168 e 192 h), exo-PG $0,17 \pm 0,00$ U/mL (216 h) e endo-PG $24,89 \pm 3,36$ U/mL (192 h), já PE teve maior atividade na fase de crescimento estacionário igual a $0,044 \pm 0,001$ U/mL (144 e 168 h).

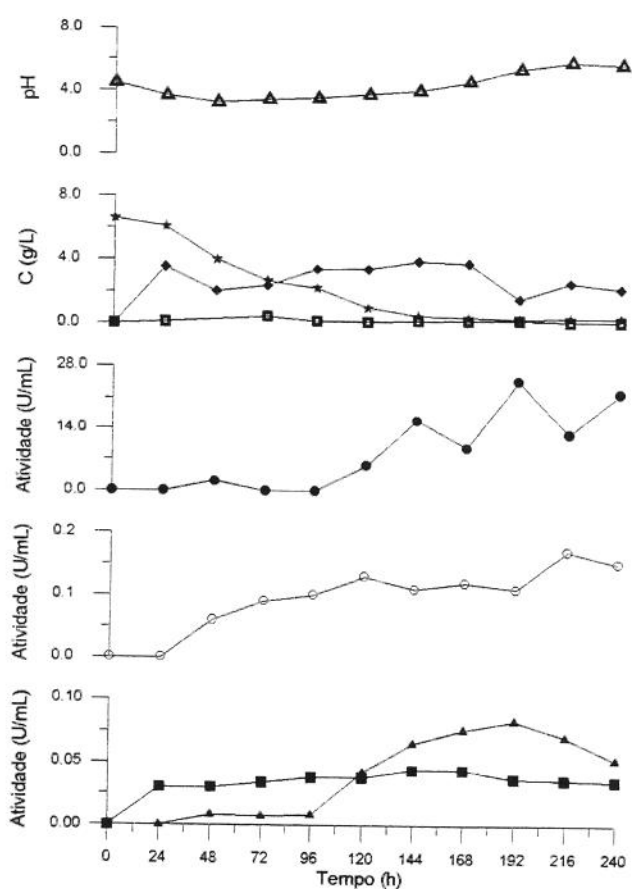


Figura 3.13: Comportamento das atividades enzimáticas (PE-■, PL-▲, exo-PG-O e endo-PG-●), das concentrações de massa seca (◆), de proteína (□) e de pectina (★) e do valor do pH (△) na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Aspergillus niger* NRRL-3122 a 28°C e pH inicial 4,5 (meio 1).

Na fermentação de meio 2 por *Aspergillus niger* NRRL-3122 (Figuras 3.14 e 3.15 e Tabelas B-14 e B-15 do Apêndice B) não se pôde estabelecer as fases de crescimento celular, já que o microrganismo cresceu descontinuamente, apresentando uma concentração mais alta a 120 h de fermentação (18,69 g/L). A concentração de pectina diminuiu lentamente e a de proteína comportou-se como nas outras fermentações utilizando meio 2. Friedrich *et alii* (1992) não observaram correlação entre a concentração de sacarose no meio e a produção de proteínas.

Praticamente não houve produção de PE, que foi somente detectada a 144 h ($0,030 \pm 0,000$ U/mL), possivelmente isto ocorre devido à ação de proteases que são formadas durante a fermentação. Sapunova *et alii* (1997) observaram atividades elevadas de protease ($25 \pm 0,9$ U/mL) durante a produção de pectinases ($1,03 \pm 0,05$ U/mL) com *Aspergillus aliceus*.

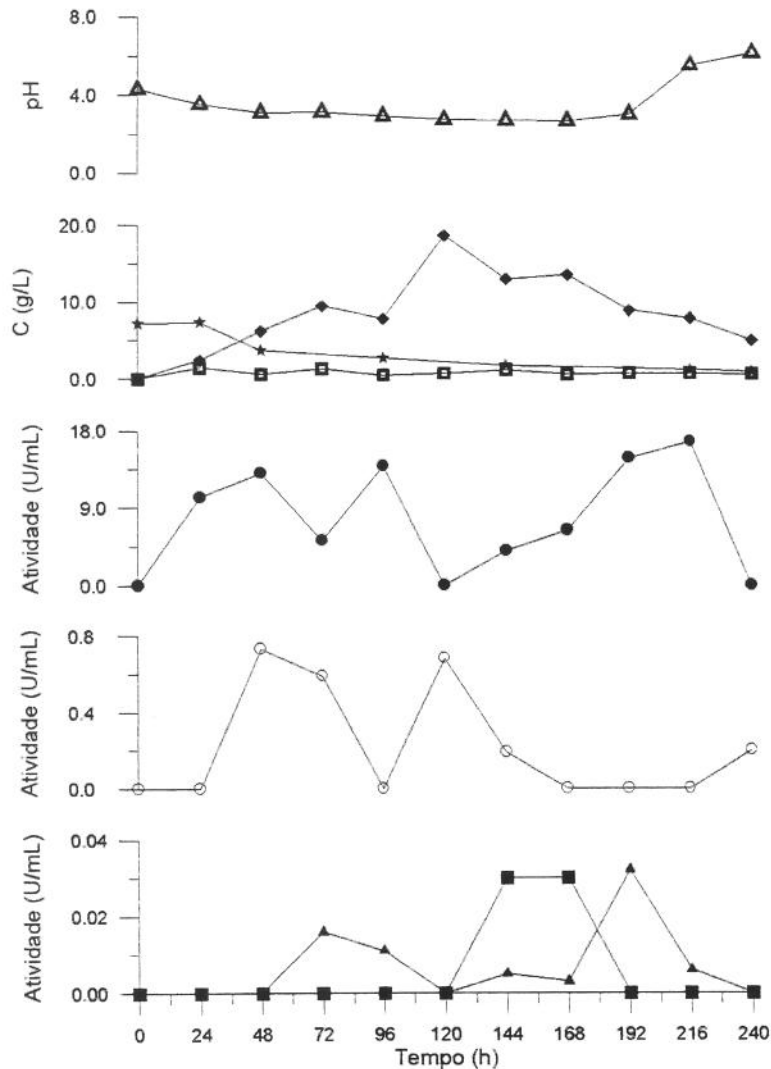


Figura 3.14: Comportamento das atividades enzimáticas (PE-■, PL-▲, exo-PG-O e endo-PG-●) e das concentrações de massa seca (◆), de proteína (□) e de pectina (★) e do valor do pH (Δ) na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Aspergillus niger* NRRL-3122 a 28°C e pH inicial 4,5 (meio 2).

PL e endo-PG foram produzidas de forma irregular, com máxima atividade sendo detectada a 192 h ($0,030 \pm 0,005$ U/mL e $16,71 \pm 1,63$ U/mL, respectivamente), Friedrich *et alii* (1992) obtiveram 20 U/mL de atividade de endo-PG em meio contendo 15% de sacarose, que é 5 vezes maior do que aquela utilizada neste trabalho. Diferentemente a exo-PG apresentou maior atividade no início da fermentação ($1,14 \pm 0,118$ U/mL a 48 h). O pH da fermentação diminuiu com o tempo, e a sacarose presente foi consumida em 24 h.

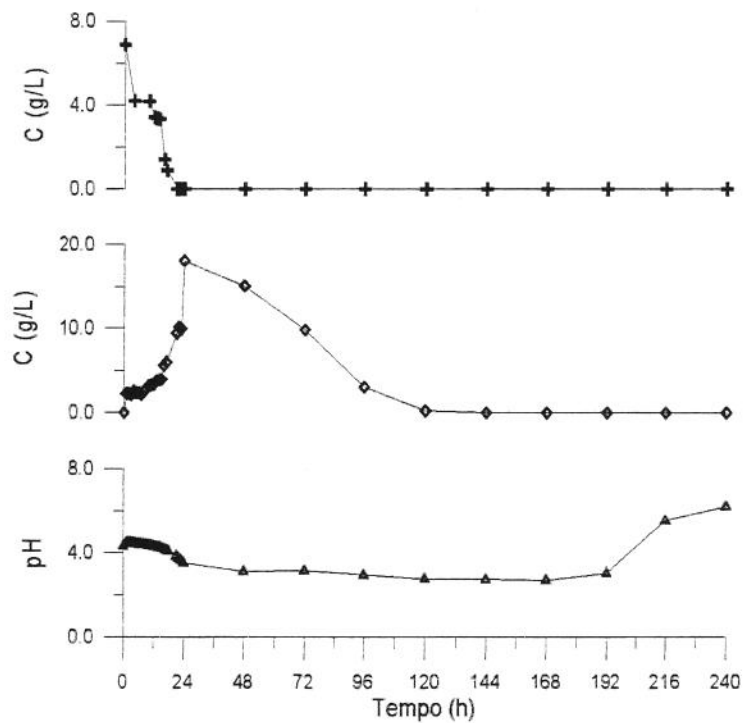


Figura 3.15: Comportamento do valor do pH (△) e das concentrações de glicose (◇) e sacarose (+) na fermentação de pectina tipo 8002 por *Aspergillus niger* NRRL-3122 a 28°C e pH inicial 4,5 (meio 2).

Observando-se os resultados da fermentação do meio 3 por *Aspergillus niger* NRRL-3122, apresentados nas Figuras 3.16 e 3.17 e Tabelas B-16 e B-17 do Apêndice B, verificou-se que a massa seca aumentava gradativamente com o tempo de fermentação até atingir 12,12 g/L ao final da mesma, enquanto o

consumo de pectina foi de 76,83% nas primeiras 24 h de fermentação. A concentração de proteína variou com o tempo, sendo máxima a 72 h ($1,17 \pm 0,06$ g/L).

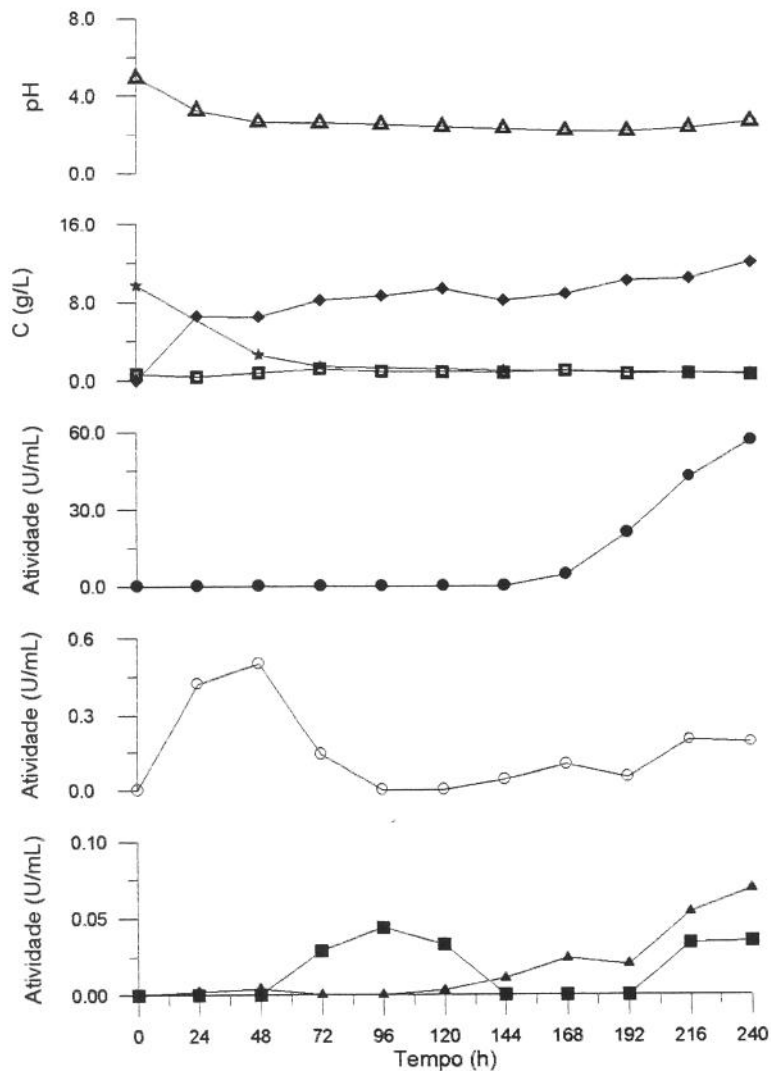


Figura 3.16: Comportamento das atividades enzimáticas (PE-■, PL-▲, exo-PG-○ e endo-PG-●), da concentração de massa seca (◆), de proteína (□) e de pectina (★) e do valor do pH (△) na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Aspergillus niger* NRRL-3122 a 28°C e pH inicial 4,5 (meio 3).

A maior atividade de PE ($0,044 \pm 0,005$ U/mL) ocorreu a 96 h. PL e endo-PG começaram a ser produzidas a partir de 240 e 168 h, respectivamente, com

atividades máximas ao final da fermentação $0,02 \pm 0,003$ U/mL e $53,39 \pm 3,44$ U/mL, respectivamente.

O pH apresentou, novamente, um decréscimo atingindo um valor de 2,74 ao final da fermentação, enquanto que a glicose foi integralmente consumida em 96 h, como mostra a Figura 3.17.

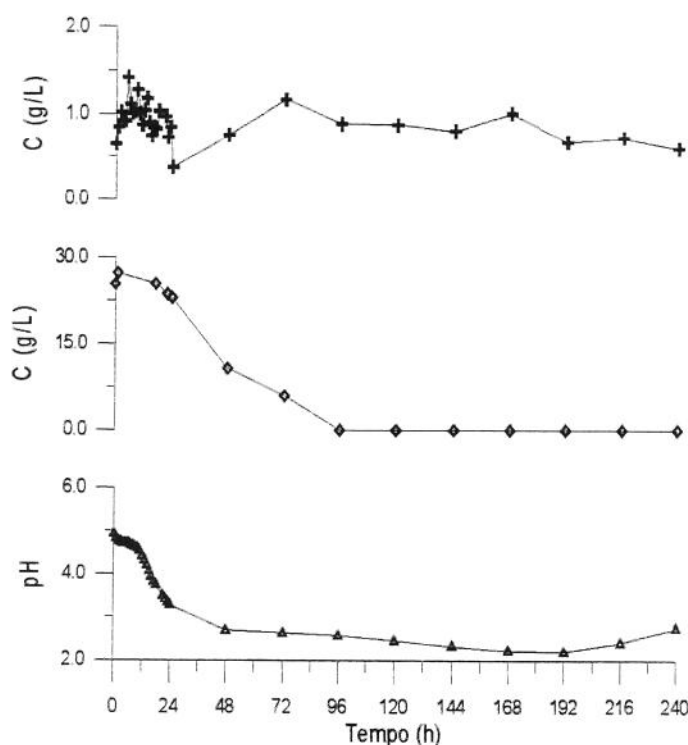


Figura 3.17: Comportamento do valor do pH (Δ) e das concentrações de proteína ($\square$) e glicose ($\diamond$) na fermentação de pectina tipo 8002 por *Aspergillus niger* NRRL-3122 a 28°C e pH inicial 4,5 (meio 1).

Nas fermentações com *Aspergillus niger* NRRL-3122, observou-se que nos meios que continham açúcares as concentrações de massa seca foram mais altas. Friedrich *et al.* (1992) observaram que, nos meios contendo pectina (2%) e sacarose (0,5%), a produção de massa seca foi mais elevada que a dos meios que continham apenas sacarose.

A produção de PE foi mais acentuada no meio contendo pectina como fonte de carbono (1,41 U/mL a 144 h), o que está de acordo com Friedrich *et alii* (1992), que obtiveram atividade enzimática máxima no meio contendo somente pectina.

Novamente foi notado que os açúcares são facilmente utilizados pelo microrganismo na produção de biomassa o que pode ser observado pelos maiores valores em meios contendo glicose (12,12 g/L a 240 h) e sacarose (18,69 g/L a 120 h) que no meio contendo apenas pectina (3,96 g/L).

As PG foram produzidas com maior atividade na presença de glicose o que não foi verificado para PE e PL. Pereira *et alii* (1993) não observaram efeito positivo da presença de glicose na produção de PG com *Aspergillus niger*, o que demonstra que mesmo microrganismos iguais são influenciados pelas condições do meio na produção enzimática.

3.4. Conclusões Parciais

Aspergillus niger apresenta a melhor produção de PG, que outros microrganismos utilizados. Já PE e PL apresentam maior atividade nas fermentações com *Humicola grisea* e *Penicillium itálico*.

Os fungos são mais efetivos na produção de pectinases, pois os valores obtidos com *Picchia canadensis* são sempre abaixo dos maiores obtidos com os fungos.

O melhor meio de produção das enzimas pectinolíticas varia para cada microrganismo. Nas fermentações com *Aspergillus niger* repressões de glicose e sacarose são verificadas na produção de PE e PL, mas aumenta o valor das PG's.

Glicose estimula a produção das enzimas pectinolíticas de *Humicola grisea*, exceto para PE que tem maior atividade em maior contendo apenas pectina.

Sacarose e glicose aumentam a atividade de PE e exo-PG, respectivamente, de *Penicillium itálicum*

Escolheu-se o meio 3 (composto de pectina e glicose) para a produção das enzimas pectinolíticas que serão purificadas através do processo de separação líquido-líquido em sistema aquoso bifásico, devido à alta atividade das enzimas poligalacturonases (mais importante na indústria de alimentos) e o *Aspergillus niger* como microrganismo.

CAPÍTULO 4

PARTIÇÃO DAS ENZIMAS PECTINOLÍTICAS COMERCIAIS EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS

4.1. INTRODUÇÃO

Os processos de purificação de biomoléculas são formados por várias etapas e por diferentes tipos de técnicas, que para serem empregados dependem do material a ser purificado. Estas etapas são as que elevam o custo do processo e conseqüentemente do produto a ser purificado.

As enzimas atuam como catalisadores bioespecíficos e são produzidas geralmente por fermentações, que produzem, além do produto desejado, uma série de subprodutos. Por esta razão, a aplicação de diferentes técnicas de purificação são necessárias na obtenção de enzimas.

Várias seqüências são empregadas, mas comumente utiliza-se filtração seguida de precipitação, diálise e cromatografia. A cromatografia é o procedimento que propicia os maiores valores de fator de purificação, entretanto, para a maioria dos casos, apresenta baixo rendimento e custo elevado.

O sistema aquoso bifásico vem sendo bastante utilizado na pré-purificação de proteínas e enzimas. O sistema pode ser formado por polímero/polímero ou polímero/sais e tem como principal característica a alta porcentagem de água nas fases. No processo, as enzimas e as proteínas totais separam-se entre as fases, contudo, deseja-se que estas se concentrem em fases opostas. O sistema aquoso bifásico apresenta diversas vantagens de uso. Entre elas destaca-se a redução do número de etapas do processamento e a facilidade de ampliação de escala.

No presente trabalho, teve-se como objetivos determinar os coeficientes de partição das enzimas pectinolíticas, (PE, PL, exo-PG e endo-PG) contidas em um complexo multienzimático comercial, em sistemas PEG/fosfato de potássio, PEG/citrato de sódio e PEG/maltodextrina e verificar o efeito da massa molecular do PEG e da adição de NaCl nos sistemas.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Enzimas Pectinolíticas

Foram utilizadas duas pectinases comerciais, Pectinex-3XL e Citrozym Cloudy 100L, obtidas da Novo Nordisk Ferment LTDA. A utilização de duas enzimas comerciais é justificada pela perda de atividade da Pectinex-3XL após 2 anos de uso e de não ter sido possível obtê-la novamente.

As enzimas apresentaram basicamente as mesmas características. São um concentrado de enzimas pectinolíticas produzidas por *Aspergillus niger*, contendo principalmente, pectinases, hemicelulase e celulase. A Pectinex-3XL e a Citrozym Cloudy 100 L possuíam atividades de 3000 e 5000 FDU (ferment depectinization unit) a 55°C, respectivamente (dados do fabricante). Nestas enzimas comerciais estão presentes endo-PG, exo-PG, PL e PE, entretanto, não foi possível detectar atividade de PE na Citrozym Cloudy 100L, pelo método empregado neste trabalho.

Estas enzimas são destinadas à indústria de produtos cítricos e apresentam cor parda, odor próprio de produtos fermentados, pH ótimo em torno de 4,5 e temperatura ótima entre 50-55°C. Quando armazenadas entre 5-10°C têm tempo de vida útil de no mínimo 1 ano.

4.2.2. Sistema Aquoso Bifásico

Os sistemas utilizados foram PEG/fosfato de potássio, PEG/citrato de sódio e PEG/maltodextrina formados com PEG's de massas moleculares 400, 600, 1000, 1450, 3350, 8000 e 10000 e enzima comercial, com e sem adição de cloreto de sódio, a pH 7,0 e temperatura de 4°C, para evitar condições desnaturantes.

Estes sistemas foram preparados a partir de soluções estoques de PEG (50% p/v), maltodextrina (50%, p/v), citrato de sódio (50%, p/v), cloreto de sódio (30%, p/v) e fosfato de potássio (50%, p/v). A solução de fosfato de potássio foi constituída de uma mistura de KH_2PO_4 e K_2HPO_4 na razão de 1,087 (p/p), o que

gerou uma solução a pH 7,0. As soluções foram preparadas no mesmo dia de montagem dos sistemas. A solução de citrato foi ajustada a pH 7 com ácido cítrico e a de maltodextrina, com tampão fosfato.

Alíquotas das soluções estoque de PEG, fosfato (ou citrato ou maltodextrina), cloreto de sódio (nos ensaios com adição deste sal), enzima e água foram apropriadamente misturadas, de modo a se obter um sistema bifásico de concentração enzimática 10 vezes menor que a enzima concentrada, PEG a 20%, segundo formador do sistema 15%, e para algumas extrações NaCl a 6%.

As misturas foram agitadas em vórtice por 2 min, seguindo-se da centrifugação dos tubos a 2900 g por 10 min, com a finalidade de acelerar a separação de fases. O sistema foi mantido em repouso a 4°C em banho termostático por toda noite (mínimo de 18 h) para que entrasse em equilíbrio. Após esse tratamento, as fases tornaram-se claras e transparentes e a interface entre elas bem nítida.

As fases de topo foram separadas com o auxílio de uma pipeta e as de fundo com uma seringa e agulhas longas, tomando-se o cuidado de não perturbar o equilíbrio. O volume de cada fase foi medido em provetas graduadas.

Alíquotas das fases de topo e fundo foram analisadas quanto às atividades enzimáticas (endo e exo-PG, PL e PE) e proteína total. Determinou-se o valor do coeficiente de partição da enzima e da proteína total, da recuperação e do fator de purificação de acordo com as equações abaixo.

$$K_p = \frac{C_{P, \text{topo}}}{C_{P, \text{fundo}}} \quad 4.1$$

$$K_E = \frac{AE_{\text{topo}}}{AE_{\text{fundo}}} \quad 4.2$$

$$R_{\text{topo}} = \frac{100}{1 + \frac{1}{R_v \cdot K_E \text{ ou } P}} \quad 4.3$$

$$R_{\text{fundo}} = \frac{100}{1 + R_v \cdot K_{E \text{ ou } P}} \quad 4.4$$

$$R_v = \frac{V_{\text{topo}}}{V_{\text{fundo}}} \quad 4.5$$

$$SA_{\text{topo ou fundo}} = \frac{AE_{\text{topo ou fundo}}}{C_{P,\text{topo ou } P,\text{fundo}}} \quad 4.6$$

$$FP_{\text{topo ou fundo}} = \frac{SA_{\text{topo ou fundo}}}{(SA_{\text{topo}} + SA_{\text{fundo}})} \quad 4.7$$

onde, K_p e $K_E \Rightarrow$ Coeficiente de partição da proteína e da enzima, respectivamente.

$C_{P,\text{topo}}$ e $C_{P,\text{fundo}} \Rightarrow$ Concentração de proteína total na fase de topo e fundo (mg/mL), respectivamente.

AE_{topo} e $AE_{\text{fundo}} \Rightarrow$ Atividade enzimática na fase de topo e fundo (U/mL), respectivamente.

R_{topo} e $R_{\text{fundo}} \Rightarrow$ Recuperação da proteína ou enzima na fase de topo e de fundo (%), respectivamente.

$R_v \Rightarrow$ Razão volumétrica das fases.

V_{topo} e $V_{\text{fundo}} \Rightarrow$ Volume da fase de topo e fundo (mL), respectivamente.

SA_{topo} e $SA_{\text{fundo}} \Rightarrow$ Atividade enzimática específica no topo e fundo (U/mg de proteína na fase), respectivamente.

FP_{topo} e $FP_{\text{fundo}} \Rightarrow$ Fator de purificação na fase de topo e de fundo, respectivamente.

Estes parâmetros assim calculados, utilizam como referência, para a concentração de proteína e atividade enzimática no sistema formador das fases, a soma destas nas fases de topo e de fundo, pois não é possível tomar uma

alíquota da mistura sem que esta já esteja na forma bifásica. Este cálculo será aqui denominado de forma tradicional de determinação de recuperações e fatores de purificação. Como forma alternativa foi utilizado como referência inicial uma solução aquosa da enzima na mesma diluição do sistema total. Neste caso, as recuperações foram calculadas pelas equações abaixo:

$$R_{\text{topo}} = \frac{AE_{\text{topo}} \cdot V_{\text{topo}}}{AE_{\text{Referência}} \cdot V_{\text{sistema}}} \cdot 100 \quad 4.8$$

$$R_{\text{fundo}} = \frac{AE_{\text{fundo}} \cdot V_{\text{fundo}}}{AE_{\text{Referência}} \cdot V_{\text{sistema}}} \cdot 100 \quad 4.9$$

$$FP_{\text{topo ou fundo}} = \frac{SA_{\text{topo ou fundo}}}{SA_{\text{referência}}} \quad 4.10$$

onde: $AE_{\text{referência}} \Rightarrow$ Atividade enzimática da solução de referência (U/mL).

$AS_{\text{referência}} \Rightarrow$ Atividade enzimática específica da solução de referência (U).

4.2.3. Determinação da Concentração de Proteínas Totais

As proteínas totais foram determinadas pelo método de Bradford (1976), utilizando Albumina Bovina como padrão.

4.2.4. Determinação da Concentração dos Açúcares Redutores

A concentração de açúcares redutores foi determinada pelo método de Somogy (1952), utilizando ácido galacturônico como padrão.

4.2.5. Determinação da Concentração de Metanol

A concentração de metanol foi determinada pelo método de Wood & Siddiqui (1971).

4.2.6. Determinação da Atividade de Pectina-esterase (PE)

A atividade da PE foi determinada pela quantificação do metanol liberado no meio, de acordo com Wood & Siddiqui (1971). Uma unidade de PE foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de metanol por min a 40°C.

4.2.7. Determinação da Atividade de Pectina-liase (PL)

A atividade de PL foi determinada pelo monitoramento do aumento da absorbância a 235 nm, devido à produção de compostos 4,5 insaturados (Albersheim & Killias, 1962; Alaña *et alii*, 1989). Uma unidade de PL foi definida como a quantidade de enzima que produz um aumento de uma unidade de absorbância a 235 nm por min.

4.2.8. Determinação da Atividade de Poligactoronase (PG)

As atividades de endo e exo-PG foram determinadas de acordo com Kotzekidou (1991); Pereira *et alii* (1993). Uma unidade de endo-PG foi definida como a quantidade de enzima que reduz 1% da viscosidade da solução por minuto. E uma unidade de exo-PG foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido galacturônico por min a 37°C e pH 4,5.

Em todas as determinações das atividades enzimáticas, foram utilizados brancos formados com a mesma composição da reação enzimática, mas com a enzima inativada por incubação em banho maria a 100°C por 10 min. Este procedimento teve como objetivo eliminar as influências dos componentes do sistema e determinar apenas o efeito da ação enzimática sobre o substrato.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Ensaios de Extração

Com o objetivo de estudar o processo de separação de enzimas pectinolíticas em sistemas aquosos bifásicos a pH 7,0 e temperatura de 4°C, para que não houvesse inativação das enzimas, usou-se, primeiramente, as enzimas comerciais Pectinex-3XL e Citrozym Cloudy 100L em diferentes sistemas PEG/fosfato, PEG/citrato e PEG/maltodextrina, todos com composição de 20% (p/v) de PEG e 15% de sal (ou maltodextrina) no ponto de mistura, ou seja, 20/15%. A utilização das enzimas comerciais esclareceu dificuldades no processamento de separação das enzimas pectinolíticas e auxiliou o desenvolvimento de uma estratégia para a separação das enzimas obtidas por fermentação.

4.3.1.1. Sistema PEG/fosfato de potássio

No processo de extração com sistemas PEG/fosfato usou-se a enzima comercial Pectinex-3XL e PEG com massas moleculares variando entre 400 e 10000 Da. Os resultados da extração são apresentados nas Figuras 4.1 e 4.2, nas Tabelas 4.1 a 4.5 e C-1 a C-11 do Apêndice C.

Após deixar os sistemas em repouso, para entrar em equilíbrio, verificou-se que a porcentagem volumétrica da fase de topo diminuía com o aumento da massa molecular do PEG e apresentava volumes aproximadamente iguais com a fase de fundo para PEG-3350 (Figura 4.1 e Tabela C-1 do Apêndice C).

Os desvios padrões dos coeficientes de partição variaram entre 0,001-0,051 para proteína, 0,009-0,174 para PE, 0,001-0,042 para exo-PG, 0,002-0,145 para endo-PG e 0,011-0,076 para PL, exceto para PL nos sistemas com PEG-400 (0,604) e com PEG-600 (14,539). Nestes casos a atividade de PL na fase de

fundo era muito pequena (1,47 U e 0,67 U, respectivamente, como mostram as Tabelas C-5 e C-6 do Apêndice C) e, portanto de difícil determinação, o que gerou desvios grandes. Para estes casos os valores dos coeficientes de partição foram de 6,43 e 43,18, respectivamente. Os coeficientes de partição foram influenciados pela massa molecular do PEG (Figura 4.2 e Tabela C-2 do Apêndice C). As proteínas apresentaram afinidade pela fase de fundo, pois os valores de K_p estão sempre abaixo do valor 1. Esta afinidade aumentou com o aumento da massa molecular do PEG ficando o K_p praticamente constantes a partir de PEG-3350. Lahore *et alii* (1995) observaram que o aumento da massa molecular do PEG de 600 para 20000 promovia a diminuição do valor do coeficiente de partição da protease de *Mucor bacilliformis* em 500 vezes.

Segundo Marcos *et alii* (1999) a diminuição do coeficiente de partição, com o aumento da massa molecular do PEG, deve-se ao aumento da hidrofobicidade da fase de topo, rica em PEG, e a diminuição do volume livre nesta fase. Paquet *et alii* (1994) observaram também, que a migração de pristamicina para a fase rica em PEG ocorria devido a hidrofobicidade do antibiótico.

Os perfis das curvas de coeficiente de partição em função da massa molecular do PEG para PL e PE apresentaram a mesma tendência, inclusive com o aumento do K_E com PEG-600.

As recuperações enzimáticas foram maiores na fase de topo quando a massa molecular do PEG era pequena, o que está de acordo com os altos valores de K_E nestes sistemas. Com o aumento da massa molecular do PEG as enzimas passam a ser efetivamente recuperadas na fase de fundo, tendo como ponto de mudança de fase de maior recuperação PEG-600 (exo-PG 50,5%), PEG-1000 (PE 49,8%) e PEG-1450 (endo-PG 47,5%) e PEG-3350 (PL 47,2%), como mostram as Tabelas 4.1 e C-3 do Apêndice C. As recuperações das proteínas também foram maiores na fase de fundo. Gonzalez *et alii* (1990) obtiveram 73 a 96% de recuperação de β -galactosidase e 78 a 100% de proteína com PEG-400.

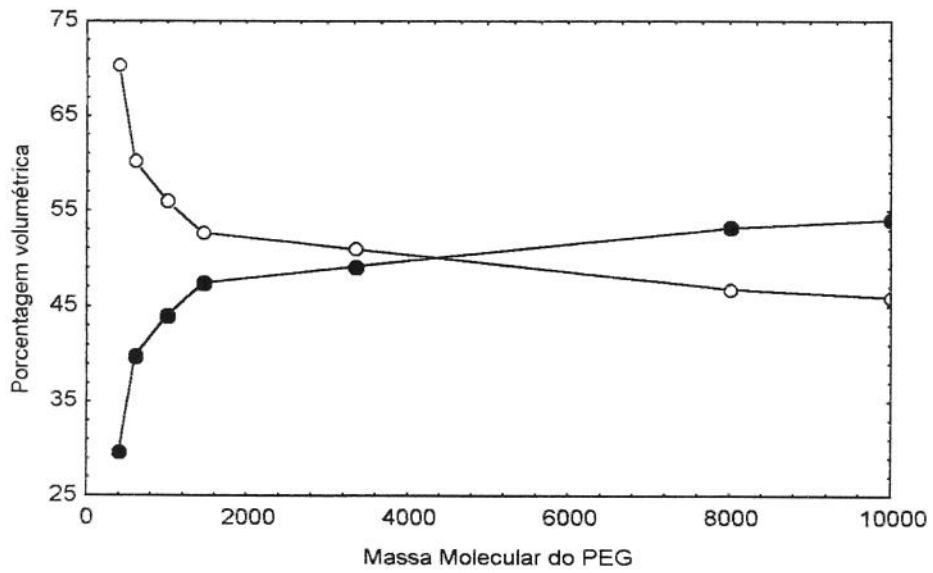


Figura 4.1: Variação da porcentagem volumétrica da fase de topo (O) e de fundo (●) dos sistemas PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

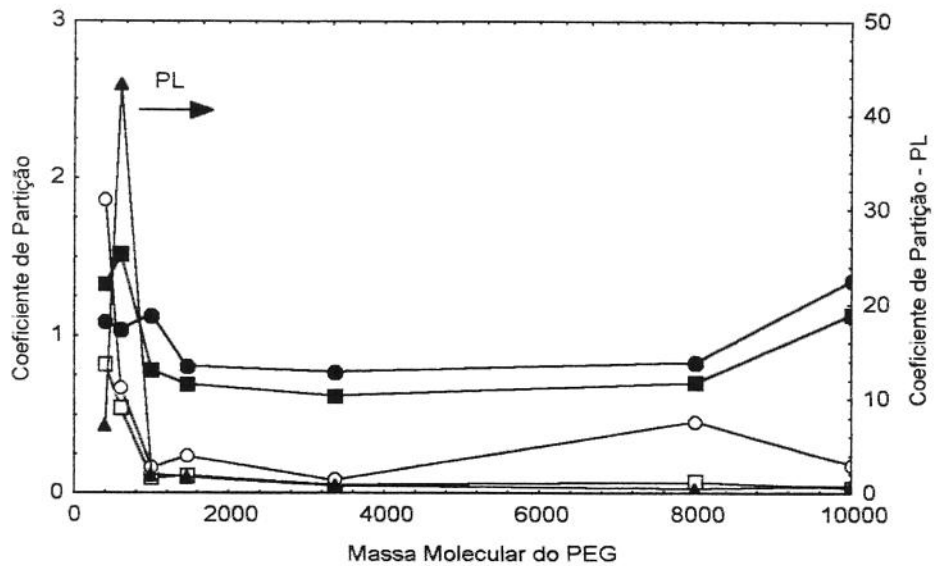


Figura 4.2: Coeficientes de partição das proteínas totais (□) e enzimas pectinolíticas (PE ■, PL ▲, exo-PG O e endo-PG ●) nos sistemas PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C. Ordenada da esquerda: PL.

Tabela 4.1: Recuperações (%) na fase de topo para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Proteínas totais	PE	PL	Exo-PG	Endo-PG
400	67,2	76,0	94,5	81,5	72,2
600	41,2	69,6	98,5	50,5	61,2
1000	9,1	49,8	71,6	16,9	59,0
1450	10,2	43,7	66,2	20,8	47,5
3350	4,7	39,2	47,2	8,0	44,6
8000	5,4	38,3	30,9	28,7	42,4
10000	2,8	49,1	42,3	13,3	53,5

As enzimas foram concentradas na fase de topo (Tabela 4.2). Já na fase de fundo os valores do fator de purificação foram menores que 1, o que implica na não purificação das mesmas (Tabela C-3 do Apêndice C). Os maiores valores do fator de purificação ocorreram em sistemas com altas massas moleculares de PEG, no entanto nestes sistemas observou-se baixos valores de recuperação, os quais foram devidos, provavelmente, à maior migração das proteínas para a fase de fundo em comparação às enzimas, ocasionando um aumento da atividade específica (U/mg de proteína) na fase de topo e conseqüentemente do fator de purificação nesta fase. Estes altos valores foram obtidos com PEG-10000 (endo-PG de 16,28 vezes, PL de 14,27 vezes e 16,64 vezes) e com PEG-8000 (exo-PG de 4,79 vezes). Polizeli *et alii* (1991) obtiveram fatores de purificação de 5,49 vezes para exo-PG e 20,73 vezes para PL após precipitação com etanol a -20°C e dois passos de cromatografias. Já Gupta *et alii* (1993) observaram ao final de duas precipitações de Pectinex-3XL com alginato de sódio, rendimento de 4,4% e fator de purificação de 3,8 vezes.

Comparando-se os valores da literatura com os obtidos, verifica-se que a separação das enzimas pectinolíticas em sistema aquoso bifásico, mesmo sendo um processo mais simples, gerou melhores rendimentos e fatores de purificação para a maioria dos ensaios realizados.

Tabela 4.2: Fator de purificação na fase de topo para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	PE	PL	Exo-PG	Endo-PG
400	1,15	1,42	1,23	1,09
600	1,54	2,19	1,13	1,37
1000	4,48	6,49	1,55	5,10
1450	3,94	5,97	1,92	4,27
3350	7,13	8,59	1,46	8,27
8000	6,38	5,14	4,79	6,84
10000	16,64	14,27	4,50	16,28

Nas recuperações calculadas utilizando-se como referência inicial uma solução aquosa da enzima observou-se que os valores para proteína estão próximos dos obtidos quando a referência inicial era a soma das concentrações de proteínas nas fases. Assim nota-se que os componentes formadores das fases têm pouca interferência na detecção da proteína (Tabela 4.3 e 4.4).

A forma tradicional para o cálculo da recuperação e do fator de purificação utiliza a soma das atividades enzimáticas e concentração de proteínas contaminantes nas fases de topo e de fundo como valores de formação do sistema, esta forma de cálculo não considera possíveis efeitos de ativação e inativação das enzimas pelos componentes formadores do sistema. Alguns autores, como Piza (1998) ultrafiltrou as fases, no processo de separação de quitanase de *Bacillus cereus*, entretanto obteve recuperações de 105,3% somente na fase de todo do sistema PEG-1500/fosfato (16/13%) com 12% de NaCl, e rendimentos totais para proteínas contaminantes entre 50,9 e 81,3%, indicando que a detecção das proteínas e a atividade enzimática foram influenciadas pelos componentes do sistema.

Tabela 4.3: Recuperações (%) das proteínas, PE e PL, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Proteína			PE			PL		
	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}
400	62,2	31,9	94,1	60,8	19,2	80,0	71,0	4,7	75,7
600	34,9	43,1	77,0	52,9	23,8	76,7	82,7	1,8	84,5
1000	8,0	64,7	72,7	32,1	32,9	64,9	106,1	42,2	148,3
1450	8,9	71,6	80,5	30,3	39,0	69,3	108,3	55,5	163,7
3350	4,1	71,0	75,1	25,9	40,2	66,1	34,6	38,7	73,3
8000	5,0	78,3	83,3	26,2	42,3	68,4	20,2	45,2	65,4
10000	2,5	83,6	86,1	35,7	36,9	72,6	25,0	34,4	59,4

Tabela 4.4: Recuperações (%) da PL e PE, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Exo-PG			Endo-PG		
	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}
400	47,9	10,9	58,8	67,2	25,9	93,2
600	22,5	22,2	44,7	52,4	33,3	85,7
1000	7,3	35,6	43,0	42,8	33,4	76,2
1450	7,6	28,2	35,8	30,8	34,3	65,1
3350	3,0	35,0	38,1	24,1	26,1	50,2
8000	15,8	39,2	55,0	30,9	44,5	75,3
10000	5,8	37,9	43,7	26,1	28,2	54,2

Nos sistemas com pequena massa molecular de PEG, os valores das recuperações totais foram os maiores. As recuperações de exo-PG foram de aproximadamente 50%, o que implica dizer que a enzima sofre inativação na presença dos constituintes do sistema. No estudo da interferência dos compostos formadores do sistema bifásico nas atividades enzimáticas, verificou-se que para exo-PG ocorria aumento de atividade na presença dos PEG's, mas com fosfato ocorria diminuição, já para a PL o aumento da atividade só foi maior com PEG-

400. Isto mostra que ocorre um sinergismo dos compostos na alteração da atividade enzimática. A PL sofre ativação, pois as recuperações ficaram acima de 100% com PEG-1000 e PEG-1450. Já as atividades para endo-PG e PE foram pouco influenciadas.

Os fatores de purificação na fase de fundo ficaram abaixo do valor 1, ou seja, não houve purificação enzimática. Este resultado concorda com os valores obtidos com a forma tradicional de cálculo. Para PE e endo-PG a nova forma de cálculo apenas ajustou os valores sem mostrar grandes diferenças, mantendo-se inclusive a mesma tendência de variação. Com a exo-PG observou-se diferença considerável utilizando a nova referência inicial, com purificação ocorrendo apenas com PEG-8000 e PEG-10000. Já PL teve os valores mais elevados a PEG-1000 e PEG-1450, sistemas nos quais foram constatadas ativações da enzima (Tabela 4.5 e C-4 do Apêndice C).

Tabela 4.5: Fator de purificação, tomando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/5%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	PE		PL		Exo-PG		Endo-PG	
	FP _{topo}	FP _{fundo}	FP _{topo}	FP _{fundo}	FP _{topo}	FP _{fundo}	FP _{topo}	FP _{fundo}
400	0,98	0,60	1,14	0,15	0,77	0,34	1,08	0,81
600	1,52	0,55	2,37	0,04	0,65	0,51	1,50	0,77
1000	4,01	0,51	13,26	0,65	0,92	0,55	5,35	0,52
1450	3,39	0,54	12,13	0,77	0,85	0,39	3,45	0,48
3350	6,28	0,57	8,38	0,55	0,74	0,49	5,85	0,37
8000	5,24	0,54	4,04	0,58	3,16	0,50	6,18	0,57
10000	14,02	0,44	9,84	0,41	2,28	0,45	10,25	0,34

Chen & Lee (1999) verificaram que a presença de PEG aumentou a atividade de quitanase de 13,6 para 25,8 U/mL. Ativação foi também observada por Bradoo *et alii* (1999) que notaram aumento de 3,5 vezes na detecção da atividade de lipase, já Levin & Forchiassin (1998) verificaram que a presença de PEG, na fermentação para obtenção de pectinases por *Trametes trogii*, estimulava

o rendimento de PG devido ao aumento da permeabilidade e/ou promoção da liberação da enzima.

4.3.1.2. Sistema PEG/fosfato de potássio com adição de NaCl

Adicionou-se NaCl aos sistemas PEG/fosfato, para atingir uma concentração de 6%, com o intuito de aumentar a hidrofobicidade relativa da fase de topo e conseqüentemente aumentar o coeficiente de partição das enzimas. Os resultados das extrações são mostrados nas Figuras 4.3 e 4.4, Tabelas 4.6 a 4.10 e C-12 a C-22 do Apêndice C. Os volumes das fases de topo diminuíram com o aumento da massa molecular do PEG e foram menores que os obtidos nos experimentos sem adição de NaCl (Figura 4.3 e Tabela C-12 do Apêndice C).

Os desvios padrões dos coeficientes de partição variaram entre 0,000-0,023 para proteína, 0,003-0,070 para PE; 0,003-0,045 para PL; 0,023-0,222 para exo-PG e 0,005-0,107 para endo-PG. O coeficiente de partição da proteína apresentou valores menores nos sistemas com adição de NaCl e diminuiu com o aumento do massa molecular após PEG-3350, como mostra a Figura 4.4 e Tabela C-13 do Apêndice C. A preferência das proteínas pela fase rica em fosfato está de acordo com a partição de proteases de *Mucor bacilliformes* em sistema PEG/fosfato (Lahore *et alii*, 1995). Albertsson (1990) afirma que cátions como Na⁺ e íons como Cl⁻ diminuem o coeficiente de partição de proteínas de carga negativa.

Os coeficientes de partição da endo-PG, exo-PG e PE diminuíram com a massa molecular até PEG-1450, voltando a aumentar com massas moleculares maiores. Para PL houve diminuição gradativa do coeficiente de partição, como ocorreu com as proteínas. Comparando-se com o sistema sem NaCl o coeficiente de partição das proteínas totais aumentou, os das endo-PG e PE ficaram, na maioria dos experimentos realizados, praticamente iguais. Os da exo-PG (exceto com PEG-1450 e PEG-8000) e PL (exceto com PEG-600 e PEG-1450) aumentaram, apesar de se esperar a diminuição do coeficiente de partição das proteínas totais e aumento do das enzimas. Krone & Kula (1978) verificaram a diminuição do coeficiente de partição de α -glucosidase com adição de KCl em sistema PEG/dextrana (7-2,5%). Os maiores valores do coeficiente de partição

para as enzimas pectinolíticas foram encontrados com massas moleculares pequenas, PEG-400 (proteína de $1,43 \pm 0,023$; endo-PG de $1,15 \pm 0,107$; exo-PG de $3,35 \pm 0,222$ e PE $1,34 \pm 0,005$) e PEG-600 (PL de $9,55 \pm 0,029$).

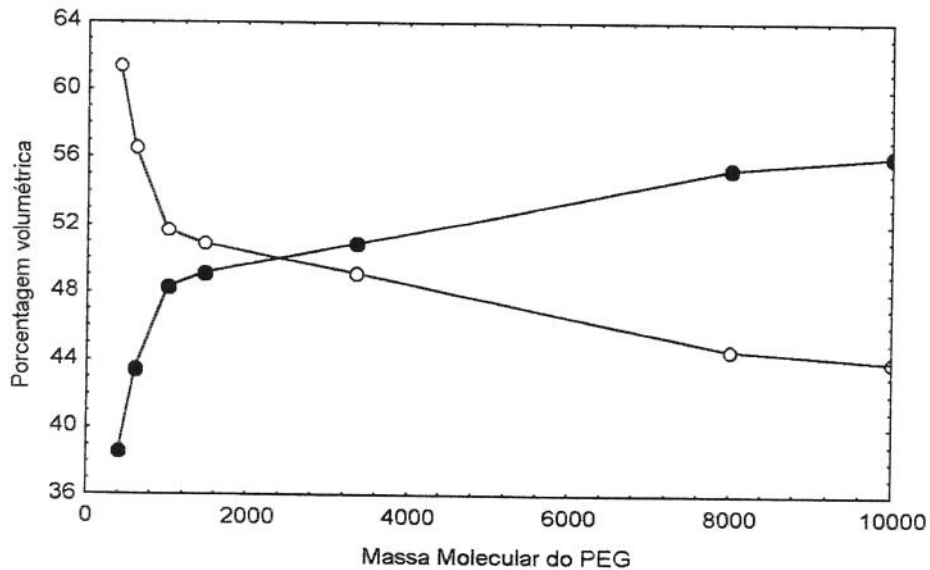


Figura 4.3: Variação da porcentagem volumétrica da fase de topo (O) e de fundo (●) dos sistemas PEG/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C.

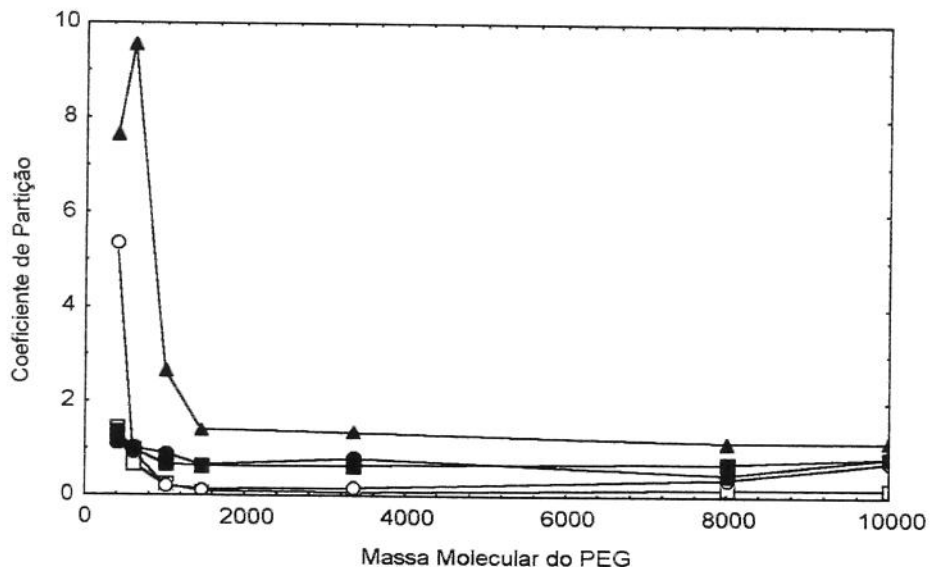


Figura 4.4: Coeficientes de partição das proteínas totais (□) e enzimas pectinolíticas (PE ■, PL ▲, exo-PG O e endo-PG ●) nos sistemas PEG/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C.

As recuperações das proteínas totais na fase de topo caíram drasticamente quando foi usado PEG de massa molecular maior que 1000, sendo recuperadas efetivamente na fase de fundo, fato também observado nos experimentos sem adição de NaCl (Tabela 4.6 para a fase de topo e Tabela C-14 do Apêndice C para a fase de fundo). PE e endo-PG apresentaram maiores recuperações sem NaCl, mostrando que o sal inibe a atividade destas enzimas, concordando com Gupta *et alii* (1993). Estes autores verificaram que a adição de NaCl diminuiu a atividade enzimática. A inibição da PL é verificada até PEG-1450, já a exo-PG sofre inibição a partir de PEG-1450. A maior recuperação ocorreu com PEG-600 para PL (92,5%). Bradoo *et alii* (1999) obtiveram recuperações de 5,27 e 15,25% para lípases ácida e neutra, respectivamente, em sistema PEG-600/fosfato (70/40%) e NaCl (3%), que é bem inferior aos valores alcançados neste trabalho.

Os fatores de purificação na fase de topo apresentam valor máximo em PEG-3350 para todas as enzimas, como mostra a Tabela 4.6. Entretanto, não se observou purificação na fase de fundo, pois os valores do fator de purificação são menores que 1, exceto para endo-PG (1,13) e PE (1,04) com PEG-400 e exo-PG (1,02) com PEG-1000 que não mostram purificação (Tabela C-15 do Apêndice C).

Tabela 4.6: Recuperações (%) na fase de topo para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Proteínas Totais	PE	PL	Exo-PG	Endo-PG
400	69,5	68,1	92,4	89,5	64,6
600	46,6	56,2	92,5	55,1	56,8
1000	20,2	42,0	74,0	18,8	49,1
1450	9,0	39,3	59,2	13,1	40,4
3350	6,5	38,4	56,3	13,6	43,5
8000	11,8	36,3	48,2	23,9	28,0
10000	11,6	40,0	48,0	36,8	40,1

Os fatores de purificação foram menores que nos sistemas sem NaCl, pois as proteínas foram recuperadas em maior quantidade na fase de topo no sistema com adição de NaCl, levando à diminuição da atividade específica da enzima na fase de topo e conseqüentemente diminuindo o fator de purificação. Bim & Franco (2000) obtiveram fator de purificação de 33 para xilanase em sistema PEG-6000/fosfato (22/13%) com 12% de NaCl, que é muito maior aos obtidos por este estudo para as enzimas pectinolíticas.

Tabela 4.7: Fator de purificação na fase de topo para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	PE	PL	Exo-PG	Endo-PG
400	0,98	1,33	1,29	0,94
600	1,21	1,99	1,18	1,22
1000	2,07	3,66	0,93	2,46
1450	4,35	6,55	1,48	4,65
3350	5,89	8,63	2,09	6,67
8000	3,50	4,08	2,03	2,62
10000	3,45	4,14	3,16	3,60

Utilizando como referência inicial a enzima comercial diluída em água na mesma proporção do sistema formado, as recuperações totais das proteínas, exo e endo-PG e PE foram menores que 100%, isto mostra que o NaCl tem efeito negativo na detecção da proteína, pois nos ensaios sem NaCl não foi observada influência na detecção da proteína. Fato também observado na determinação da atividade de PE. Para PL ocorreu uma ativação mais pronunciada com adição de NaCl, pois todas as recuperações totais foram maiores que 100%, como mostram as Tabelas 4.8 e 4.9.

Os fatores de purificação na fase de fundo para PE, exo-PG e endo-PG (exceto em PEG-400 com fator de purificação de 1,28 vezes) tiveram a mesma tendência que o calculado pela forma tradicional e foram menores que 1, porém apresentaram resultados próximos a 1 para PL e exo-PG com PEG de alta massa molecular (exceto a PEG-1000 para exo-PG, onde se obteve um valor de 2,17

vezes). Os dados da fase de topo para PE foram praticamente iguais a forma tradicional, mas para PL e endo-PG foram menores, o que pode ser visto pela Tabela 4.10. No estudo simulando as fases, mas com apenas o componente de maior concentração (Capítulo 1), exo-PG foi ativada pelos PEG's, as PL eram inativadas e as endo-PG não eram influenciadas pelo PEG, porém fosfato inativava a enzima, demonstrando haver uma interrelação dos efeitos destes compostos que seja no sentido de aumentar ou diminuir a atividade enzimática.

Tabela 4.8: Recuperações (%) das proteínas, PE e PL, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Proteína			PE			PL		
	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}
400	52,6	23,1	76,7	42,7	20,0	62,7	106,1	8,7	114,9
600	33,9	38,9	72,8	38,9	30,3	69,2	113,3	9,1	122,4
1000	13,9	54,9	68,8	28,8	39,8	68,6	115,0	40,4	155,4
1450	5,8	58,2	65,0	26,4	40,8	67,2	95,6	65,8	161,4
3350	4,3	62,0	66,3	25,3	40,5	65,8	83,2	64,7	147,9
8000	8,4	63,0	71,4	25,6	45,3	70,8	67,3	72,3	139,6
10000	9,1	69,7	78,8	30,0	45,1	75,1	61,5	66,6	128,2

Tabela 4.9: Recuperações (%) de exo-PG e endo-PG, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Exo-PG			Endo-PG		
	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}
400	34,6	4,1	38,7	56,4	29,6	86,1
600	16,8	13,7	30,5	49,3	37,7	87,0
1000	6,9	29,6	36,5	37,3	37,6	74,9
1450	4,1	26,3	30,3	33,8	46,6	80,4
3350	4,6	29,2	33,8	34,6	45,0	79,6
8000	7,8	24,8	32,6	17,4	38,9	56,3
10000	19,8	34,3	54,2	37,1	51,9	89,0

Tabela 4.10: Fator de purificação, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	PE		PL		Exo-PG		Endo-PG	
	FP _{topo}	FP _{fundo}	FP _{topo}	FP _{fundo}	FP _{topo}	FP _{fundo}	FP _{topo}	FP _{fundo}
400	0,81	0,86	2,02	0,38	0,66	0,18	1,07	1,28
600	1,15	0,78	3,34	0,23	0,49	0,35	1,45	0,97
1000	2,07	0,73	8,26	0,74	0,49	0,54	2,68	0,69
1450	4,57	0,70	16,53	1,13	0,70	0,45	5,85	0,80
3350	5,84	0,65	19,24	1,04	1,06	0,47	8,01	0,73
8000	3,02	0,72	7,96	1,15	0,92	0,39	2,06	0,62
10000	3,28	0,65	6,74	0,96	2,17	0,49	4,06	0,74

4.3.1.3. Sistema PEG/citrato de sódio

No processo de partição com sistemas PEG/citrato utilizou-se o complexo enzimático comercial Citrozym Cloudy 100L em diferentes massas moleculares de PEG (entre 400 e 10000), porém não houve formação de sistema bifásico com PEG-400 e não foi possível detectar a presença de atividade de PE. Os resultados são mostrados nas Figuras 4.5 e 4.6 e Tabelas 4.11 a 4.15 e C-23 a C-32 do Apêndice C.

O volume da fase de topo decresce com o aumento da massa molecular do PEG, como mostra a Figura 4.5 e Tabela C-23 do Apêndice C. Os desvios padrões dos coeficientes de partição variaram entre 0,001-0,014 para proteína; 0,002-0,054 para endo-PG; 0,004-0,305 para exo-PG e 0,001-0,019 para PL. Os coeficientes de partição diminuíram com o aumento da massa molecular de PEG até 1450 (endo-PG, exo-PG e PL) e 3350 (proteínas) e depois aumentaram (Figura 4.6 e Tabela C-24 do Apêndice C). Alves *et alii* (2000) separando insulina suína observaram o aumento do coeficiente de partição com a elevação da massa molecular do PEG, como sugerido por Albertsson (1990), enquanto Marcos *et alii* (1999) verificaram decréscimo do coeficiente de partição de penicilina acilase de *Escherichia coli* com o aumento da massa molecular do PEG em sistema

PEG/citrato. Os maiores coeficientes de partição foram obtidos a PEG-600 (endo-PG de $1,06 \pm 0,020$), PEG-1000 (PL de $1,60 \pm 0,009$), PEG-8000 (proteína de $0,90 \pm 0,009$) e PEG-10000 (exo-PG de $1,85 \pm 0,305$). Estas diferenças entre diminuição e aumento do coeficiente de partição estão relacionadas, possivelmente, ao aumento do volume excluído e à hidrofobicidade do material que foi separado pelo sistema.

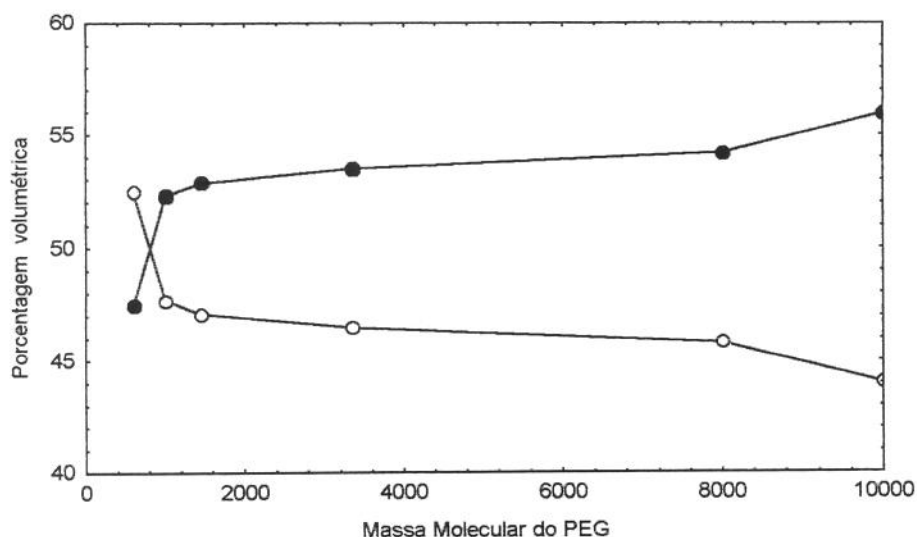


Figura 4.5: Variação da porcentagem volumétrica da fase de topo (O) e de fundo (●) dos sistemas PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

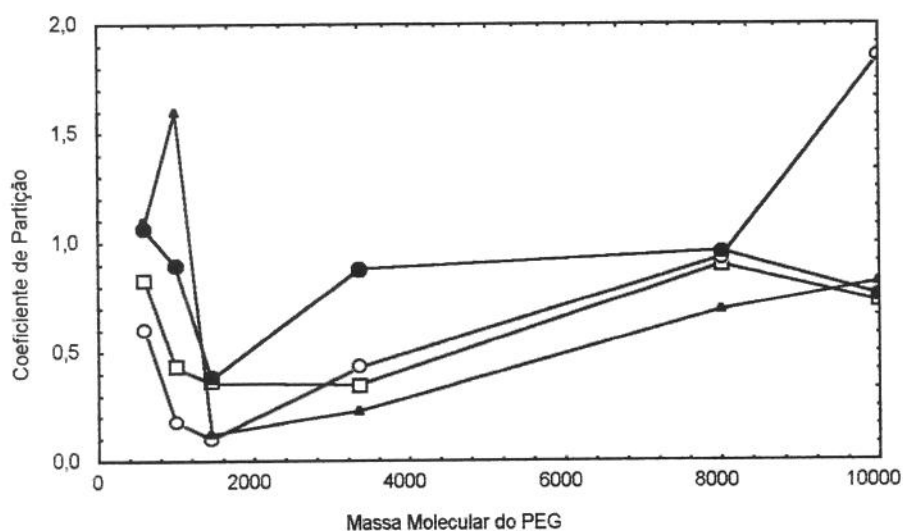


Figura 4.6: Coeficientes de partição das proteínas totais (□) e enzimas pectinolíticas (PL ▲, exo-PG ○ e endo-PG ●) nos sistemas PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

As recuperações de endo-PG e PL na fase de topo foram mais pronunciadas com PEG de massa molecular pequena, já a exo-PG apresentou recuperações elevadas apenas na fase de fundo. As menores recuperações ocorreram com PEG-1450 (exo-PG de 7,9%; endo-PG de 25,4% e PL de 9,6%) na fase de topo, o que mostra a Tabela 4.11 para a fase de topo e a Tabela C-25 do Apêndice C, para a fase de fundo. Vernau & Kula (1990) obtiveram recuperação de 80-95% de proteínas após extração em dois estágios em sistemas PEG/citrato.

A endo-PG foi purificada apenas na fase de topo com os fatores de purificação variando entre 1,03 e 1,86. Nas massas moleculares altas (PEG-8000 e PEG-10000) o valor do fator de purificação ficou em torno de 1, o que indicou não haver purificação. PL foi purificada na fase de topo até PEG de massa molecular 1000 e a exo-PG após PEG-1450, com maiores valores encontrados a PEG-10000 de 2,10 e 1,60, respectivamente (Tabelas 4.12 e C-26 do Apêndice C).

Tabela 4.11: Recuperações (%) na fase de topo para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Proteínas	PL	exo-PG	Endo-PG
600	47,8	54,6	40,0	54,0
1000	28,2	59,3	13,9	45,0
1450	24,1	9,6	7,9	25,4
3350	23,3	16,8	27,2	43,4
8000	43,1	36,7	43,9	44,7
10000	36,5	39,3	59,3	37,5

Singh *et alii* (1999b) determinaram um fator de purificação de 45,4 e um rendimento de 20% para pectinase, porém utilizando 3 diferentes técnicas cromatográficas. Apesar de mais baixos, os fatores de purificação obtidos neste trabalho são resultado de apenas um passo de purificação, entretanto os rendimentos obtidos para os maiores fatores de purificação 2,10 (PL), 1,60 (exo-PG) e 1,86 (endo-PG) foram cerca de 2 vezes maiores que o obtido pelos autores acima citado. Já as comparações com os valores obtidos neste trabalho usando o

sistema PEG/fosfato mostram que este último sistema é mais eficaz na separação das pectinases, pois tanto as recuperações quanto os fatores de purificação foram bem maiores.

Tabela 4.12: Fator de purificação na fase de topo para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	PL	Exo-PG	Endo-PG
600	1,14	0,83	1,13
1000	2,10	0,49	1,60
1450	0,40	0,33	1,10
3350	0,72	1,17	1,86
8000	0,85	1,02	1,04
10000	1,08	1,60	1,03

As recuperações enzimáticas com a referência inicial, feita com solução aquosa de enzima, demonstraram que ocorria uma ativação enzimática devido aos compostos formadores da fase, isto é, os rendimentos totais da exo-PG e PL foram maiores que 100%, o que pode ser visto nas Tabelas 4.13 e 4.14. O que está de acordo com o efeito da ativação das atividades enzimáticas verificado no Capítulo 2 para a exo-PG.

Tabela 4.13: Recuperações (%) das proteínas e da PL, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Proteínas			PL		
	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}
600	45,5	49,8	95,3	69,2	57,5	126,6
1000	25,8	65,6	91,4	83,4	57,2	140,6
1450	22,8	71,8	94,7	6,8	63,9	70,7
3350	21,4	70,6	92,1	13,4	66,1	79,5
8000	40,1	53,0	93,2	41,3	71,2	112,5
10000	35,6	62,0	97,7	49,1	75,9	125,0

A utilização da nova referência inicial apresentou valores do fator de purificação maiores para as enzimas pectinolíticas com PEG 600 e 10000 Da na fase de fundo.

Tabela 4.14: Recuperações (%) da Endo-PG e Exo-PG, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Exo-PG			Endo-PG		
	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}
600	47,8	40,8	88,6	61,9	93,8	155,7
1000	35,0	42,8	77,8	21,7	135,2	156,8
1450	17,4	48,1	65,5	10,5	122,5	133,0
3350	39,1	51,1	90,2	34,7	93,0	127,6
8000	46,8	57,8	104,7	80,8	103,2	184,0
10000	37,5	62,6	100,1	115,8	82,6	198,4

Tabela 4.15: Fator de purificação, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	PL		Exo-PG		Endo-PG	
	FP _{topo}	FP _{fundo}	FP _{topo}	FP _{fundo}	FP _{topo}	FP _{fundo}
600	1,52	1,19	1,36	1,88	1,05	0,82
1000	3,24	0,87	0,84	2,06	1,36	0,65
1450	0,30	0,89	0,46	1,71	0,76	0,67
3350	0,62	0,94	1,62	1,32	1,82	0,72
8000	1,03	1,34	2,01	1,95	1,17	1,09
10000	1,38	1,22	3,25	1,33	1,05	1,01

4.3.1.4. Sistema PEG/citrato de sódio com adição de NaCl

Para verificar o efeito do aumento da diferença de hidrofobicidade entre as fases adicionou-se NaCl para que o sistema tivesse 6% deste sal. Da mesma forma que para o sistema sem NaCl não ocorreu formação de fases com PEG-400. Os resultados são mostrados nas Figuras 4.7 e 4.8, Tabelas 4.16 a 4.20 e Tabelas C-33 a C-42 do Apêndice C.

Como nos sistemas anteriores o volume da fase de topo diminuiu com o aumento da massa molecular do PEG, com igualdade do volume das fases ocorrendo em PEG-1000 e PEG-1450 (Figura 4.7 e Tabela C-33 do Apêndice C). Os desvios padrões dos coeficientes de partição variaram entre 0,001-0,038 para proteína, 0,002-0,062 para *exo*-PG; 0,004-0,126 para PL e 0,006-0,086 para *endo*-PG. Os coeficientes de partição das proteínas diminuíram com a elevação da massa molecular do PEG (apesar de se observar um valor mais elevado com PEG-8000) e foram maiores que os encontrados sem a incorporação de NaCl. Este fato também foi observado para os coeficientes de partição das enzimas, porém ocorreu para a *endo*-PG em massa molecular de PEG maior que 1450 e para *exo*-PG em PEG de massas moleculares grandes e pequenas, como mostram a Figura 4.8 e Tabela C-34 do Apêndice C.

Gündüz & Korkmaz (2000) observaram que o coeficiente de partição de albumina de soro bovino aumentava com a concentração de NaCl e Marcos *et alii* (1999) verificaram que esse aumento era mais pronunciado para penicilina acilase do que para proteínas totais. Os maiores coeficientes de partição para o presente trabalho ocorreram com PEG-600 (proteína de $1,01 \pm 0,015$; *endo*-PG de $1,05 \pm 0,012$), PEG-1000 (PL de $2,43 \pm 0,126$) e PEG-8000 (*exo*-PG de $0,96 \pm 0,062$).

Exo-PG apresentou maior recuperação na fase de fundo da mesma forma que nos ensaios sem adição de NaCl. A *endo*-PG apresentou valores de recuperação de fundo praticamente iguais aos da fase de topo. A PL foi mais pronunciadamente recuperada na fase de topo até PEG-3350. Percebe-se que para *endo*-PG a adição de NaCl não traz nenhuma vantagem (Tabelas 4.16 e C-35 do Apêndice C).

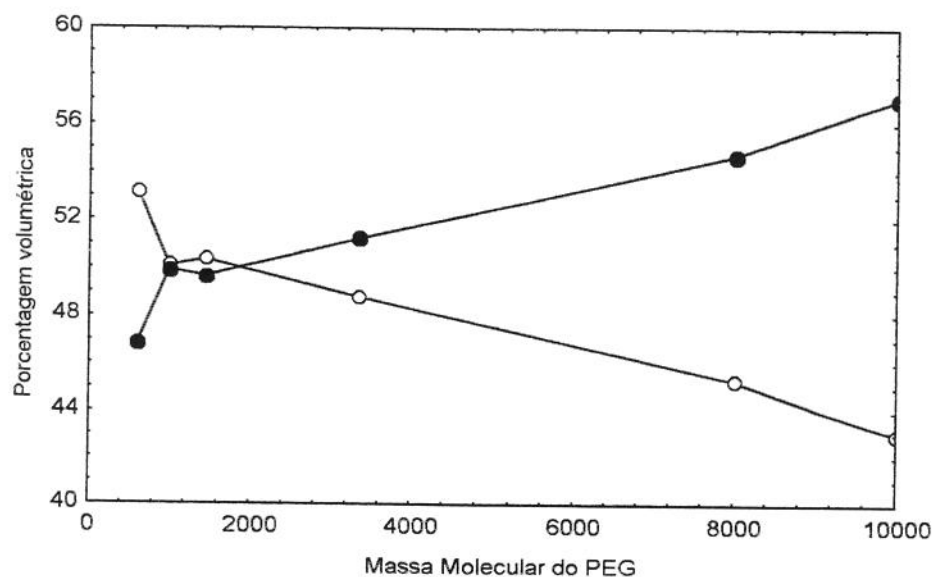


Figura 4.7: Variação da percentagem volumétrica da fase de topo (O) e de fundo (●) dos sistemas PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C.

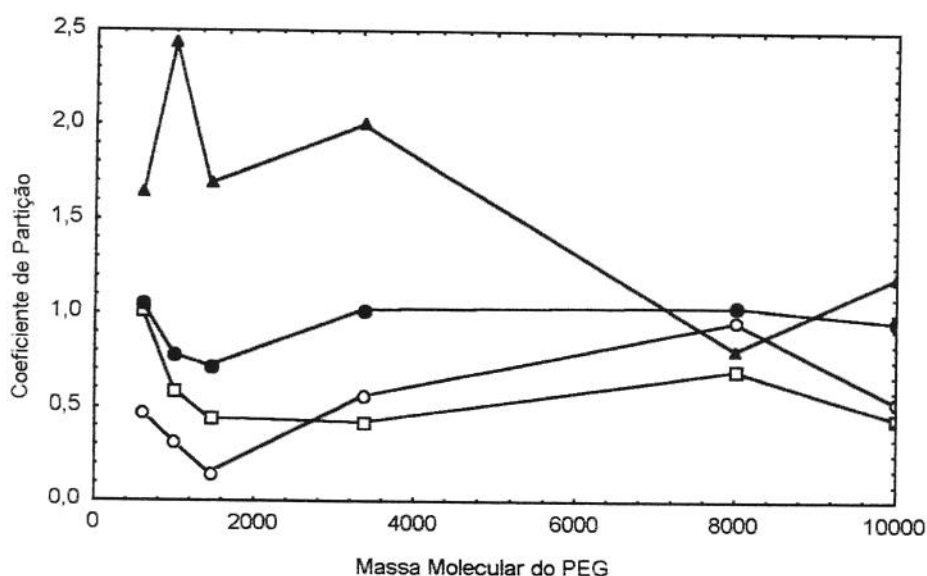


Figura 4.8: Coeficientes de partição das proteínas totais (□) e enzimas pectinolíticas (PL ▲, exo-PG ● e endo-PG ●) nos sistemas PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C.

Tabela 4.16: Recuperações (%) na fase de topo para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Proteínas	PL	Exo-PG	Endo-PG
600	53,5	65,0	34,6	54,3
1000	37,1	70,9	23,8	43,9
1450	30,8	63,1	13,4	42,3
3350	28,5	65,6	34,9	49,3
8000	36,7	40,3	44,4	46,4
10000	24,8	47,4	28,5	41,9

Observou-se a separação das enzimas na fase de topo, exceto para exo-PG com massa molecular abaixo de PEG-1450, nestes casos os valores dos fatores de purificação foram menores que 1. Os maiores fatores ocorreram com adição de NaCl e na fase de topo com PEG-3350 (2,3 para PL e 1,78 para endo-PG) e na fase de fundo com PEG-1450 (1,3 para exo-PG), como mostram as Tabelas 4.17 e C-36 do Apêndice C. Marcos *et alii* (1999) obtiveram melhor fator de purificação com NaCl (20 M) igual a 4,8 em sistema PEG/citrato para purificação de penicilina acilase. As recuperações enzimáticas, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, mostraram forte influência dos componentes das fases nas atividades enzimática, pois as recuperações totais da exo-PG foram maiores que 100%. Para PL e endo-PG a influência foi menor, pois as recuperações totais ficaram próximas a 100% (Tabelas 4.18 e 4.19).

Tabela 4.17: Fator de purificação na fase de topo para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	PL	Exo-PG	Endo-PG
600	1,22	0,65	1,02
1000	1,91	0,64	1,12
1450	2,04	0,43	1,39
3350	2,30	1,20	1,78
8000	1,09	1,21	1,28
10000	1,89	1,13	1,67

Tabela 4.18: Recuperações (%) das proteínas e da PL, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Proteínas			PL		
	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}
600	62,5	54,6	117,1	63,4	34,1	97,5
1000	44,3	74,9	119,3	61,6	25,3	86,8
1450	36,6	81,9	118,5	60,6	35,3	95,9
3350	31,2	78,2	109,4	58,1	30,6	88,7
8000	42,7	73,3	116,0	45,7	68,1	113,8
10000	30,0	89,6	119,6	51,2	56,9	108,1

Tabela 4.19: Recuperações (%) da exo-PG e endo-PG, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Exo-PG			Endo-PG		
	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}
600	50,5	95,8	146,3	53,4	44,9	98,3
1000	36,1	115,9	152,1	35,1	49,3	84,4
1450	13,6	87,8	101,4	33,5	44,5	78,0
3350	36,3	69,7	106,0	48,2	46,5	94,6
8000	64,5	80,5	145,0	47,9	54,1	102,0
10000	45,1	113,4	158,5	44,6	62,0	106,6

As purificações da endo-PG e da exo-PG ocorreram na fase de fundo até PEG-1450, já a PL foi separada na fase de topo. Este comportamento é importante para a montagem de uma estratégia de purificação das enzimas. Os maiores fatores de purificação da exo-PG e da PL ocorreram nos sistemas com PEG de massa molecular de 1450 e 3350, nos sistemas em e com NaCl, respectivamente (Tabela 4.20).

Tabela 4.20: Fator de purificação, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl a pH 7,0 e 4°C.

MM	PL		Exdo-PG		Endo-PG	
do PEG	FP _{topo}	FP _{fundo}	FP _{topo}	FP _{fundo}	FP _{topo}	FP _{fundo}
600	1,01	0,63	0,81	1,76	1,00	0,96
1000	1,39	0,34	0,81	1,55	0,94	0,78
1450	1,66	0,43	0,37	1,07	1,08	0,64
3350	1,86	0,39	1,16	0,89	1,69	0,65
8000	1,07	0,93	1,51	1,10	1,30	0,86
10000	1,71	0,63	1,50	1,27	1,78	0,83

4.3.1.5. Sistema PEG/maltodextrina

Para verificar a influência dos sistemas formados por dois polímeros na partição de enzimas pectinolíticas, utilizou-se maltodextrina nas mesmas concentrações dos sistemas PEG/sal. Os resultados são mostrados nas Figuras 4.9 e 4.10, Tabelas 4.21 a 4.25 e Tabelas C-43 a C-52 do Apêndice C.

Assim como nos sistemas PEG/citrato, não houve formação de sistemas bifásicos com a utilização de PEG-400. O volume de fase de topo diminuiu com o aumento da massa molecular do PEG (Figura 4.9 e Tabela C-43 do Apêndice C). As porcentagens volumétricas das fases de topo foram, para todas as massas moleculares do PEG, maiores que as das fases de fundo. Almeida *et alii* (1998) obtiveram percentagem volumétrica da fase de topo entre 55-65% em outros sistemas polímero/polímero, PEG/hidroxilpropil amido.

Com base nos volumes das fases percebe-se que o ponto de mistura para o sistema não foi bem escolhido, pois rendeu volumes muito baixos para a fase de fundo. Porém este foi prioritariamente selecionado para que os resultados obtidos nos sistemas utilizados fossem facilmente comparados, mas no caso do sistema PEG/maltodextrina não foi obtida uma melhor proporção volumétrica entre as fases. Chen & Lee (1995) observaram uma razão volumétrica muito baixa 1,6/8,4 em sistema PEG-20000/dextrana T-500 (2/5%) como os obtidos neste trabalho.

Os desvios padrões dos coeficientes de partição nos sistemas PEG/maltodextrina variaram entre 0,001-0,217 para proteína; 0,002-0,096 para exo-PG; 0,009-0,189 para PL e 0,020-0,116 para endo-PG. Os coeficientes de partição para proteínas totais diminuíram com o aumento da massa molecular, apresentando grande afinidade pela fase de fundo para massa molecular de PEG maior que 1450, quando os mesmos ficaram abaixo de 0,5; como mostram a Figura 4.10 e Tabela C-44 do Apêndice C.

A endo-PG também apresentou afinidade pela fase de fundo com PEG de massa molecular acima de 8000, enquanto a exo-PG apresentou esta mesma afinidade para todas as massas moleculares utilizados. Os coeficientes de partição diminuíram com aumento da massa molecular do PEG, o que também foi observado para PL até PEG-1450, sendo que os maiores coeficientes de partição ocorreram com PEG-600 ($2,06 \pm 0,217$ para proteína), PEG-1450 ($0,45 \pm 0,096$ para exo-PG), PEG-3350 ($1,37 \pm 0,116$ para endo-PG) e PEG-10000 ($1,89 \pm 0,189$ para PL). Silva & Meirelles (2000) observaram, também o decréscimo do coeficiente de partição de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina com o aumento da massa molecular do PEG em sistemas PEG/maltodextrina.

As enzimas foram recuperadas na fase de topo para a grande maioria dos casos. Para exo-PG e proteínas este fato ocorreu apenas até PEG-1450, porém para PL e endo-PG as recuperações encontradas eram sempre maiores que 70% (Tabelas 4.21 e C-45 do Apêndice C). Tanuja *et alii* (1997) obtiveram recuperações de 38,8% para amiloglicosidase em sistemas PEG-maltodextrina (10-30%).

A purificação de PL e endo-PG foi elevada na fase de topo para massa molecular de PEG acima de 1450. Os valores obtidos para a exo-PG foram maiores na fase de fundo. PL apresentou um fator de purificação de 7,06 vezes com recuperação de 88,1%, para endo-PG encontrou-se fator de purificação de 6,16 vezes com 77,8% de recuperação, já para exo-PG o maior valor ocorreu na fase de fundo com PEG-600 (6,01 vezes com recuperação de 24,4%), como mostram as Tabelas 4.22 e C-46 do Apêndice C.

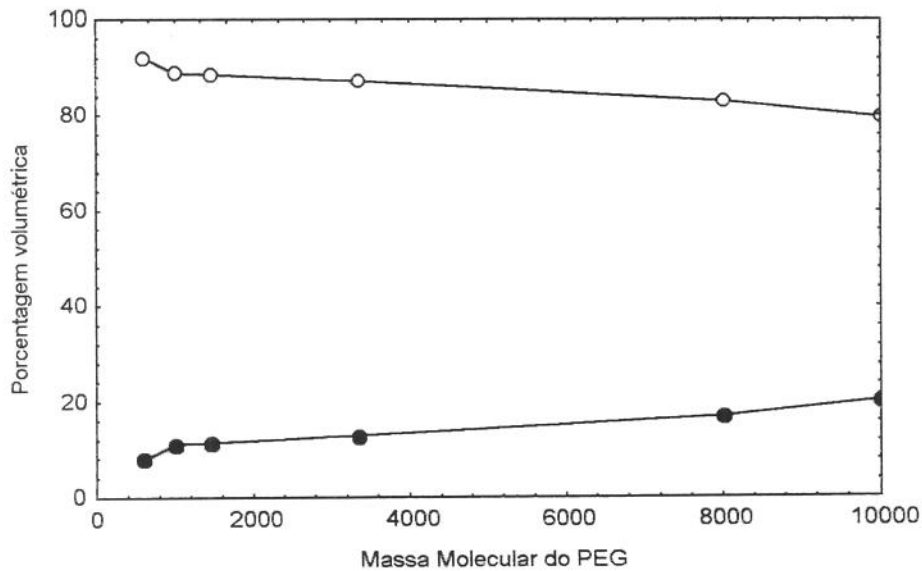


Figura 4.9: Variação da porcentagem volumétrica da fase de topo (O) e de fundo (●) dos sistemas PEG/maltodextrina (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

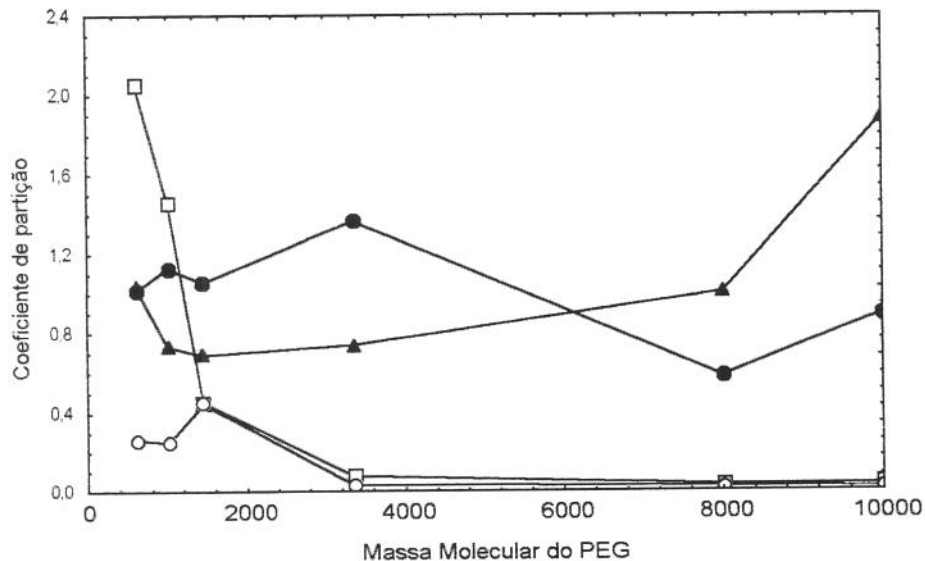


Figura 4.10: Coeficientes de partição das proteínas totais (□) e enzimas pectinolíticas (PL ▲, exo-PG ● e endo-PG ●) nos sistemas PEG/maltodextrina (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

Tabela 4.21: Recuperações (%) na fase de topo para o sistema PEG/maltodextrina (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Proteínas	PL	Exo-PG	Endo-PG
	Totais			
600	96,0	92,3	75,6	92,2
1000	92,1	85,4	66,6	90,0
1450	77,8	84,2	77,7	89,1
3350	35,0	83,4	18,3	90,3
8000	14,2	83,1	10,6	74,1
10000	12,4	88,1	6,3	77,8

Nos sistemas PEG/maltodextrina verificou-se grande ativação das enzimas, o que pode ser observado pelos valores de recuperação total acima de 100%, quando se tomou como referência inicial uma solução aquosa da enzima (Tabelas 4.23 e 4.24). Nos ensaios de influência dos constituintes do sistema aquoso bifásico na concentração de proteínas totais e atividades enzimáticas observou-se que a maltodextrina proporcionava uma grande aumento da atividade de exo-PG, o que está de acordo com os resultados obtidos no sistema bifásico. Para endo-PG o aumento da atividade foi sutil, o que é comprovado pelos rendimentos totais próximos a 100% até PEG-3350. Já para PL e para as proteínas totais os valores obtidos com os sistemas contendo apenas um dos formadores do sistema não tem correlação com os resultados obtidos no sistema bifásico. Chen & Lee (1995) verificaram que a atividade específica de quitanase na presença de PEG, dextrana e no sistema bifásico (34,2; 25,8 e 41,5 U) era maior que no sistema de referência (13,6 U), demonstrando que no sistema bifásico pode ocorrer sinergismo dos compostos aumentando (no caso exposto) ou diminuindo a atividade enzimática (como verificado neste trabalho para alguns casos).

Já os valores dos fatores de purificação foram maiores que os calculados pela forma tradicional para exo-PG e PL, com aumento de 6,0 e 7,1 com o cálculo tradicional para 19,0 e 12,7 com a nova referência (Tabela 4.25).

Tabela 4.22: Fator de purificação na fase de topo para o sistema PEG/maltodextrina (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	PL	Exo-PG	Endo-PG
600	0,96	0,79	0,96
1000	0,93	0,72	0,98
1450	1,08	1,00	1,14
3350	2,38	0,52	2,58
8000	5,79	0,73	5,39
10000	7,06	0,50	6,16

Tabela 4.23: Recuperações (%) das proteínas e da PL, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/maltodextrina (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Proteínas			PL		
	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}
600	80,0	3,4	83,4	147,9	12,4	160,3
1000	77,6	6,6	84,2	141,0	24,0	165,0
1450	70,9	20,2	91,1	132,4	24,7	157,1
3350	25,6	47,5	73,2	187,3	37,4	224,7
8000	12,7	75,7	88,4	107,9	22,1	130,0
10000	10,5	73,7	84,1	133,5	18,4	151,9

Tabela 4.24: Recuperações (%) da exo-PG e endo-PG, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/maltodextrina (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

MM Do PEG	Exo-PG			Endo-PG		
	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}
600	198,8	64,2	262,9	105,1	8,8	113,9
1000	236,4	118,4	354,8	104,3	11,6	115,8
1450	337,3	97,0	434,3	97,5	12,7	110,2
3350	27,2	121,5	148,7	98,0	10,3	108,3
8000	18,4	156,1	174,5	39,3	11,5	50,9
10000	13,8	206,6	220,4	53,8	16,4	70,2

Tabela 4.25: Fator de purificação, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/maltodextrina (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

MM	PL		Exo-PG		Endo-PG	
do PEG	FP _{topo}	FP _{fundo}	FP _{topo}	FP _{fundo}	FP _{topo}	FP _{fundo}
600	1,85	3,66	2,48	18,96	1,31	2,59
1000	1,82	3,63	3,05	17,89	1,34	1,75
1450	1,87	1,23	4,76	4,81	1,38	0,63
3350	7,31	0,79	1,06	2,56	3,82	0,22
8000	8,51	0,29	1,45	2,06	3,10	0,15
10000	12,74	0,25	1,32	2,80	5,14	0,22

4.3.1.6. Sistemas PEG/maltodextrina com adição de NaCl

Adicionou-se NaCl aos sistemas PEG/maltodextrina para estudar seu efeito nos sistemas de mesma composição e iguais condições que os anteriormente estudados. Os resultados são mostrados nas Figuras 4.11 e 4.12, nas Tabelas 4.26 a 4.30 e Tabelas C-53 a C-62 do Apêndice C.

Nestes novos sistemas não foi verificada a formação de sistema bifásico com PEG-400. O volume de fase de topo era maior que a da fase de fundo, e diminuiu com o aumento da massa molecular do PEG. A porcentagem volumétrica da fase de fundo foi maior que nos sistemas sem adição de NaCl para massa molecular de PEG acima de 1450, como pode ser visto nas Figura 4.11 e Tabela C-53 do Apêndice C.

Os desvios padrões dos coeficientes de partição variaram entre 0,002-0,053 para proteína, 0,001 - 0,187 para exo-PG, 0,007 – 0,045 para endo-PG e 0,019 - 0,679 para PL, exceto a PEG-10000 (1,725) para PL. Os coeficientes de partição das proteínas diminuíram com a elevação da massa molecular do PEG, apesar de se encontrar um valor elevado a PEG-1000.

Ocorreu diminuição do coeficiente de partição das enzimas PL (até PEG-1450) e exo-PG, que tiveram afinidades por fases diferentes, topo e fundo, respectivamente. Endo-PG apresentou coeficientes de partição próximos de 1, ou seja, se dividiu de forma praticamente igual entre as fases (exceto a PEG-8000). Os maiores valores do coeficiente de partição foram encontrados a PEG-600 ($0,70 \pm 0,187$ para exo-PG), PEG-1000 ($4,76 \pm 0,053$ para proteína e $1,11 \pm 0,007$ para endo-PG) e a PEG-10000 ($7,68 \pm 1,725$ para PL) valores mais elevados que nos sistemas sem adição de NaCl, exceto para endo-PG (Figura 4.12 e Tabela C-54 do Apêndice C).

Todas as enzimas foram recuperadas na fase de topo e a recuperação da endo-PG diminuiu com o aumento da massa molecular do PEG, assim como a da PL até PEG-1450. Com a adição de NaCl ao sistema as recuperações da exo-PG aumentaram, para PL diminuíram e para endo-PG praticamente permaneceram iguais (Tabelas 4.26 e C-55 do Apêndice C). As enzimas PL e endo-PG foram separadas na fase de topo para PEG de alta massa molecular (acima de 1450), porém no caso da exo-PG ocorreu o contrário.

Comparando-se os valores dos fatores de purificação para os sistemas com e sem adição de NaCl, observou-se que os valores nos sistemas com adição do sal eram menores com PEG de alta massa molecular para endo-PG e maiores para PL e exo-PG (Tabelas 4.27 e C-56 do Apêndice C).

As enzimas também apresentaram ativação nos sistemas com NaCl, porém apenas a adição de NaCl não aumentou ativação, pois as recuperações totais foram semelhantes aos sistemas sem NaCl. No caso da exo-PG o sal teve efeito repressor da atividade, mas promoveu o aumento da recuperação de PL (Tabelas 4.28 e 4.29) quando comparado com o sistema sem NaCl. Os fatores de purificação foram maiores quando se usou solução aquosa da enzima como referência inicial do sistema para PL e exo-PG, já a endo-PG apresentou a mesma tendência que na forma tradicional de cálculo (Tabela 4.30).

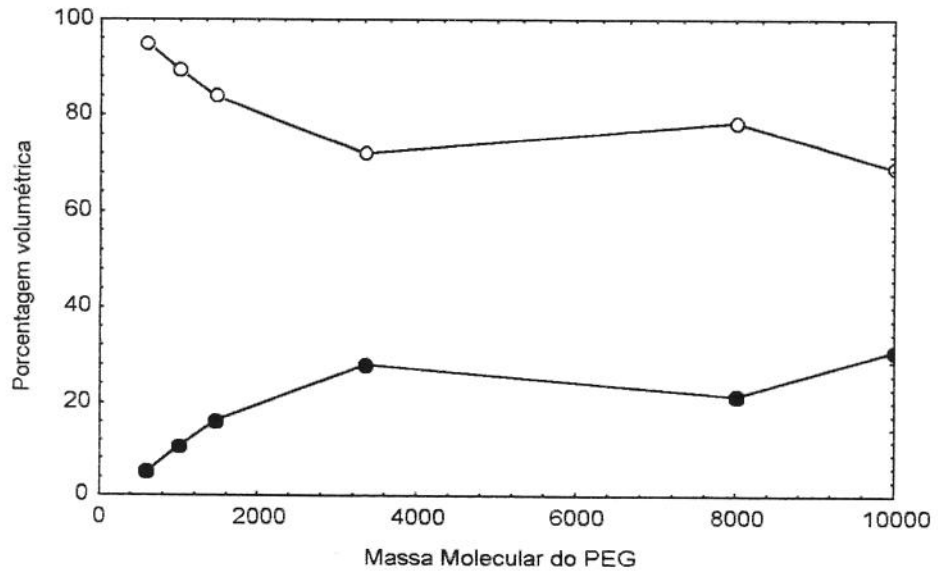


Figura 4.11: Variação da porcentagem volumétrica da fase de topo (O) e de fundo (●) dos sistemas PEG/maltodextrina (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C.

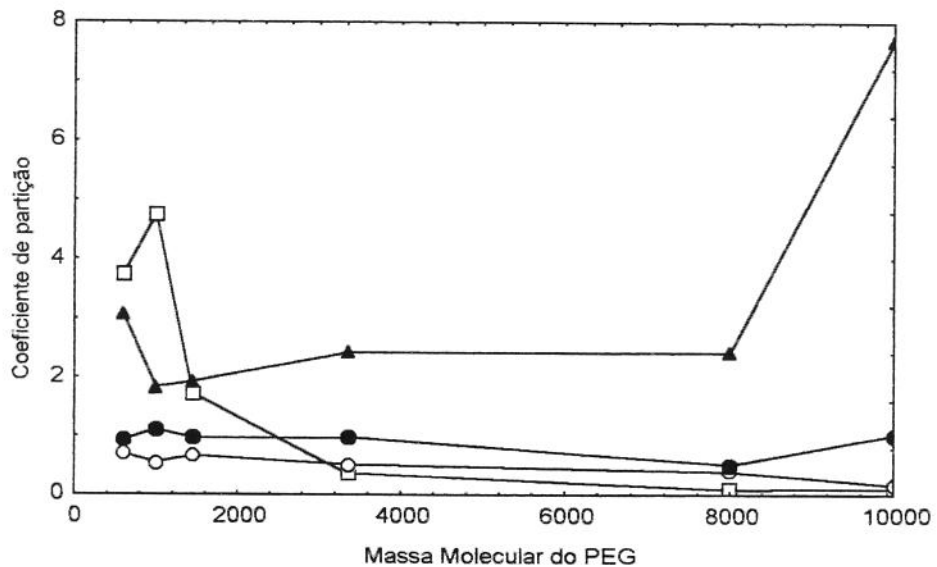


Figura 4.12: Coeficientes de partição das proteínas totais (□) e enzimas pectinolíticas (PL ▲, exo-PG ● e endo-PG ●) nos sistemas PEG/maltodextrina (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C.

Tabela 4.26: Recuperações (%) na fase de topo para o sistema PEG/maltodextrina (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Proteínas	PL	Exo-PG	Endo-PG
600	98,6	92,3	93,0	94,7
1000	97,6	85,4	82,5	90,3
1450	89,9	84,2	77,6	83,5
3350	48,3	83,4	56,7	71,7
8000	25,0	83,1	59,0	65,0
10000	19,5	88,1	26,5	69,5

Tabela 4.27: Fator de purificação na fase de topo para o sistema PEG/maltodextrina (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C.

Massa molecular do PEG	PL	Exo-PG	Endo-PG
600	1,00	0,93	0,96
1000	0,96	0,85	0,93
1450	1,01	0,85	0,93
3350	1,79	1,17	1,49
8000	3,65	2,39	2,60
10000	4,88	1,37	3,61

Tabela 4.28: Recuperações (%) das proteínas e da PL, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/maltodextrina (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Proteínas			PL		
	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}
600	143,0	2,1	145,1	163,7	3,1	166,8
1000	146,5	3,7	150,2	176,0	12,4	188,3
1450	118,8	13,4	132,2	169,7	17,1	186,8
3350	68,3	73,5	141,8	215,7	34,6	250,3
8000	34,3	105,2	139,5	251,2	28,3	279,5
10000	26,8	112,2	139,0	201,6	12,6	214,2

Tabela 4.29: Recuperações (%) da endo-PG e exo-PG, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/maltodextrina (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Exo-PG			Endo-PG		
	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}
600	81,8	7,1	88,9	110,6	6,0	116,6
1000	206,2	43,9	250,1	106,3	11,4	117,6
1450	226,4	69,4	295,8	89,6	17,8	107,4
3350	89,4	69,3	158,7	77,3	30,6	107,8
8000	204,3	143,2	347,5	37,4	21,2	58,6
10000	49,8	138,5	188,3	78,3	34,4	112,6

Tabela 4.30: Fator de purificação, utilizando como referência inicial uma solução aquosa da enzima, para o sistema PEG/maltodextrina (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C.

Massa molecular do PEG	PL		Exo-PG		Endo-PG	
	FP _{topo}	FP _{fundo}	FP _{topo}	FP _{fundo}	FP _{topo}	FP _{fundo}
600	1,14	1,56	0,57	3,53	0,77	2,99
1000	1,20	3,39	1,41	12,04	0,73	3,11
1450	1,43	1,28	1,90	5,21	0,75	1,34
3350	3,16	0,47	1,31	0,94	1,13	0,42
8000	7,32	0,27	5,95	1,36	1,09	0,20
10000	7,53	0,11	1,86	1,23	2,92	0,31

4.3. CONCLUSÕES PARCIAIS

O volume da fase de topo diminui com o aumento da massa molecular do PEG.

Nos sistemas PEG/fosfato as proteínas totais são recuperadas na fase de fundo e as enzimas na fase de topo com PEG de alta massa molecular e na fase de fundo com os de baixo massa molecular. A adição de NaCl aumenta os coeficientes de partição de PL e exo-PG, mas não influencia os coeficientes de partição de endo-PG e PE, já os fatores de purificação das enzimas são mais elevados.

Nos sistemas PEG/citrato os coeficientes de partição da PL, exo e endo-PG diminuem com o aumento da massa molecular do PEG. A adição de NaCl não traz vantagens no coeficiente de partição da endo-PG, porém melhora as recuperações.

Nos sistemas PEG/maltodextrina as razões volumétricas entre as fases de topo e de fundo são bastante altas, devido ao baixo volume da fase de fundo. Os coeficientes de partição diminuem com o aumento da massa molecular do PEG, exceto para PL e são menores que nos sistemas onde é adicionado NaCl. As enzimas são recuperadas na fase de topo em todos os sistemas. Os fatores de purificação são fortemente influenciados pela massa molecular do PEG.

CAPÍTULO 5

PARTIÇÃO DAS ENZIMAS PECTINOLÍTICAS PRODUZIDAS POR *Aspergillus niger* NRRL-3122 EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

5.1. INTRODUÇÃO

Os processos fermentativos produzem além da substância desejada, subprodutos e massa celular, devido a isto os mercados consumidores destas biomoléculas apresentam rigorosas exigências de utilização no tocante a qualidade e pureza, principalmente nos que serão utilizados pelas indústrias farmacêuticas e de alimentos. Para suprir estas exigências várias técnicas de purificação, com diferentes graus de complexibilidade, surgiram ao longo dos anos. Estas técnicas são responsáveis pelo alto custo de produção destes biocompostos, principalmente das enzimas que requerem maior cuidado, pois devem conservar suas propriedades catalíticas.

Uma das técnicas de separação empregada é a extração líquido-líquido utilizando sistemas aquosos bifásico, que permite a fácil ampliação de escala, elimina etapas do processo e diminui a desnaturação das enzimas devido ao alto conteúdo de água na formação das fases.

As enzimas pectinolíticas possuem grande aplicabilidade na indústria, pois diminui a viscosidade de suco de frutas e conseqüentemente evita problemas na concentração dos sucos, bem como na clarificação dos mesmos. Os complexos enzimáticos de pectinases contêm PE que produz metanol. Esta produção prejudica a qualidade dos sucos, fazendo-se necessário que técnicas de purificação da enzima pectinolítica seja desenvolvida a fim de se eliminar a PE.

O objetivo deste capítulo é determinar os coeficientes de partição e conseqüentemente as recuperações e fatores de purificação das enzimas produzidas pela fermentação em sistemas PEG/fosfato de potássio, PEG/citrato de sódio e PEG/maltodextrina em diferentes massas moleculares de PEG com e sem presença de NaCl.

5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1. Microrganismo e Meio de Cultura

Utilizou-se *Aspergillus niger* NRRL-3122 para produzir as enzimas pectinolíticas, pois foi o microrganismo que melhor produziu as maiores atividades enzimáticas (principalmente a exo e endo-PG), como exposto no Capítulo 3. Este microrganismo foi obtido da Fundação de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello”, sendo mantido em estoque em agar inclinado de acordo com o catálogo da Fundação “André Tosello”. O meio de cultura, escolhido entre os três utilizados e citados no item 3.2.1 do Capítulo 3, apresenta a composição mostrada na Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Composição do meio de cultura.

Componentes	Composição (% p/v)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,10
KH ₂ PO ₄	0,05
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05
Extrato de levedura	0,20
Glicose	2,00
Pectina	1,00

Fonte: RUIZ *et alli* (1988).

5.2.2. Condições das Fermentações

Utilizou-se um fermentador de bancada (Bioflo de 5 L de capacidade) com volume de trabalho de 4 L. A fermentação foi conduzida a pH inicial de 4,5; agitação de 200 rMM, inóculo contendo aproximadamente 6×10^7 esporos/mL (10% do volume do meio), aeração de 2 L/min e temperatura de 28°C.

5.2.3. Concentração das Enzimas

O processo de concentração das enzimas, obtidas através da fermentação e ilustrado pelo fluxograma, é apresentado na Figura 5.1. O caldo fermentado foi coletado após 10 dias de fermentação e filtrado em papel de filtro para a retirada dos fungos. Após a filtração as enzimas contidas no caldo foram precipitadas com etanol absoluto a -20°C na proporção de 1 parte de caldo para 3 de álcool. O precipitado foi resuspenso em água destilada com volume 10 vezes menor que o do caldo fermentado utilizado. A suspensão contendo as enzimas foi dialisada a 4°C por toda noite (mínimo de 12 h) para a eliminação de sais da fermentação que ainda estavam presentes.

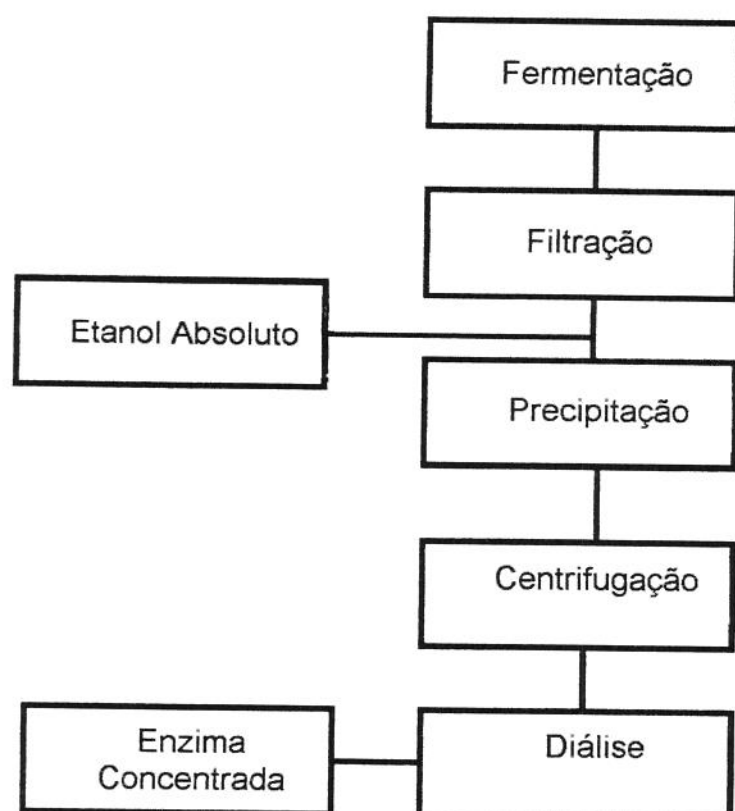


Figura 5.1: Fluxograma da concentração do caldo fermentado.

5.2.4. Sistema Aquoso Bifásico

Os sistemas utilizados foram o PEG/fosfato de potássio, PEG/citrato de sódio e PEG/maltodextrina formado com PEG's de massas moleculares de 400, 600, 1000, 1450, 3350, 8000 e 10000, caldo fermentado e com e sem adição de NaCl (6%) a pH 7,0 e temperatura de 4°C, para evitar condições desnaturantes.

Estes sistemas foram preparados a partir da adição direta no caldo fermentado dialisado os constituintes do sistema aquoso bifásico (PEG, fosfato de potássio, constituído de uma mistura de KH_2PO_4 e K_2HPO_4 na razão de 1,087 (p/p) que gerava uma solução a pH 7,0, citrato de sódio, ajustada a pH 7 com ácido cítrico, maltodextrina, ajustada a pH 7,0 com tampão fosfato, e em alguns casos cloreto de sódio), de modo a se obter um sistema bifásico com PEG a 20%, segundo componente a 15%, e para algumas extrações NaCl a 6%. As soluções foram preparadas no mesmo dia de montagem dos sistemas.

As misturas foram agitadas em vórtice por 2 min, seguindo-se da centrifugação dos tubos a 2900 g por 10 min, com a finalidade de acelerar a separação de fases. O sistema foi mantido em repouso a 4°C em banho termostático por toda a noite (mínimo de 18 h) para que o sistema entrasse em equilíbrio. Após esse tratamento as fases tornaram-se claras e transparentes e a interface entre elas bem nítida. As fases foram separadas com auxílio de seringas, tomando-se o cuidado de não perturbar o equilíbrio. O volume de cada fase foi medido em provetas graduadas. Alíquotas das fases de topo e fundo foram retiradas e analisadas quanto às atividades enzimáticas (endo e exo-PG, PL e PE) e proteína total. Determinou-se o valor do coeficiente de partição da enzima e da proteína, recuperação e fator de purificação de acordo com as equações 4.1 a 4.9 do Capítulo 4.

5.2.5. Determinação da Massa Celular Seca

As células de leveduras foram separadas do meio de cultura por centrifugação e as de fungo foram separadas por filtração em papel de filtro

Whatmann nº 52. Em seguida as células foram secas em estufa a vácuo a 60°C até peso constante.

5.2.6. Determinação da Concentração de Proteínas Totais

As proteínas totais foram determinadas pelo método de Bradford (1976), utilizando Albumina Bovina como padrão.

5.2.7. Determinação da Concentração dos Açúcares Redutores

A concentração de açúcares redutores foi determinada pelo método de SOMOGY (1952), utilizando ácido galacturônico como padrão.

5.2.8. Determinação da Concentração de Metanol

A concentração de metanol foi determinada pelo método de Wood & Siddiqui (1971).

5.2.9. Determinação da Concentração de Glicose

A concentração de glicose foi determinada conforme o procedimento do catálogo técnico do reagente Glicose Enz-Color descrito no item 3.2.8 do Capítulo 3.

5.2.10. Determinação da Atividade de Poligactoronase (PG)

As atividades de endo e exo-PG foram determinadas de acordo com Kotzekidou (1991) e Pereira *et alli* (1993). Uma unidade de endo-PG foi definida como a quantidade de enzima que reduz 1% a viscosidade da solução por minuto.

E uma unidade de exo-PG foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido galacturônico por min a 37°C e pH 4,5.

Em todas as determinações das atividades enzimáticas, foram utilizados brancos formados com a mesma composição da reação enzimática, mas com a enzima inativada por incubação em banho-maria a 100°C por 10 min. Este procedimento teve como objetivo eliminar as influências dos componentes do sistema e determinar apenas o efeito da ação enzimática sobre o substrato.

5.2.11. Determinação da Atividade de Pectina-liase (PL)

A atividade de PL foi determinada pelo monitoramento do aumento da absorbância a 235 nm, devido à produção de compostos 4,5 insaturados (Albersheim & Killias, 1962; Alaña *et alli*, 1989). Uma unidade de PL foi definida como a quantidade de enzima que produz um aumento de uma unidade de absorbância a 235 nm por minuto.

5.2.12. Determinação da Atividade de Pectina-esterase (PE)

A atividade da PE foi determinada pela quantificação do metanol liberado no meio, de acordo com Wood & Siddiqui (1971). Uma unidade de PE foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de metanol por min a 40°C.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. Produção das Enzimas Pectinolíticas

Para se realizar o processo de extração em sistema aquoso bifásico das enzimas pectinolíticas, fermentou-se pectina comercial tipo 8002 utilizando-se *Aspergillus niger* NRRL-3122 à 28°C e pH inicial 4,5, para a produção destas enzimas. Os resultados da fermentação são apresentados nas Figuras 5.2 a 5.3 e Tabelas D-1 e D-2 do Apêndice D.

O microrganismo apresentou fase de crescimento exponencial de 24 h seguida pela fase estacionária de crescimento celular após 72h de fermentação. Entretanto ocorreu a diminuição da concentração de massa seca entre 144 e 168h, a partir da qual houve aumento da massa seca. Este comportamento pode ter sido causado pela adaptação do microrganismo ao substrato, mais difícil de ser degradado (pectina), já que a glicose presente no meio de cultura tinha sido rapidamente degradada e não foi detectada no caldo fermentado a partir de 96h de fermentação, quando ocorreu a maior concentração de massa seca na fase estacionária de crescimento celular (12,09 g/L). Isto denota que a glicose contribuiu para o aumento da massa seca. *Perreira et alli* obtiveram uma concentração máxima de 15,24 g/L a 120 h de fermentação utilizando *Aspergillus niger*. *Schmidt et alli* (1995) observaram na fermentação com o mesmo microrganismo uma fase exponencial de 24h.

O pH da fermentação diminuiu com o tempo atingindo o menor valor (2,33) a 96 h, devido à produção de ácidos gerados na degradação da glicose. *Friedrich et alli* (1992) observaram também decréscimo do pH da fermentação, com *Aspergillus niger*, até atingir 2,3 ao final da fermentação. *Schimid et alli* (1995) detectaram pH igual a 2,00 na fase de crescimento exponencial. A concentração de proteína aumentou nas primeiras 24 h de fermentação, possivelmente devido à produção de matéria protéica, como enzimas, que foram geradas para a degradação da glicose.

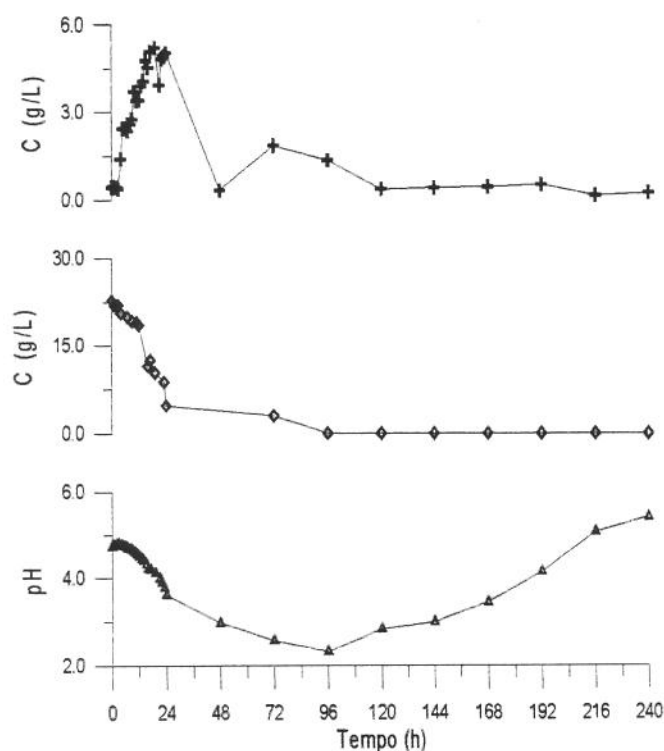


Figura 5.2: Comportamento do valor do pH ($\triangle$) e das concentrações de proteína ($\square$) e de glicose ($\diamond$) na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Aspergillus niger* NRRL-3122 a 28°C e pH inicial 4,5.

A Endo-PG foi produzida apenas após 120 h de fermentação quando o pH da fermentação voltava a aumentar, a máxima atividade ocorreu a 216 h (39,89 U/mL). Exo-PG foi produzida a partir de 48 h, o que também foi verificado por Fonseca & Said (1995) utilizando *Penicillium frequentans*, atingindo máxima atividade à 144h 0,34 U/mL. Pereira *et alli* (1995) obtiveram uma atividade máxima de exo-PG de 0,85 U/mL utilizando o mesmo microrganismo deste trabalho. As poligalacturonases foram produzidas quando não se verificava presença de glicose no meio, pois o microrganismo necessitava produzir enzimas que degradassem a pectina, que sendo mais difícil de serem degradadas foram consumidas após o consumo da glicose. Schwann *et alli* (1997) também

observaram que as poligalacturonases foram obtidas na fase de crescimento estacionário de leveduras.

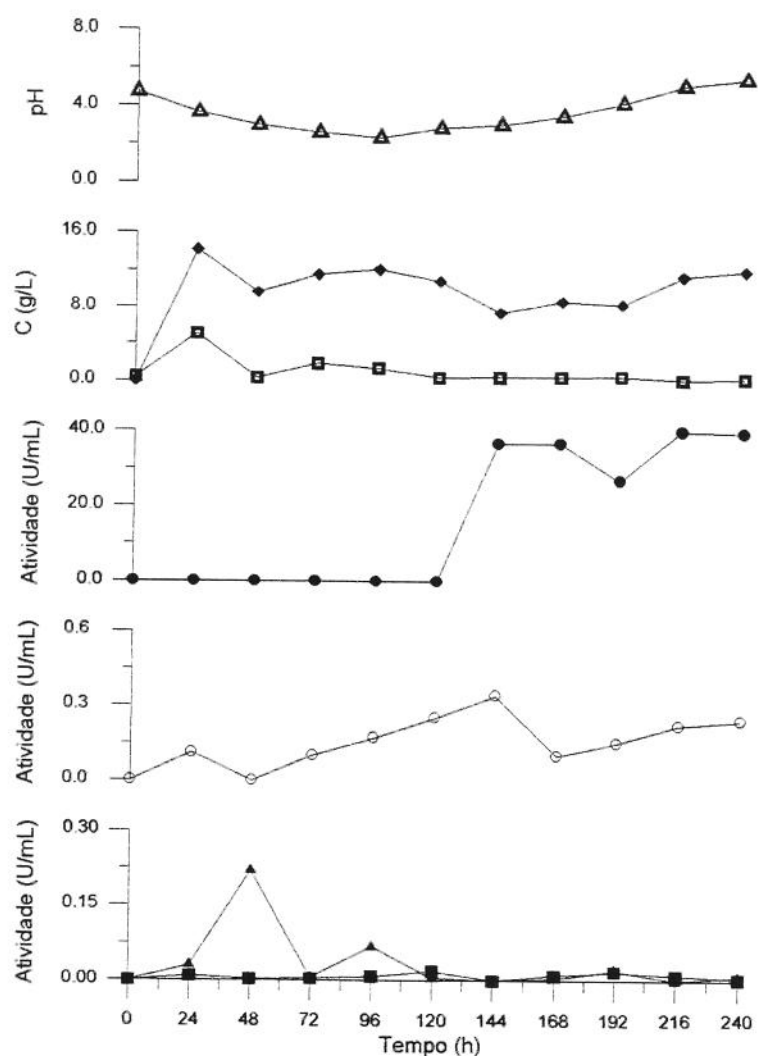


Figura 5.3: Comportamento das atividades enzimáticas (PE-■; PL-▲, exo-PG-O e endo-PG-●), das concentrações de massa seca (◆) e de proteína (□) e do valor do pH (△) na fermentação por *Aspergillus niger* NRRL-3122 a 28°C e pH inicial 4,5.

PL foi produzida no início (0,22 U/mL à 48h) e ao final da fermentação, quando as atividades foram bastante baixas quando comparadas com o valor máximo inicial. Brumano *et alli* (1993) utilizando *Penicillium griseoroseum*,

verificaram que a PL era produzida mais pronunciadamente na fase de morte celular. A PE foi produzida de forma irregular em três diferentes zonas com máximo ocorrendo a 120 h (0,61 U/mL).

5.3.2. Precipitação Enzimática

Alguns autores precipitaram enzimas pectinolíticas com etanol absoluto a -20°C (Polizeli *et alli*, 1991; Singh *et alli*, 1999b). Para verificar a melhor razão volumétrica de etanol e caldo fermentado que precipitava maior quantidade de enzimas, utilizou-se a Pectinex-3XL (descrita no Capítulo 4) e razões de volume de enzima por etanol entre 1:10 a 1:1, como mostram a Figura 5.4 e Tabela D-3 do Apêndice D. Observou-se que a partir da razão 1:3 a massa de precipitado permaneceu praticamente constante, o que indica ser esta razão suficiente para precipitar o material protéico (incluindo as enzimas) o que esta de acordo com os resultados obtidos pelos autores acima citados.

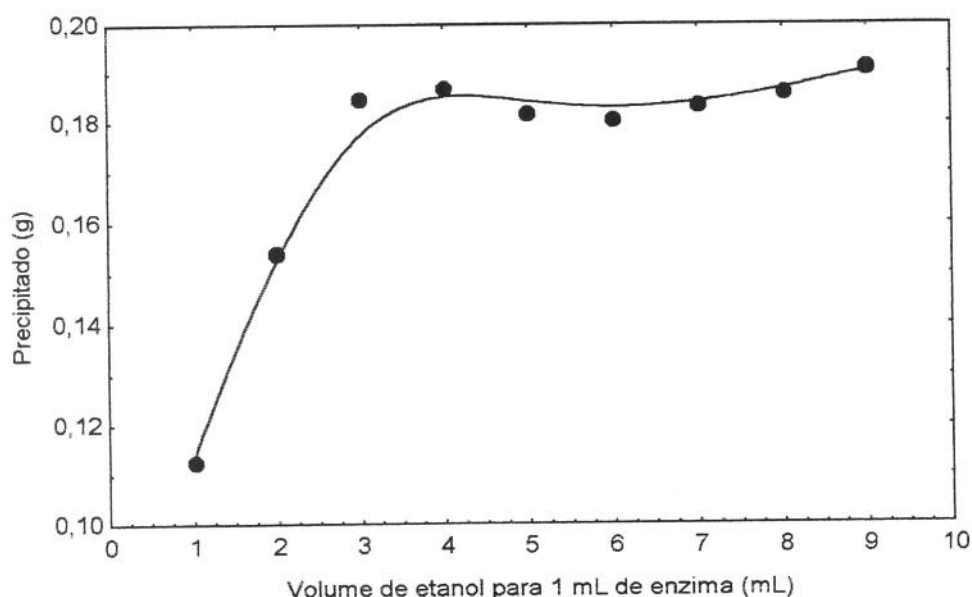


Figura 5.4: Precipitação de enzimas pectinolíticas contidas na enzima comercial Pectinex 3XL com etanol a -20°C em diferentes proporções de etanol e enzima.

5.3.3. Ensaios de Extração

5.3.3.1. Sistema PEG/fosfato de potássio

Para que se pudesse quantificar, no processo de purificação através de sistemas aquosos bifásicos, as enzimas pectinolíticas obtidas na fermentação foram concentradas de acordo com o procedimento descrito no item 5.2.3.

As enzimas fermentadas tiveram fatores de concentração diferenciados após o procedimento de concentração aplicado, as PG apresentaram fatores praticamente iguais em torno de 5 vezes, já as proteínas e a PE tiveram valores de concentração bastante elevados, o que não foi verificado com a PL. Após o processo de diálise, a concentração de proteínas totais e das atividades enzimática (exceto PE) foram menores que os obtidos somente com a precipitação com etanol a -20°C , como mostra a Tabela 5.2.

Tabela 5.2: Resultados da concentração do caldo fermentado de *Aspergillus niger* NRRL-3122 para as extrações com os sistemas PEG/fosfato de potássio com e sem NaCl.

Análise	Fermentação	Precipitação	Diálise	Fator de Concentração
Proteína (mg)	$0,13 \pm 0,008$	$1,30 \pm 0,104$	$1,24 \pm 0,032$	9,5
PE (U/mL)	$0,001 \pm 0,000$	$0,008 \pm 0,000$	$0,028 \pm 0,004$	28,0
PL (U/mL)	$0,10 \pm 0,004$	$0,27 \pm 0,060$	$0,03 \pm 0,003$	0,3
Exo-PG (U/mL)	$0,32 \pm 0,039$	$2,83 \pm 0,043$	$1,67 \pm 0,000$	5,2
Endo-PG (U/mL)	$27,94 \pm 2,414$	$162,95 \pm 8,518$	$154,12 \pm 10,478$	5,5

No processo de concentração tentou-se obter um valor em torno de 10 vezes, o que não foi atingido para PL, exo e endo-PG, que tiveram perda de atividade. Singh *et alli* (1999b) também verificaram perda de atividade das enzimas pectinolíticas após precipitação com etanol a -20°C . Apesar das perdas os valores do fator de concentração obtidos neste trabalho foram maiores que os

obtidos por Kapoor *et alli* (2000), que obtiveram um fator de 2,5 vezes, quando precipitou as enzimas com sulfato de amônia a 90% de saturação. Mesmo com a redução das atividades o procedimento de diálise foi necessário para a eliminação dos sais da fermentação que poderiam alterar a formação do sistema bifásico.

No processo de extração das enzimas foram utilizados PEG's de massa molecular variando entre 400 e 10000 Da. Entretanto observou-se que nos sistemas com PEG-400 e 600 não ocorria a formação de sistema bifásico. Rito-Palomares & Cueto (2000) observaram que biomoléculas têm potencial implicação na formação do sistema aquoso bifásico, pois provocam modificações na posição da curva binodal no diagrama de fase devido ao acúmulo destas biomoléculas em uma das fases gerando uma modificação da razão volumar. Os resultados das extrações são apresentados nas Figuras 5.5 e 5.6 e nas Tabelas D-4 a D-12 do Apêndice D.

Com o aumento da massa molecular do PEG ocorreu a diminuição da porcentagem volumétrica da fase de topo, como mostram a Figura 5.5 e Tabela D-4 do Apêndice D. Esta porcentagem da fase de topo foi maior que nos experimentos com a enzima comercial apresentada no Capítulo 4, mostrando assim que os componentes ainda presentes no caldo fermentado após a diálise diminuem a exclusão de água para a fase de fundo.

Os desvios padrões dos coeficientes de partição variaram entre 0,000-0,064 para proteína, 0,000-0,500 para PE, 0,001-0,159 para PL, 0,030-0,239 para exo-PG e 0,001-0,011 para endo-PG, como mostra a Tabela D-5 do Apêndice D. As enzimas e as proteínas apresentaram os maiores valores de coeficiente de partição nos sistemas formados com PEG de alta massa molecular ($0,78 \pm 0,026$ para proteínas, $2,57 \pm 0,159$ para PL, $1,77 \pm 0,239$ para exo-PG, $0,06 \pm 0,011$ para endo-PG em PEG-8000 e $9,50 \pm 0,500$ pra PE em PEG-10000) como mostra a Figura 5.6.

Verificou-se que nos sistemas formados com PEG-10000 ocorreu a separação da PE das outras enzimas e das proteínas. A PE concentrava-se na fase de topo e apresentava coeficiente de partição de $9,50 \pm 0,500$. As outras enzimas e proteínas totais apresentaram coeficientes de partição menores que 1,

ou seja, concentraram-se na fase de fundo, exceto a exo-PG cujo coeficiente de partição foi de 1,15 o que significa dizer que se distribuiu uniformemente entre as fases.

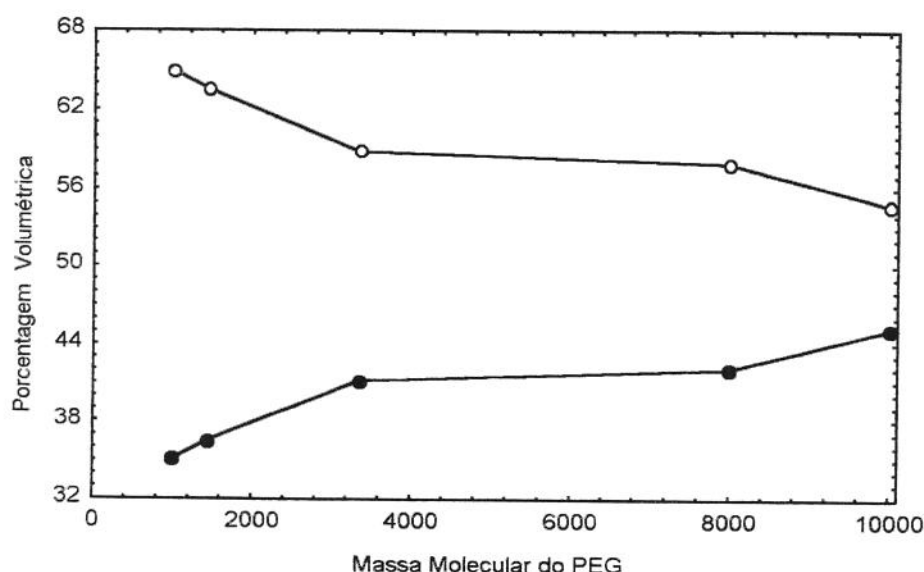


Figura 5.5: Variação da porcentagem volumétrica da fase de topo (●) e de fundo (○) dos sistemas PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C na separação de enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* NRRL-3112.

A endo-PG teve valores de coeficiente de partição bem baixos (menores que 0,06) o que indica a afinidade da enzima pela fase de fundo, fato reforçado pelas baixas recuperações na fase de topo. Comparando-se com os valores obtidos nos sistemas com enzima comercial (Capítulo 4), verificou-se que nos sistemas reais os coeficientes de partição foram bem maiores, o que não foi observado no caso da PL. Nestes sistemas com o caldo fermentado ocorreu uma diminuição do coeficiente de partição em PEG-3350 e 8000, exceto para a endo-PG, que com estes PEG's apresentou valores mais elevados. Gonzalez *et alii* (1990) observaram que β -galactosidase tinha maior afinidade pela fase de topo.

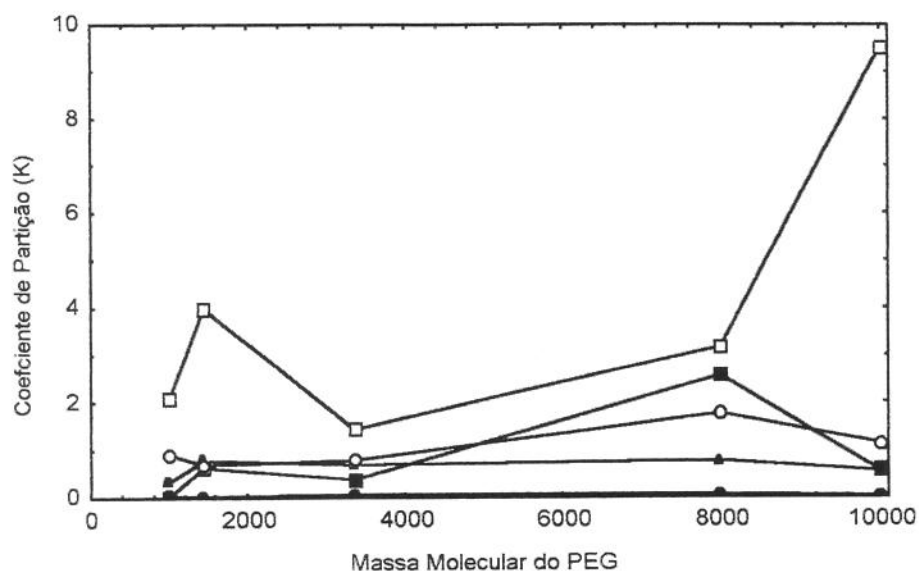


Figura 5.6: Coeficientes de partição das proteínas totais (□) e enzimas pectinolíticas (PE-■, PL-▲, exo-PG-○ e endo-PG-●) de *Aspergillus niger* NRRL-3112 nos sistemas PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

As recuperações de PE na fase de topo foram sempre maiores que 50%, indicando a preferência de enzima por esta fase, já as outras enzimas e as proteínas totais tenderam, na maioria dos casos, a recuperações menores ou próximas a 50% (Tabela 5.3 e D-6 do Apêndice D para a fase de fundo).

Tabela 5.3: Recuperações (%) na fase de topo para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Proteína	PE	PL	Exo-PG	Endo-PG
1000	38,1	79,43	3,85	62,76	5,88
1450	57,7	87,42	52,39	54,75	4,17
3350	49,7	67,26	35,05	53,02	7,86
8000	51,7	81,36	77,96	70,91	7,61
10000	40,1	92,02	41,14	58,26	2,59

A PE contida no caldo fermentado recuperado em maior quantidade na fase de topo, quando comparada com os valores de recuperação obtidos com as enzimas contidas em complexo multienzimático comercial. Já para as outras enzimas e proteínas ocorreu o inverso. Papamichael *et alli* (1992) obtiveram recuperações de 42% para fumerase com concentração de PEG de 17%.

As endo-PG foram purificadas na fase de topo o que difere do comportamento desta enzima contida em complexo enzimático comercial, o que também foi verificado com a PL em valores de massas moleculares de PEG baixos. Os maiores fatores de purificação ocorreram na fase de topo com PEG-1000 (exo-PG 1,65 vezes), PEG-3350 (endo-PG 0,16 vezes), PEG-8000 (PL 1,51 vezes) e PEG-10000 (PE 2,29), como mostram as Tabelas 5.4 e D-7 do Apêndice D para a fase de fundo. Estes valores estão abaixo dos obtidos com a enzima comercial. Gupta *et alli* (1993) obtiveram fator de purificação de 3,8 vezes com rendimento de 4,4% após duas etapas de precipitação por afinidade. Este valor é mais elevado que os obtidos neste trabalho, porém vale salientar que o processo aqui empregado ocorreu em apenas um passo com rendimentos de 62,8% para exo-PG, 7,9% para endo-PG, 78,0% para PL e 92,0% para PE com os PEGs que geraram os maiores fatores de purificação.

Tabela 5.4: Fator de purificação na fase de topo para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	PE	PL	Exo-PG	Endo-PG
1000	2,07	0,10	1,65	0,15
1450	1,53	0,92	0,95	0,07
3350	1,36	0,70	1,07	0,16
8000	1,57	1,51	1,37	0,15
10000	2,29	1,02	1,45	0,06

Utilizando como referência inicial o caldo fermentado foi observado que as recuperações totais das enzimas são extremamente influenciadas pelo sistema

(Tabelas 5.5 e 5.6), com ativação de PE, PL e exo-PG apesar de ter sido verificado que os PEG inativaram exo-PG nos experimentos envolvendo a influência dos formadores do sistema aquoso bifásico (Capítulo 1). A ativação da enzima pode ser devida ao efeito sinérgico dos componentes formadores. Os fatores de purificação foram mais elevados que nos casos onde se estabeleceu como referência inicial à soma das concentrações de proteínas ou atividades enzimáticas na fase de topo e fundo (Tabela 5.7).

Tabela 5.5: Recuperações (%) das proteínas, PE e PL, utilizando como referência inicial o caldo fermentado e dialisado, para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Proteína			PE			PL		
	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}
1000	15,55	25,29	40,85	92,93	25,08	118,01	43,30	1091,1	1134,4
1450	59,26	44,12	103,39	72,66	10,45	83,11	322,31	291,2	613,5
3350	45,91	46,61	92,52	303,22	147,15	450,37	355,15	660,4	1015,6
8000	37,72	35,24	72,96	157,55	36,10	193,65	385,05	108,9	493,9
10000	24,98	37,28	62,27	149,09	12,92	162,01	94,44	136,7	231,2

Tabela 5.6: Recuperações (%) da PL e PE, utilizando como referência inicial o caldo fermentado e dialisado, para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Exo-PG			Endo-PG		
	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}
1000	86,83	51,53	138,35	3,56	56,95	60,50
1450	66,53	55,32	121,85	2,61	59,98	62,59
3350	49,93	44,03	93,96	3,40	39,78	43,18
8000	110,93	45,94	156,87	2,90	35,21	38,11
10000	56,26	40,32	96,58	2,25	84,84	87,09

Tabela 5.7: Fator de purificação, tomando como referência inicial o caldo fermentado e dialisado, para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/5%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	PE		PL		Exo-PG		Endo-PG	
	FP _{topo}	FP _{fundo}	FP _{topo}	FP _{fundo}	FP _{topo}	FP _{fundo}	FP _{topo}	FP _{fundo}
1000	5,98	0,99	2,78	43,13	5,58	2,04	0,23	2,25
1450	1,23	0,24	5,44	6,60	1,12	1,25	0,04	1,36
3350	6,61	3,16	7,74	14,17	1,09	0,94	0,07	0,85
8000	4,18	1,02	10,21	3,09	2,94	1,30	0,08	1,00
10000	5,57	0,35	3,78	3,67	2,25	1,08	0,09	2,28

5.3.3.2. Sistema PEG/fosfato de potássio com adição de NaCl

Para verificar a influência da adição de cloreto de sódio na separação das enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* NRRL-3122, adicionou-se 6 % de NaCl ao sistemas. Os resultados são mostrados nas Figuras 5.7 e 5.8, Tabelas 5.8 a 5.12 e Tabelas D-13 a D-19 do Apêndice D. A separação das fases nos sistemas com adição de NaCl foi mais influenciada pela presença de biomoléculas que os sem adição do sal, pois ocorreu formação de fases apenas com PEG-3350, 8000 e 10000 quando adicionou-se o NaCl.

As porcentagens volumétricas das fases tiveram pouca influência com a adição do NaCl. A porcentagem para a fase de topo diminuiu com o aumento da massa molecular do PEG, como mostram a Figura 5.7 e Tabela D-13 do Apêndice D. Os desvios padrões dos coeficientes de partição variaram entre 0,000-0,037 para as proteínas, 0,021-1,611 para PE, 0,030-0,471 para PL, 0,023-0,094 para exo-PG e 0,020-0,062 para endo-PG.

Em PEG-8000, os coeficientes de partição para as proteínas, PL e endo-PG apresentaram mínimo valor e para a PE máximo valor. A exo-PG teve aumento progressivo do valor do coeficiente. Os maiores valores do coeficiente de partição foram verificados a PEG-3350 ($0,85 \pm 0,037$ para proteínas e $1,29 \pm 0,062$ para endo-PG e $13,79 \pm 0,471$ para PL), PEG-8000 ($10,46 \pm 1,611$ para PE) e PEG-10000 ($1,25 \pm 0,023$ para exo-PG). Com PEG-8000 e 10000 observou-se a maior afinidade das proteínas e das enzimas na fase de fundo comprovado pelos resultados menores que 1,0 para os coeficientes de partição. Estes dados podem ser vistos na Figura 5.8 e na Tabela D-14 do Apêndice D.

A adição de NaCl diminuiu o coeficiente de partição para a exo-PG e endo-PG (exceto a PEG-1000), o que está de acordo com Albertsson *et alli* (1990) que verificaram o decréscimo do coeficiente de partição na presença dos íons Na^+ e Cl^- . Já Krone & Kula (1978) observaram a diminuição do coeficiente de partição de α -glucosidase em sistemas PEG-400/dextrana.

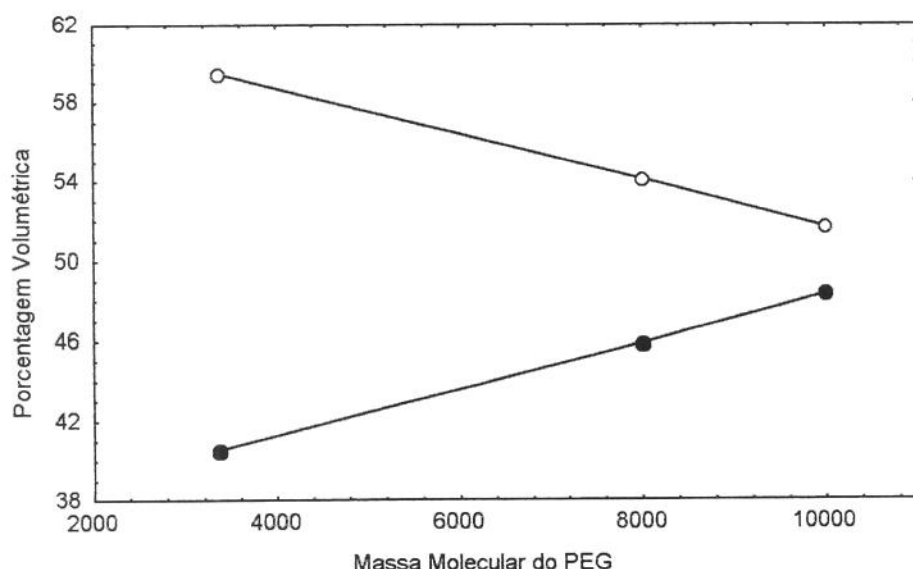


Figura 5.7: Variação da porcentagem volumétrica da fase de topo (O) e de fundo (●) dos sistemas PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C na separação de enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* NRRL-3112.

Para PL e PE não foi verificada esta diminuição. Falco *et alli* (2000) observaram que o melhor valor para o coeficiente de partição de α -galactosidase de *Sesbania marginata* ocorria em sistema PEG-1500/fosfato na ausência de NaCl. Observou-se que PEG-8000 apresentou uma boa separação de PE (que se concentrava na fase de topo) das proteínas e das outras enzimas (que se concentravam na fase de fundo). Utilizando PEG-3350 verificou-se ótima separação de PL.

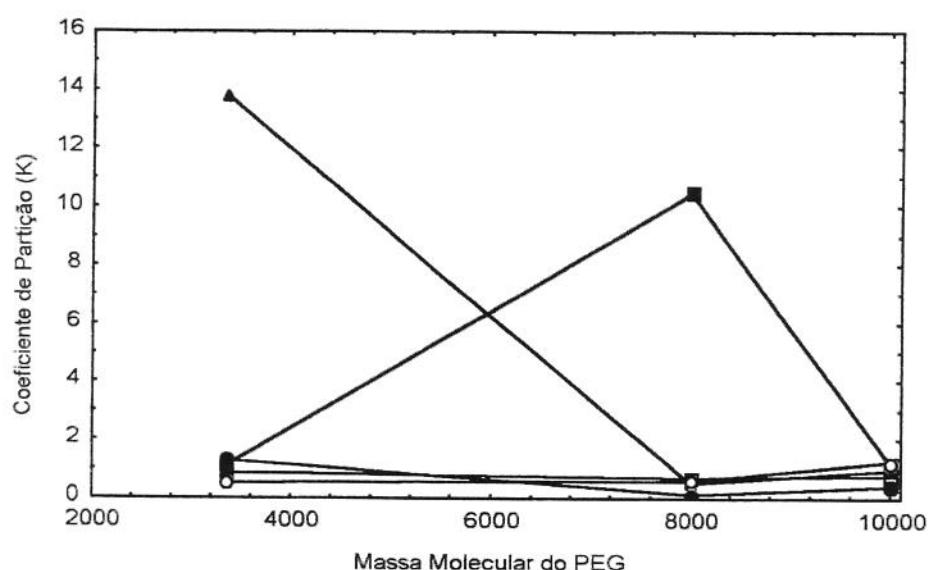


Figura 5.8: Coeficientes de partição das proteínas totais (□) e enzimas pectinolíticas (PE-■, PL-▲, exo-PG-O e endo-PG-●) de *Aspergillus niger* NRRL-3112 nos sistemas PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

As recuperações na fase de topo tiveram tendência semelhante à obtida para os coeficientes de partição. A adição de NaCl diminuiu a recuperação de exo-PG, porém aumentou os valores para as outras proteínas e enzimas pectinolíticas (Tabelas 5.8 e D-15 do Apêndice D para a fase de fundo). Os fatores de purificação da fase de topo foram em geral menores exceto para endo-PG que

sofreu aumento. Contudo ainda era menor que 1 para os PEG-8000 e 10000 (Tabelas 5.9 e D-16 do Apêndice D para a fase de fundo). Bradoo *et alli* (1995) observaram rendimentos baixos para lipase ácida (5,3 %) e neutra (15,2%) em sistemas PEG-600/fosfato (70/40%).

Tabela 5.8: Recuperações (%) na fase de topo para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Proteína	PE	PL	Exo-PG	Endo-PG
3350	55,44	61,21	95,28	42,86	65,34
8000	44,29	92,50	37,83	41,27	12,66
10000	45,70	56,03	50,58	57,16	30,61

Tabela 5.9: Fator de purificação na fase de topo para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	PE	PL	Exo-PG	Endo-PG
3350	1,10	1,72	0,77	1,18
8000	2,09	0,85	0,93	0,29
10000	1,22	1,09	1,25	0,67

Utilizando como referência inicial o caldo fermentado e dialisado, notou-se a mesma tendência de ativação e inativação causado pelos constituintes do sistema que nos experimentos sem NaCl (Tabelas 5.10 e 5.11). Apesar de não serem tão altos quanto os deste trabalho os valores de recuperação em uma fase obtidos por Falco *et alli* (2000) para α -galactosidase de *Sesbania marginata* foram de 120% sem adição de NaCl e de 144% e 131% com a incorporação de 6% e 12% de NaCl no sistema, respectivamente. Estes valores mostram que o problema de tomada de referência inicial está presente na determinação das recuperações e fatores de purificação. Os fatores de purificação apresentaram valores de purificação maiores com a mudança do sistema de referência inicial da mesma forma que os sistemas sem NaCl (Tabela 5.12).

Tabela 5.10: Recuperações (%) das proteínas, PE e PL, utilizando como referência inicial o caldo fermentado e dialisado, para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Proteína			PE			PL		
	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}
3350	47,6	38,4	86,0	246,6	156,7	403,3	318,7	15,8	334,4
8000	46,5	58,5	105,0	557,6	46,0	603,5	358,4	590,6	949,0
10000	31,7	37,7	69,4	147,8	117,6	265,4	418,1	418,2	836,3

Tabela 5.11: Recuperações (%) de exo-PG e endo-PG, utilizando como referência inicial o caldo fermentado e dialisado, para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Exo-PG			Endo-PG		
	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}
3350	35,90	47,92	83,82	34,26	18,18	52,44
8000	51,92	74,58	126,50	5,35	36,95	42,30
10000	63,31	47,46	110,77	23,03	52,21	75,24

Tabela 5.12: Fator de purificação, utilizando como referência inicial o caldo fermentado e dialisado, para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	PE		PL		Exo-PG		Endo-PG	
	FP _{topo}	FP _{fundo}	FP _{topo}	FP _{fundo}	FP _{topo}	FP _{fundo}	FP _{topo}	FP _{fundo}
3350	5,18	4,08	6,70	0,41	0,75	1,25	0,72	0,47
8000	12,00	0,79	7,71	10,10	1,12	1,28	0,12	0,63
10000	4,66	3,12	13,19	11,09	2,00	1,26	0,73	1,38

5.3.2.3. Sistema PEG/citrato de sódio

Para promover as extrações em sistemas PEG/citrato, as enzimas pectinolíticas foram novamente produzidas por fermentação e concentradas. Os valores do fator de concentração para a primeira concentração não foram

reprodutíveis. Houve forte diminuição do fator de concentração para a PL que foi 10 vezes menor que na primeira concentração, realizada para as extrações com PEG/fosfato, foi menor também para a concentração de proteínas e atividade de endo-PG. Já para exo-PG o valor foi em torno de 10 vezes e para PL aumentou em cerca de 5 vezes (passando de 0,3 na primeira para 1,7 na segunda concentração), como mostra a Tabela 5.13. O valor para PE foi de 2,5 vezes, igual ao obtido por Kapoor *et al* (2000) na precipitação de pectinases com sulfato de amônia a 90% de saturação.

Na separação das enzimas pectinolíticas foram utilizados PEG's com massa molecular entre 400 e 10000, e novamente verificou-se que as biomoléculas, ainda presentes no caldo fermentado e dialisado, deslocavam a curva binodal no sentido para regiões mais ricas em PEG e citrato fazendo com que não ocorresse formação de sistema bifásico com PEG-400 e 600. Os resultados das extrações são apresentados nas Figuras 5.9 e 5.10 e nas Tabelas D-20 a D-28 do Apêndice D.

O volume da fase de topo diminuiu com o aumento da massa molecular do PEG, apesar de elevar-se após PEG-8000, mostrando assim a mesma tendência que nos sistemas com as enzimas comerciais (Capítulo 4), como mostram a Figura 5.9 e Tabela D-20 do Apêndice D.

Tabela 5.13: Resultados da concentração do caldo fermentado de *Aspergillus niger* NRRL-3122 para as extrações com os sistemas PEG/citrato de sódio sem NaCl.

Análise	Fermentação	Precipitação	Diálise	Fator de Concentração
Proteína (mg)	0,08 ± 0,001	0,59 ± 0,025	0,42 ± 0,013	5,2
PE (U/mL)	0,002 ± 0,000	0,063 ± 0,002	0,005 ± 0,000	2,5
PL (U/mL)	0,06 ± 0,004	0,13 ± 0,001	0,10 ± 0,010	1,7
Exo-PG (U/mL)	0,40 ± 0,000	2,73 ± 0,043	4,06 ± 0,258	10,2
Endo-PG (U/mL)	43,87 ± 2,399	370,57 ± 16,755	300,15 ± 3,174	6,8

Os desvios padrões dos coeficientes de partição variaram entre 0,005-0,031 para proteína, 0,001-0,125 para PE, 0,003-0,266 para PL, 0,005-0,073 para exo-PG e 0,002-0,009 para endo-PG, como mostra a Tabela D-21 do Apêndice D. A grande variação entre os desvios é devida aos diferentes valores obtidos para o coeficiente de partição. Os coeficientes de partição maiores foram encontrados com PEG's de massa molecular elevado ($1,16 \pm 0,005$ pra exo-PG em PEG-8000 e $0,44 \pm 0,031$ para proteínas, $2,85 \pm 0,266$ para PL, $0,29 \pm 0,002$ para endo-PG e $0,65 \pm 0,120$ pra PE em PEG-10000) como mostra a Figura 5.10.

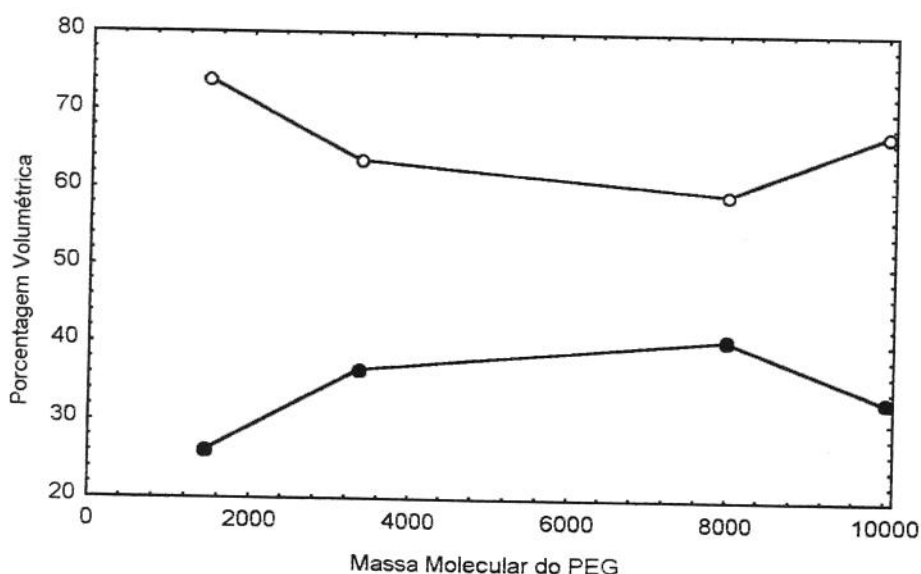


Figura 5.9: Variação da porcentagem volumétrica da fase de topo (O) e de fundo (●) dos sistemas PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C na separação de enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* NRRL-3112.

Observou-se que os coeficientes de partição das poligalacturonases aumentaram com o aumento da massa molecular do PEG, porém os valores para endo-PG, quando comparados com os obtidos com a enzima comercial, foram menores, já os da exo-PG tiveram a mesma tendência. Alves *et alli* (2000) obtiveram aumento do coeficiente de partição com o aumento da massa molecular do PEG na separação de insulina suína em sistemas PEG/citrato. Os coeficientes de partição da PE foram oscilatórios, ora demonstrando afinidade da enzima pela

fase de topo ora pela fase de fundo. Para a PL os coeficientes de partição diminuíram com a massa molecular do PEG, porém aumentaram com PEG-10000, estes valores foram maiores que os obtidos com a enzima comercial. Marcos *et alli* (2000) observaram decréscimo do coeficiente de partição de penicilina acilase em sistema PEG/citrato.

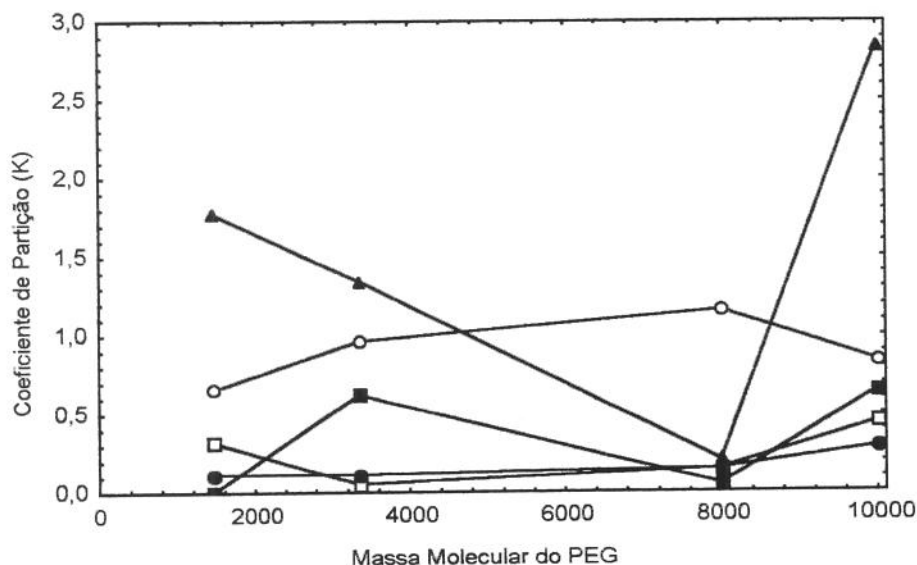


Figura 5.10: Coeficientes de partição das proteínas totais (□) e enzimas pectinolíticas (PE-■, PL-▲, exo-PG-○ e endo-PG-●) de *Aspergillus niger* NRRL-3112 nos sistemas PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

As recuperações das proteínas e da PE oscilaram, confirmando a tendência de recuperação destas ora na fase de topo ora na fase de fundo como visto pelos valores do coeficiente de partição. Nos sistemas com a enzima comercial, a recuperação de PL foi mais pronunciada na fase de fundo, pois os valores foram menores que os obtidos com a enzima do caldo fermentado. Endo-PG apresentou valores menores que 50% mostrando que eram recuperadas na fase de fundo e a exo-PG e PE tiveram comportamentos contrários. Os valores de recuperações são mostrados nas Tabelas 5.14 e D-25 do Apêndice D.

Os fatores de purificação foram na maioria dos casos maiores que os observados com as enzimas comerciais. Exo-PG e PL foram purificadas na fase de topo, onde ocorreram os maiores valores de fator de purificação das enzimas. PE,

PL e exo-PG tiveram fatores de purificação acima de 6 vezes, o que é muito bom, principalmente por ter sido obtido por passos simples de purificação (Tabelas 5.15 e D-26 do Apêndice D). Marcos *et alli* (1998) observaram que o melhor fator de purificação e rendimento para penicilina acilase ocorria em sistema PEG-3350/citrato (3,4 vezes e 92%, respectivamente).

Tabela 5.14: Recuperações (%) na fase de topo para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Proteínas	PE	PL	Exo-PG	Endo-PG
1450	47,7	1,4	83,4	65,0	24,7
3350	8,3	52,1	70,1	62,7	16,5
8000	18,2	7,3	23,1	63,0	18,4
10000	47,7	57,1	85,4	63,3	37,3

Tabela 5.15: Fator de purificação na fase de topo para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	PE	PL	Exo-PG	Endo-PG
1450	0,03	1,74	1,36	0,51
3350	6,31	8,50	7,60	1,91
8000	0,40	1,27	3,45	0,80
10000	1,21	1,79	1,33	1,24

Utilizando-se como referência inicial o caldo fermentado e dialisado, observou-se grande influência dos formadores do sistema bifásico na atividade de PE, com recuperações totais bastante elevadas. Para a PL os valores de recuperação foram elevados, assim como os das proteínas; já para as poligalacturonases foram baixos, mostrando assim, que a influência dos formadores nos sistemas bifásicos são diferentes dos obtidos com a presença de apenas um componente, como mostram as Tabelas 5.16 e 5.17. A mudança do sistema de referência inicial diminuiu o fator de purificação das poligalacturonases, porém aumentou o das outras enzimas, sendo o caso mais pronunciado de

aumento o da PL a PEG-8000 que passou de 6,31 para a forma tradicional de cálculo para 21,78 com o novo sistema como mostra a Tabela 5.18.

Tabela 5.16: Recuperações (%) das proteínas e da PL, utilizando como referência inicial o caldo fermentado e dialisado, para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Proteína			PE			PL		
	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}
1450	76,7	84,3	161,0	68,4	5220,9	5289,2	194,9	40,7	235,6
3350	6,8	75,1	81,8	147,0	135,2	282,2	62,0	26,5	88,5
8000	18,7	84,0	102,7	82,5	1051,8	1134,3	40,2	133,1	173,4
10000	38,5	42,1	80,6	186,6	136,8	323,4	39,5	6,8	46,3

Tabela 5.17: Recuperações (%) da Endo-PG e Exo-PG, utilizando como referência inicial o caldo fermentado e dialisado, para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Exo-PG			Endo-PG		
	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}
1450	27,4	14,8	42,2	8,5	25,8	34,3
3350	31,7	18,9	50,6	8,7	43,9	52,5
8000	26,4	15,6	42,0	11,3	49,9	61,2
10000	24,5	14,2	38,7	29,8	50,2	80,1

Tabela 5.18: Fator de purificação, utilizando como referência inicial o caldo fermentado e dialisado, para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	PE		PL		Exo-PG		Endo-PG	
	FP _{topo}	FP _{fundo}	FP _{topo}	FP _{fundo}	FP _{topo}	FP _{fundo}	FP _{topo}	FP _{fundo}
1450	0,89	61,91	2,54	0,48	0,36	0,18	0,11	0,31
3350	21,78	1,80	9,19	0,35	4,70	0,25	1,28	0,58
8000	4,41	12,53	2,15	1,59	1,41	0,19	0,60	0,59
10000	4,85	3,25	1,03	0,16	0,64	0,34	0,78	1,19

5.3.2.4. Sistema PEG/citrato de sódio com adição de NaCl

Nestes novos sistemas foram incorporados 6% de NaCl para verificar o efeito do aumento da diferença de hidrofobicidade entre as fases. A presença do NaCl diminuiu o deslocamento da curva binodal, provocado pelas biomoléculas contidas no caldo fermentado e dialisado, pois ocorreu formação de sistema bifásico com PEG-1000, o que não foi verificado no sistema sem NaCl. Silva & Meirelles (2001) verificaram que a massa molecular do PEG promovia a diminuição do tamanho da região bifásica e que a adição de uréia deslocava a curva binodal para as regiões de alta concentração. Os resultados das extrações são mostrados nas Figuras 5.11 e 5.12, Tabelas 5.19 a 5.23 e Tabelas D-28 a D-36 do Apêndice D.

A porcentagem volumétrica da fase de topo diminuiu com o aumento da massa molecular do PEG e foi menor do que nos sistemas sem NaCl. A igualdade volumétrica, ou seja, a razão volumétrica entre a fase de topo e fundo igual a 1 ocorreu em PEG-8000. Na separação das enzimas comerciais esta igualdade ocorreu para PEG-1000 e PEG-1450.

Os desvios padrões dos coeficientes de partição variaram entre 0,002-0,009 para proteína, 0,023-0,089 para PL, 0,000-0,219 para exo-PG, 0,002-0,017 para endo-PG e abaixo de 0,001 para PE como mostra a Tabela D-29 do Apêndice D.

Os coeficientes de partição das proteínas, PE e PL foram menores que os obtidos em sistemas na presença de NaCl, já os das poligalacturonases foram mais elevados. Os maiores coeficientes de partição foram encontrados com PEG-1000 para proteínas ($0,09 \pm 0,003$) e PL ($0,09 \pm 0,089$), PEG-3350 para PE ($0,05 \pm 0,000$) e PEG-10000 para exo-PG ($2,27 \pm 0,280$) e endo-PG ($0,55 \pm 0,002$). Estes valores baixos (exceto para exo-PG) mostram que a adição de NaCl excluiu as proteínas e as enzimas para a fase de fundo como mostram a Figura 5.12 e Tabela D-29 do Apêndice D. Marcos *et alli* (1998) observaram que os coeficientes de partição das proteínas totais aumentavam, enquanto o das enzimas diminuía

com a elevação da massa molecular do PEG em sistemas PEG/citrato com 8,8% de NaCl.

As recuperações obtidas nos sistemas com NaCl foram menores que naqueles sem a presença do sal, exceto para endo-PG. As enzimas e proteínas foram melhor recuperadas na fase de topo (exceto a exo-PG e em alguns massas moleculares de PEG para PL), o que pode ser observado pelos valores de recuperação abaixo de 50%, como mostram as Tabela 5.19 e Tabela D-30 do Apêndice D, para a fase de fundo.

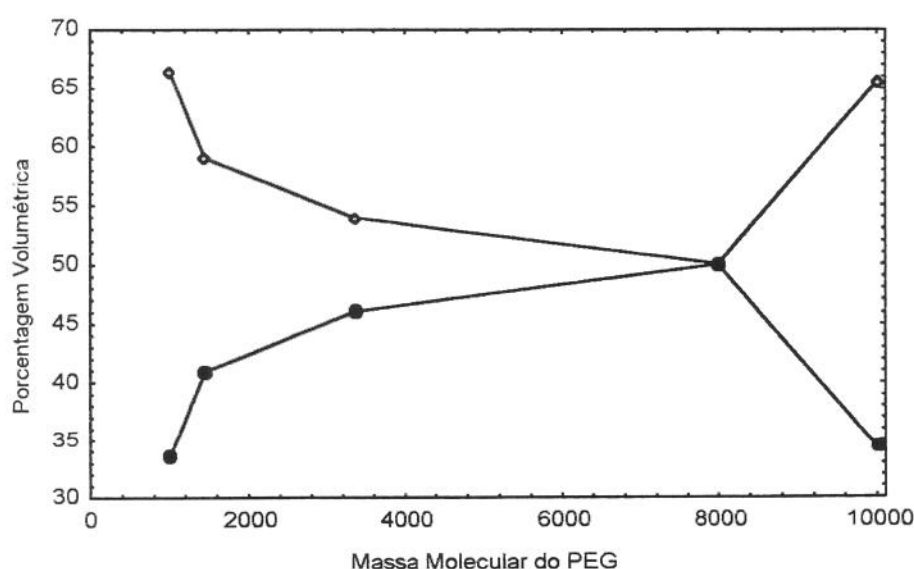


Figura 5.11: Variação da porcentagem volumétrica da fase de topo (O) e de fundo (●) dos sistemas PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C na separação de enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* NRRL-3112.

Os fatores de purificação de PL, exo-PG e endo-PG foram maiores que os atingidos nos sistemas sem adição de NaCl e significativamente maiores que os obtidos para as enzimas comerciais, o que era esperado pois na enzima comercial o número de impurezas a ser eliminadas é bem menor que nas enzimas produzidas pela fermentação. Apesar de haver uma menor recuperação a escolha do sistema para efetuar a purificação dependerá de fatores econômicos e das etapas que serão utilizados na continuação do processo de purificação. Os valores

dos fatores de purificação das enzimas são mostrados nas Tabelas 5.20 e D-31 do Apêndice D. Gupta *et alli* (1993) obtiveram fator de purificação de 8,8 vezes para pectinase comercial com 85,8% de recuperação. Nos melhores resultados obtidos neste trabalho com PEG/citrato e 6% de NaCl as recuperações foram mais baixas que o valor encontrado pelos autores acima (13,61 vezes de fator de purificação e 69,3% de rendimento para PL em sistema com PEG-3350).

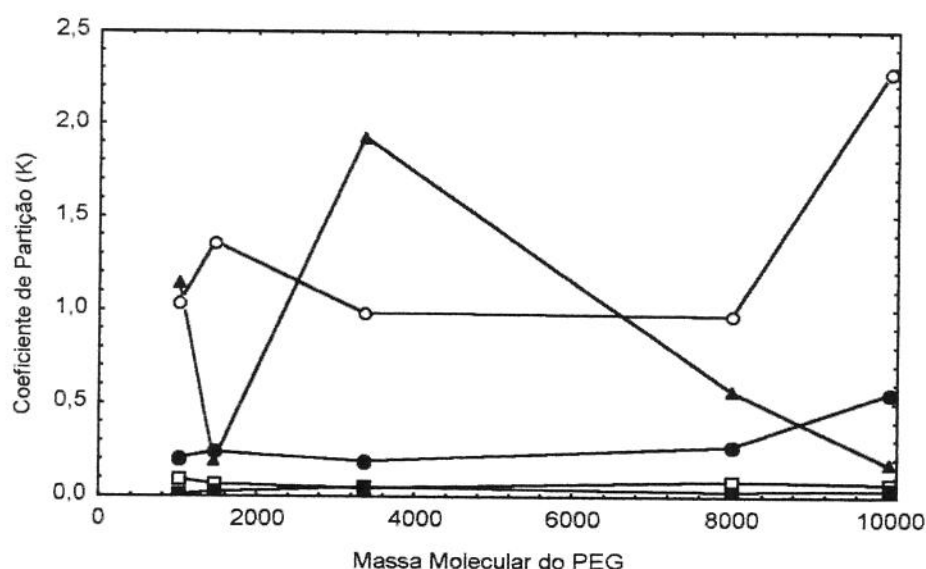


Figura 5.12: Coeficientes de partição das proteínas totais (□) e enzimas pectinolíticas (PE-■, PL-▲, exo-PG-○ e endo-PG-●) de *Aspergillus niger* NRRL-3112 nos sistemas PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C.

Tabela 5.19: Recuperações (%) na fase de topo para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Proteínas	PE	PL	Exo-PG	Endo-PG
1000	15,5	1,7	69,4	67,2	28,9
1450	8,5	3,2	21,0	66,3	25,4
3350	5,1	5,7	69,3	53,6	18,1
8000	7,8	2,7	36,3	49,2	21,2
10000	11,6	6,6	24,5	81,2	51,3

Tabela 5.20: Fator de purificação na fase de topo para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	PE	PL	Exo-PG	Endo-PG
1000	0,11	4,49	4,31	1,87
1450	0,38	2,47	7,80	3,00
3350	1,13	13,61	10,52	3,56
8000	0,35	4,67	6,33	2,72
10000	0,57	2,02	6,98	4,41

A utilização do novo sistema de referência inicial explicitou a influência dos componentes formadores do sistema aquoso bifásico e o sinergismo de suas presenças, quando comparados ao estudo feito no Capítulo 2. Novamente a PE foi fortemente influenciada pela presença dos componentes e exo e endo-PG tiveram recuperações totais, na maioria dos casos, abaixo de 50%, como mostram as Tabelas 5.21 e 5.22. Os fatores de purificação também foram influenciados, sendo maiores que os obtidos com a forma tradicional como mostra a Tabela 5.23.

Tabela 5.21: Recuperações (%) das proteínas e da PL, utilizando como referência inicial o caldo fermentado e dialisado, para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Proteína			PE			PL		
	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}
1000	12,2	66,6	78,8	61,5	3575,6	3637,1	74,2	32,7	106,8
1450	8,6	92,8	101,5	54,7	1631,3	1686,0	39,0	146,5	185,4
3350	4,8	90,1	94,9	199,8	3283,1	3482,9	61,1	27,0	88,1
8000	8,2	97,8	106,0	92,6	3287,0	3379,6	65,4	114,8	180,2
10000	7,7	58,7	66,4	60,7	861,1	921,8	18,8	61,2	80,0

Tabela 5.22: Recuperações (%) da exo-PG e endo-PG, utilizando como referência inicial o caldo fermentado e dialisado, para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Exo-PG			Endo-PG		
	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}	R _{topo}	R _{fundo}	R _{total}
1000	36,0	18,0	54,1	12,1	29,8	41,9
1450	29,9	15,2	45,1	10,7	31,4	42,1
3350	21,7	18,8	40,5	11,6	52,1	63,7
8000	17,6	18,2	35,9	9,5	35,6	45,1
10000	89,0	20,6	109,6	24,9	23,6	48,5

Tabela 5.23: Fator de purificação, utilizando como referência inicial o caldo fermentado e dialisado, para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	PE		PL		Exo-PG		Endo-PG	
	FP _{topo}	FP _{fundo}	FP _{topo}	FP _{fundo}	FP _{topo}	FP _{fundo}	FP _{topo}	FP _{fundo}
1000	5,05	53,66	6,09	0,49	2,96	0,27	0,99	0,45
1450	6,35	17,57	4,52	1,58	3,47	0,16	1,24	0,34
3350	41,33	36,44	12,63	0,30	4,48	0,21	2,39	0,58
8000	11,25	33,60	7,95	1,17	2,14	0,19	1,16	0,36
10000	7,86	14,68	2,43	1,04	11,53	0,35	3,22	0,40

5.3.2.5. Sistema PEG/maltodextrina

Não houve formação de sistema bifásico com nenhuma massa molecular de PEG, o que era de se esperar, pois as razões volumétricas entre as fases de topo e fundo para o sistema com a enzima comercial eram bastantes elevadas, demonstrando que o sistema ficava bem próximo da linha binodal. Como nos outros sistemas (PEG/fosfato e PEG/citrato) que possuíam razões volumétricas próximas de 1 já ocorria o deslocamento da linha, então a formação com o sistema PEG/maltodextrina estava comprometido.

5.3. CONCLUSÕES PARCIAIS

Nos ensaios de fermentação a glicose do meio de cultura é rapidamente consumida sendo responsável pelo aumento de biomassa. As poligalacturonases são produzidas ao final da fermentação, enquanto a PL tem melhor produção ao início da fermentação.

No processo de precipitação das enzimas pectinolíticas com etanol a -20°C a razão volumétrica, entre caldo fermentado e etanol, de 1:3 permite a maior precipitação de material protéico, porém todo o processo de concentração não apresentou reprodutibilidade. PL tem os menores fatores de concentração.

O volume da fase de topo diminui com a massa molecular do PEG para todos os sistemas formados. Estes sistemas sofrem influência dos biocompostos presentes no caldo fermentado e dialisado, pois não ocorre formação de sistema bifásico com PEG de baixa massa molecular.

Nos sistemas PEG/fosfato PE e endo-PG apresentam afinidade pela fase de fundo, enquanto que as proteínas e as outras enzimas têm afinidade pela fase de topo. Os maiores fatores de purificação são encontrados na fase de topo. A adição de NaCl tem pouca influência na porcentagem volumétrica das fases, mas diminui os coeficientes de partição da proteína, as recuperações da exo-PG e os fatores de purificação da endo-PG.

Nos sistemas PEG/citrato os mais elevados coeficientes de partição são encontrados com alta massa molecular de PEG. A adição de NaCl diminui o deslocamento da curva binodal, fazendo com que ocorra formação de fase em sistemas que sem a presença do sal não ocorre. As recuperações são menores e os fatores de purificação são maiores na presença do sal.

CONCLUSÕES GERAIS

As conclusões gerais deste trabalho foram:

Os constituintes dos sistemas aquosos bifásicos promovem aumento ou redução da atividade enzimática quando estão presentes isoladamente em solução aquosa da enzima e quando estão juntos com os outros constituintes das fases dos sistemas.

As poligalacturonases são produzidas melhor por *Aspergillus niger*, enquanto PE e PL por *Humicola grisea* e *Penicillium itálico*, respectivamente.

O meio contendo glicose e extrato de levedura foi o que produziu a maior atividade enzimática de endo e exo-PG.

Os biocompostos presentes no caldo fermentado, mesmo após a diálise, prejudicam a formação de sistemas bifásicos com massas moleculares de PEG pequenas, para os sistemas PEG/fosfato de potássio e PEG/citrato de sódio e para qualquer valor de peso molecular para PEG/maltodextrina. Estes biocompostos são os responsáveis pelas diferenças dos resultados obtidos para enzima comercial e enzima contida no caldo fermentado e dialisado.

A adição de NaCl e a massa molecular do PEG exercem grande influência na separação das enzimas pectinolíticas.

A separação das enzimas pectinolíticas pode ser feita por diferentes sistemas em cascata e com diversas opções dependendo de qual enzima se deseja isolar e conseqüentemente purificar.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para os próximos trabalhos sugere-se:

Estudar a produção de enzimas pectinolíticas em meios não sintéticos.

Estudar a concentração das enzimas para a aplicação do caldo concentrado no processo de separação por sistemas aquosos bifásico.

Tentar eliminar o efeito negativo dos componentes formadores das fases na atividade das enzimas pectinolíticas e da concentração de proteínas totais.

Verificar a influência do pH e da temperatura na separação das enzimas pectinolíticas.

Estudar outros pontos de mistura para o sistema PEG/maltodextrina.

Montar sistemas em cascata para separar as enzimas pectinolíticas em mais de um estágio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, G.; Trejo, B. A.; Garcia, J. M.; Huitron, C. Influence of pH on endo- and exo-pectinase production by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. Canadian Journal of Microbiology, 37: 912-917, 1991.
- Alaña, A.; Alkorta, I.; Dominguez, J. D.; Llama, M. J.; Serra, J. L. Pectin lyase activity in a *Penicillium italicum* strain. Applied and Environmental Microbiology, 56 (12): 3755-3759, 1990.
- Alaña, A.; Gabilondo, A.; Hernando, F.; Moragues, M. D.; Serra, J. L.; Dominguez, J. B.; Llama, M. J.; Serra, J.L. Pectin lyase production by a *Penicillium italicum* strain. Applied and Environmental Microbiology, 55 (6): 1612-1616, 1989.
- Albersheim, P.; Killias, U. Studies relating to the purification and properties of pectin transeliminase. Archives of Biochemistry and Biophysics, 97: 107-115, 1962.
- Albertsson, P. A. Partition of cell particles and macromolecules. 3rd ed., Wiley Interscience, New York, 1986.
- Albertsson, P. A.; Johansson, G.; Tjerneld, F. Aqueous two-phase separations. In: Asenjo, J. A. (ed). Separation Processes in Biotechnology. New York: Marcell Dekker, 1990. 287-327.
- Almeida, M. C.; Venâncio, A.; Teixeira, J. A.; Aires-Barros, M. R. Cutinase purification na poly(ethylene glycol)-hydroxy-propyl starch aqueous two-phase systems. Journal of Chromatography B, 711: 151-159, 1998.
- Alves, J. G. L. F.; Chumpitaz, L. D. A.; Silva, L. H. M.; Franco, T.T.; Meirelles, A. J. A. Partitioning of whey proteins, bovine serum albumin and porcine insulin in aqueous two-phase systems. Journal of Chromatography B, 743: 235-239, 2000.

- Argüelles, M. E. A.; Rojas, M. G.; Gonzalez, G. V.; Torres, E. F. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. Applied Microbiology Biotechnology, 43: 808-814, 1995.
- Ariga, O.; Miyakawa, I.; Aota, T.; Sano, Y. Simultaneous release and purification of gene product in an aqueous two-phase system. Journal of Fermentation and Biotengineering, 77(1): 71-74, 1994.
- Bamberger, S.; Brooks, D. E.; Sharp, K. A.; Alstine, J. M. V.; Webber, T. J. Preparation of phase systems and measurement of their physicochemical properties. In: Partitioning in aqueous two-phase systems. Academic Press INC, 1985. v. 3, cap 3, p. 85-130.
- Baracat, M. C.; Valentim, C.; Muchovej, J. J.; Silva, D. O. Selection of pectinolytic fungi for degumming of natural fibers. Biotechnology Letters, 11 (12): 899-902, 1989.
- Baracat-Pereira, M. C.; Vanetti, M. C. D.; Araujo, E. F.; Silva, D. O. Partial characterization of *Aspergillus fumigatus* polygalacturonases for the degumming of natural fibers. Journal of Industrial Microbiology, 11: 139-142, 1993.
- Baskir, J. N.; Hatton, T. A.; Suter, U. W. Protein partitioning in two-phase aqueous polymer systems. Biotechnology and Bioengineering, 34: 541-558, 1989.
- Bim, M. A.; Franco, T. T. Extraction in aqueous two-phase systems of alkaline xylanase produced by *Bacillus pumilus* and its application in kraft pulp bleaching. Journal of Chromatography B, 743: 349-356, 2000.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254, 1976.
- Bradoo, S.; Saxena, R. K.; Gupta, R. Partitioning and resolution of mixture of two lipases from *Bacillus stearothermophilus* SB-1 in aqueous two-phase systems. Process Biochemistry, 35 (1-2): 57-62, 1999.

- Brumano, M. H. N.; Coelho, J. L. C.; Araujo, E. F.; Silva, D. O. Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* as a function of the inoculum and culture conditions. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 9: 225-228, 1993.
- Camperi, S. A.; Auday, R. M.; Cañizo, A. N.; Cascone, O. Study of variables involved in fungal pectic enzyme fractionation by immobilized metal in affinity chromatography. Process Biochemistry, 31 (1): 81-87, 1996.
- Castilho, L. R.; Medronho, R. A.; Alves, T. L. M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. Bioresource Technology, 71: 45-50, 2000.
- Ceci, L.; Lozano, J. Determination of enzymatic activities of commercial pectinases for the clarification of apple juice. Food Chemistry, 61 (1-2): 237-241, 1998.
- Channe, P. S.; Shewale, J. G. Pectinase production by *Sclerotium rolfsii*: effect of culture conditions. Folia Microbiology, 40 (1): 111-117, 1995.
- Chen, J. P.; Lee, M. S. Enhanced production of *Serratia marcescens* chitinase in PEG/dextrana aqueous two-phase systems. Enzyme Microbiology Technology, 17: 1021-1027, 1995.
- Chronakis, I. S. On the molecular characteristics, compositional properties, and structural functional mechanisms of maltodextrins: a review. Critical Reviews in Food Science, 38 (7): 599-637, 1998.
- Cruz-Guerrero, A.; Barzana, E.; Garcia-Garibay, M.; Gomez-Ruiz, L. Dissolved oxygen threshold for the repression of endo-polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*. Process Biochemistry, 34: 621-624, 1999.
- Diamond, A. D.; Hsu, J. T. Aqueous two-phase systems for biomolecule separation. In: Fiechter, A. (ed). Advances in Biochemical Engineering Biotechnology and Bioseparation. Sprnger-Verlag, 1993, 89-135.
- Dietz, J. M.; Rouse, A. H. A rapid method for estimating pectic substances in citrus juices. Food Research, 13 (1): 169-177, 1953.

- Dokic, P.; Jakovljevic, J.; Dokic-Baucal, L. Molecular characteristics of maltodextrins and rheological behaviour of diluted and concentrated solutions. Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects, 141: 435-440, 1998.
- Dosanjh, N. S.; Hoondal, G. S. Production of constitutive, thermostable, hyperactive exo-pectinase from *Bacillus* GK-8. Biotechnology Letters, 18 (12): 1435-1438, 1996.
- Eggers, D. K.; Blanch, H. W.; Prausnitz, J. M. Extractive catalysis: solvent effects on equilibria of enzymatic reactions in two-phase systems. Enzyme Microbiology Technology, 11 (2): 84-89, 1989.
- Espinosa, P.; Barzana, E.; Garcia-Garibay, M.; Gomez-Ruiz, L. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* for the production of lactase simultaneously to pectinase or inulinase. Biotechnology Letters, 14 (11): 1053-1058, 1992.
- Falco, A. L. P.; Durant, L. R.; Franco, T. T. Purification of α -galactosidase from seeds of *Sesbania marginata*. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 17 (4): 819-825, 2000.
- Faria, J. B.; Cavalcá, M. M.; Ferreira, R. C.; Janzanti, N. S. Transformações enzimáticas das substâncias pécicas da manga (*Mangifera indica* L.) v. Haden no amadurecimento. Ciência e Tecnologia Alimentar, 14 (2): 189-201, 1994.
- Fogarty, W. M.; Kelly, C. T. Developments in microbial extracellular enzymes. In Wiseman, A. (ed). Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology. Chichester: Ellis Horwood, 1979. v. 3, cap 3, p. 60-67.
- Fogarty, W. M.; Ward, O. P. Pectinases and pectic polysaccharides. In: Hockenhull, D. J. D. (ed). Progress in Industrial Microbiology. London: Churchill Livingstone, 1974. v.13, p. 59-119.
- Fogarty, W. M.; Ward, O. P. Pectic substances and pectinolytic enzymes. Process Biochemistry, 6: 13-17, 1972.
- Fonseca, M. J. V.; Said, S. The pectinase produced by *Tubercularia vulgaris* in submerged culture using pectin or orange-pulp pellets as inducer. Applied Microbiology and Biotechnology, 42: 32-35, 1994.

- Friedrich, J.; Cimerman, A.; Steiner, W. Production of pectinolytic enzymes by *Aspergillus niger* on sucrose. Food Biotechnology, 6 (3): 207-216, 1992.
- Gainvors, A.; Frezier, V.; Lemaesquier, H.; Lequart, C.; Aigle, M.; Belarbi, A. Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. Yeast, 10: 1311-1319, 1994.
- Galiotou-Panayotou, M.; Kapantay, M.; Kalantzi, O. Grow conditions of *Aspergillus* sp. ATHUM-3482 for polygalacturonase production. Applied Biochemistry and Microbiology Biotechnology, 47: 426-429, 1997.
- Garcia-Garibay, M.; Ruiz, L. G.; Rarzana, E. Studies on the simultaneous production of single cell protein and polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. Biotechnology Letters, 9 (6): 411-416, 1987.
- Gerhartz, W. Enzymes in industry: production and applications. Weinheim: VCH, 1990, p. 321.
- Gonzalez, M.; Peña, C.; Casas, L. T. Partial purification of β -galactosidase from yeast by an aqueous two-phase system method. Process Biochemistry International, 10: 157-161, 1990.
- Greve, A.; Kula, M. R. Recycling of salts in partition protein extraction processes. Journal Chemical Technology and Biotechnology, 50: 27-42, 1991.
- Gündüz, U.; Korkmaz, K. Bovine serum albumin partitioning in an aqueous two-phase systems: effect of pH and sodium chloride concentration. Journal of Chromatography B, 743: 255-258, 2000.
- Gupta, R.; Bradoo, S.; Saxena, R. K. Aqueous two-phase systems: an attractive technology for downstream processing of biomolecule. Current Science, 77 (4): 520-523, 1999.
- Gupta, M. N.; Guoqiang, D.; Mattiasson, B. Purification of endo-polygalacturonase by affinity precipitation using alginate. Biotechnology Applied Biochemistry, 18: 321-327, 1993.
- Harris, J. M.; Yalpani, M. Polymer-ligands used in affinity partitioning and their synthesis. In: Partitioning in Aqueous two-phase Systems. Academic Press, 1985, v. 3, cap. 3, 85-130.

- Hennies, P. T. Produção de pectinase de *Penicillium italicum* através de fermentação em meio semi-sólido. Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos-UNICAMP, Campinas, 1996.
- Job, C.; Blass, E. Problems concerning liquid-liquid extraction of extracellular products directly from fermenter broths. The Chemical Engineering Journal, 56: B1-B8, 1994.
- Johansson, G. Affinity partitioning of proteins using aqueous two-phase systems. In Janson, J. G.; Ryden, L. Protein purification, principles high resolution methods and Applications. VCH Publishers Inc. 1989, 330-345.
- Kapoor, M.; Beg, Q. K.; Bhushan, B.; Dadhich, K. S.; Hoondal, G. S. Production and partial purification and characterization of a thermo-alkali stable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2. Process Biochemistry, 36: 467-473, 2000.
- Keller, S. E.; Jen, J. J.; Brunner, J. R. Purification of commercial pectinase by hydrophobic chromatography. Journal of Food Science, 47: 2076-2077, 1982.
- Kester, H. C. M.; Visser, J. Purification and characterization of polygalacturonases produced by the hyphal fungus *Aspergillus niger*. Biotechnology and Applied Biochemistry, 12: 150-160, 1990.
- Koba, E. E.; Coimbra, J. S. R.; Reis, E. L.; Minim, L. A.. Equilíbrio de fases em sistemas polietilenoglicol – fosfato de potássio – água: influência do peso molecular do polímero. Anais do XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Rio de Janeiro/RJ, 1998.
- Kotzekidou, P. Production of polygalacturonase by *Byssochlamys fulva*. Journal of Industrial Microbiology, 7: 53-56, 1991.
- Kroner, K. H.; Kula, M. R. Extraction of enzymes in aqueous two-phase systems. Process Biochemistry, 4: 7-9, 1978.
- Kula, M. R. Trends and future prospects of aqueous two-phase extraction. Bioseparation, 1: 181-189, 1990.

- Kumar, S. S.; Palanivelu, P. Production and properties of pectinolytic enzymes from the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 14: 781-782, 1998.
- Lahore, H. M. F.; Miranda, M. V.; Fraile, E. R.; Bonino, M. J. B. J.; Cascone, O. Partition behaviour and purification of a *Mucor bacilliformis* acid protease in aqueous two-phase systems. Process Biochemistry, 30 (7): 615-621, 1995.
- Levin, L.; Forchiassin, F. Culture conditions for the production of pectinolytic enzymes by the white-rot fungus *Trametes trogii* on a laboratory scale. Acta Biotechnology, 18 (2): 157-166, 1998.
- Lobarzewski, J.; Fiedurek, J.; Ginalska, G.; Wolski, T. New Matrices for the purification of pectinases by affinity chromatography. Biochemical and Biophysical Research Communications, 131 (2): 666-674, 1985.
- Loera, O.; Aguirre, J.; Viniegra-Gonzalez, G. Pectinase production by a diploid construct from two *Aspergillus niger* overproducing mutants. Enzyme and Microbial Technology, 25: 103-108, 1999.
- Lowry, O. H.; Rosenbrough, W. J.; Farr, A. L. Protein measurement with the folin-phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193: 256-275, 1951.
- MacMillan, J. D.; Sheiman, M. I. Pectin enzymes. In: WHITAKER, J.R. (ed). Food Related Enzymes. Washington: ACS, 1974. p. 101-130. (Advances in Chemistry Series, 136).
- Manachini, P. L.; Parini, C.; Fortina, M. G. Pectic enzymes from *Aureobasidium pullulans* LV-10. Enzyme Microbiology technology, 10 (11): 682-685, 1988.
- Marcos, J. C.; Fonseca, L. P.; Ramalho, M. T.; Cabral, J. M. S. Partial purification of penicillin acylase from *Escherichia coli* in poly(ethylene glycol) sodium citrate aqueous two-phase systems. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 734 (1): 15-22, 1999.
- Marcos, J. C.; Fonseca, L. P.; Ramalho, M. T.; Cabral, J. M. S. Variation of penicillin acylase partition coefficient with phase volume ratio in poly(ethylene glycol)-sodium citrate aqueous two-phase systems. Journal of Chromatography B, 711: 295-299, 1998.

- Membre, J. M.; Burlot, P. M. Effects of temperature, pH and NaCl on growth and pectinolytic activity of *Pseudomonas marginalis*. Applied and Environmental Microbiology, 60 (6): 2017-2022, 1994.
- Mikhailova, R. V.; Sapunova, L. I.; Lobanok, A. G. Biosynthesis of pectinlyases in *Penicillium adametzii*, *P. citrinum* and *P. janthinellum*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 10: 457-461, 1994.
- Monteiro Filho, E. S.; Coimbra, J. S. R.; Machado, F. L. C.; Minim, L. A.; Passos, F. J. V. Seleção de um sistema aquoso bifásico para a separação de células microbianas. Anais do XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Rio de Janeiro/RJ, 1998.
- Naidu, G. S. N.; Panda, T. Performace of pectinolytic enzymes during hydrolysis of pectic substances under assay condiction: a statistical approach. Enzyme Microbial Technology, 25: 116-124, 1999.
- Novo Nordisk. A ação das enzimas. Novo Nordisk A/S. Bagsvaerd, 1995.
- Nikaidou, N.; Naganuma, T.; Kamio, Y.; Izaki, K. Production, purification and properties of a pectin lyase from *Pseudomonas marginalis* N6301. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 59 (2): 323-324, 1995.
- Nozaki, K.; Miyairi, K.; Hozumi, S.; Fukui, Y.; Okuno, T. Novel exopolygalacturonase produced by *Alternaria mali*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 61 (1): 75-80, 1997.
- Papamichael, N.; Börner, B.; Hustedt, H. Continuous aqueous phase extraction of proteins: automated processing and recycling of process chemicals. Journal Chemical Technology and Biotechnology, 54: 47-55, 1992.
- Paquet, V.; Myint, M.; Roque, C. Soucaille, P. Partitioning of pristinamycins in aqueous two phase systems: a first step toward the development of antibiotic production by extractive fermentation. Biotechnology and Bioengineering, 44: 445-451, 1994.
- Pereira, S. S.; Torres, E. F.; Gonzalez, G. V.; Rojas, M. G. Effects of different carbon source on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. Applied Microbiology Biotechnology, 39: 36-41, 1993.

- Piza, F. A. T. Purificação de enzimas quitosanase de *Bacillus cereus* em sistemas de duas fases aquosas. Tese de Mestrado, Faculdade de engenharia de alimentos- UNICAMP, Campinas, 1998.
- Polizeli, M. L. T. M.; Jorge, J. A.; Terenzi, H. T. Pectinase production by *Neurospora crassa*: purification and biochemical characterization of extracellular polygalacturonase activity. Journal of General Microbiology, 137: 1815-1823, 1991.
- Riou, C.; Freyssinet, G.; Fevre, M. Purification and characterization of extracellular pectinolytic enzymes produced by *Sclerotinia sclerotiorum*. Applied and Environmental Microbiology, 58 (2): 578-583, 1990.
- Rito-Palomares, M.; Cueto, L. Effect of biological suspensions on the position of the binodal curve in aqueous two-phase systems. Journal of Chromatography B, 743: 5-12, 2000.
- Rizzatto, M. Produção de pectinases por *Penicillium italicum* IZ-1584 e *Aspergillus niger* NRRL-3112 em bagaço de laranja industrializado. Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, Campinas, 1999.
- Rombouts, F. M.; Pilnik, W. Enzymes in fruit and vegetable juice technology. Process Biochemistry, 13 (8): 9-13, 1978.
- Ros, J. M.; Nuñez, J. M.; Saura, D.; Salmeron, M. C.; Laencina, J. Production of endopolygalacturonase from *Rhizopus nigricans* related to the evolution of growth substrate. Biotechnology Letters, 13 (4): 287-290, 1991.
- Ruiz, L. G.; Garibay, M. G.; Barzana, E. Utilization by endo-polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis* in the clarification of apple juice. Journal of Food Science, 53 (4): 1236-1237, 1988.
- Sakai, T.; Sakamoto, T.; Hallaert, J.; Vandamme, E. J. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. Advanced Applied Microbiology, 39: 213-294, 1979.
- Sakamoto, T.; Hours, R. A.; Sakai, T. Purification, characterization and production of two pectic transeliminases with protopectinase activity from *Bacillus subtilis*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 58 (2): 353-358, 1994.

- Sapunova, L. I.; Lobanok, A. G.; Mikhailova, R. V. Conditions of synthesis of pectinases and proteases by *Aspergillus alliaceus* and production of a complex macerating preparation. Applied Biochemistry and Microbiology, 33 (3): 257-260, 1997.
- Schmidt, O.; Angermann, H.; Frommhold-Treu, I.; Hoppe, K. Experimental and theoretical investigations of submerged fermentation and synthesis of pectinolytic enzymes by *Aspergillus niger*. Applied Microbiology Biotechnology, 43: 424-430, 1995.
- Schwan, R. F.; Cooper, R. M.; Wheals, A. E. Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp degrading yeasts. Enzyme and Microbial Technology, 21: 234-244, 1997.
- Shevchick, V. E.; Evtushenkov, A. N.; Babitskaya, H. V.; Formichev, Y. K. Production of pectolitic enzymes from *Erwinia* grown on different carbon sources. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 8: 115-120, 1992.
- Silley, P. A note on the pectinolytic enzymes of *Lachnospira multiparus*. Journal of Applied Bacteriology, 58: 145-149, 1985.
- Silva, D. O.; Anttwood, M. M.; Tempest, D. O. Partial purification and properties of pectin lyase from *Penicillium expansum*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 9 (5): 574-578, 1993.
- Silva, L. H. M. Equilíbrio de fases em sistemas aquosos PEG/fosfato de potássio. Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos-UNICAMP, Campinas, 1994.
- Silva, L. H. M. Equilíbrio de fases em sistemas aquosos bifásicos: polímero/polímero e polímero/sal. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos-UNICAMP, Campinas, 2000.
- Silva, L. H. M.; Meirelles, A. J. A. PEG + potassium phosphate + urea aqueous two-phase systems: phase equilibrium and protein partitioning. Journal of Chemical Engineering Data, 46: 251-255, 2001.
- Silva, L. H. M.; Meirelles, A. J. A. Bovine serum albumin, α -lactoalbumin and β -lactoglobulin partitioning in polyethylene glycol/maltodextrin aqueous two-phase systems. Carbohydrate Polymers, 42: 279-282, 2000.

- Singh, S. A.; Plattner, H.; Diekmann, H. Exopolygalacturonate lyase from a thermophilic *Bacillus* sp. Enzyme and Microbial Technology, 25: 420-425, 1999a.
- Singh, S. A.; Ramakrishna, M.; Rao, A. G. A. Optimization of downstream processing parameters for the recovery of pectinase from the fermented bran of *Aspergillus carbonarius*. Process Biochemistry, 35: 411-417, 1999b.
- Somogy, M. Notes on sugar determination. Journal of Biological Chemistry, 195: 19-23, 1952.
- Tachet, L. F.; Fevre, M. Regulation by galacturonic acid of pectinolytic enzyme production by *Sclerotinia sclerotiorum*. Current Microbiology, 33: 49-53, 1996.
- Tanuja, S.; Srinivas, N. D.; Rao, K. S. M. S. R.; Gowthaman, M. K. Aqueous two-phase extraction for downstream processing of amyloglucosidase. Process Biochemistry, 32 (8): 635-641, 1997.
- Ugwuanyi, J. O.; Obeta, N. A. N. Some Pectinolytic and cellulolytic enzymes activities of fungi causing rots of cocoyams. Journal of Science Food Agriculture, 73: 432-436, 1997.
- Vernau, J.; Kula, M. R. Extraction of proteins from biological raw material using aqueous polyethylene glycol - citrate phase systems. Biotechnology and Applied Biochemistry, 12: 397-404, 1990.
- Whitaker, J. R. Microbial pectolytic enzymes. In: Forgaty, W. M.; Kelly, C. T (ed). Microbial Enzymes and Biotechnology, 2 ed, London: Elsevier, 1990. cap. 4, p. 133-1776.
- Whitaker, J. R. Pectic substance, pectic enzymes and haze formation in fruit juices. Enzymes Microbiology Technology, 6 (8): 341-349, 1984.
- Wood, P. J.; Siddiqui, I. R. Determination of methanol and its application to measurement of pectin ester content and pectin methyl esterase activity. Analytical Biochemistry, 39: 418-428, 1971.
- Zaslavsky, B. Y. Aqueous two-phase partitioning, physical chemistry and bioanalytical applications. Marcell Dekker, New York, 1995.

- Zheng, Z.; Shetty, K. Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. Process Biotechnology, 35: 825-830, 2000.

Apêndice A

Tabelas e Gráficos Referentes ao Capítulo 2

Tabela A-1: Teor de açúcares redutores em amostras de pectina 1% (p/v) e atividade de exo-PG de Pectinex-3XL em diferentes tempos de inativação.

$T_{\text{inativação}}$ (min)	C_{AR} (mg/L)	Exo-PG (U/mL)
0	$85,03 \pm 0,85$	$365,25 \pm 3,67$
5	$26,90 \pm 1,42$	$115,55 \pm 6,12$
10	$28,04 \pm 1,99$	$120,44 \pm 8,57$
15	$26,04 \pm 1,14$	$111,87 \pm 4,90$
20	$26,61 \pm 1,71$	$114,32 \pm 7,34$
25	$27,18 \pm 1,71$	$116,77 \pm 7,34$

Tabela A-2: Concentração de metanol devido à ação enzimática e atividade de PE em Pectinex-3XL determinada pelo método espectrofotométrico em diferentes tempos de reação.

Tempo (min)	C_{metanol} ($\mu\text{mol/mL}$)	$PE_{\text{espectrofotométrico}}$ (U/mL)
0	0	0
40	$0,14 \pm 0,00$	$13,75 \pm 0,40$
60	$0,29 \pm 0,00$	$19,60 \pm 0,21$

Tabela A-3: Concentração de metanol devido à ação enzimática e atividade de PE em Pectinex-3XL determinada pelo método titulométrico em diferentes tempos de reação.

Tempo (min)	$C_{\text{grupo carboxila}}$ ($\mu\text{mol/mL}$)	$PE_{\text{titulométrico}}$ (U/mL)
0	0	0
15	$1,80 \pm 0,34$	$120,00 \pm 22,70$
40	$4,91 \pm 0,34$	$122,84 \pm 8,51$

Tabela A-4: Absorbância provocada pela ação enzimática e atividade de PL em Pectinex-3XL em diferentes tempos de reação.

Tempo (min)	Absorbância ($A_{235\text{ nm}}$)	PL (U/mL)
0	0	0
15	$0,5782 \pm 0,0227$	$385,47 \pm 15,13$
30	$0,8220 \pm 0,0455$	$274,00 \pm 15,15$
45	$1,0427 \pm 0,0070$	$231,70 \pm 1,56$

Tabela A-5: Concentração de metanol devido à ação enzimática e atividade de exo-PG em Pectinex-3XL determinada pelo método titulométrico em diferentes tempos de reação.

Tempo (min)	C_{AR} ($\mu\text{mol/mL}$)	Exo-PG (U/mL)
0	0	0
15	$3,43 \pm 0,37$	$294,74 \pm 31,83$
30	$7,79 \pm 1,08$	$334,65 \pm 46,51$
60	$19,15 \pm 1,01$	$411,39 \pm 21,75$

Tabela A-6: Variação da viscosidade da solução de pectina 1% (p/v) em tampão acetato 0,1 M pH 4,5 a 37°C pela ação da endo-PG da Pectinex-3XL.

Tempo (min)	Viscosidade (cSt/s)	% Redução da Viscosidade
0	$36,12 \pm 0,24$	0
20	$34,60 \pm 0,13$	$4,49 \pm 0,35$
40	$27,65 \pm 0,10$	$23,78 \pm 0,27$
60	$23,93 \pm 0,12$	$34,16 \pm 0,32$
80	$23,92 \pm 0,19$	$34,36 \pm 0,54$
100	$21,00 \pm 0,08$	$42,11 \pm 0,23$
120	$21,61 \pm 0,04$	$40,31 \pm 0,11$
140	$19,12 \pm 0,06$	$47,31 \pm 0,18$
160	$16,75 \pm 0,04$	$53,77 \pm 0,12$

Tabela A-7: Atividade de endo-PG de Pectinex-3XL em diferentes tempos de reação.

Tempo (min)	Endo-PG (U/mL)
20	3989,02 ± 330,14
40	11138,57 ± 128,85
60	10687,06 ± 100,98
80	8019,68 ± 127,76
100	7951,73 ± 43,24
120	6359,05 ± 18,01
140	6387,44 ± 23,96
160	6367,09 ± 14,78

Tabela A-8: Resultados da interferência dos constituintes do sistema aquoso bifásico na concentração de proteínas totais.

Amostra	C _p (g/L)	% interferência
PEG-400	33,81 ± 1,33	10,8
PEG-600	34,57 ± 1,09	8,8
PEG-1000	38,21 ± 0,82	-0,8
PEG-1450	40,92 ± 1,39	8,0
PEG-3350	38,48 ± 1,32	-1,5
PEG-8000	32,61 ± 1,68	14,0
PEG-10000	39,03 ± 2,35	-3,0
Fosfato de potássio	37,59 ± 2,78	0,8
Citrato de sódio	34,64 ± 0,84	8,6
Maltodextrina	33,23 ± 1,62	12,3
Água	37,90 ± 0,35	0,0

Tabela A-9: Resultados da interferência dos constituintes do sistema aquoso bifásico na atividade de PL.

Amostra	PL (U/mL)	% interferência
PEG-400	62,25 ± 2,53	12,7
PEG-600	22,86 ± 1,52	-60,5
PEG-1000	18,07 ± 0,38	-68,8
PEG-1450	17,62 ± 1,68	-69,6
PEG-3350	37,94 ± 0,40	-34,4
PEG-8000	27,95 ± 0,15	-51,7
PEG-10000	51,73 ± 4,93	-10,6
Fosfato de potássio	7,27 ± 0,47	-87,4
Citrato de sódio	14,03 ± 1,29	-75,8
Maltodextrina	2,08 ± 0,28	-96,4
Água	57,88 ± 4,40	0,0

Tabela A-10: Resultados da interferência dos constituintes do sistema aquoso bifásico na atividade de exo-PG.

Amostra	Exo-PG (U/mL)	% interferência
PEG-400	27,68 ± 2,01	153,5
PEG-600	22,80 ± 1,35	108,8
PEG-1000	18,60 ± 1,04	70,3
PEG-1450	19,57 ± 1,34	79,3
PEG-3350	19,82 ± 0,14	81,5
PEG-8000	15,37 ± 0,38	40,7
PEG-10000	21,16 ± 0,44	93,8
Fosfato de potássio	8,18 ± 0,31	-25,1
Citrato de sódio	8,97 ± 0,06	-17,8
Maltodextrina	131,94 ± 2,97	1135,7
Água	10,92 ± 0,30	0,0

Tabela A-11: Resultados da interferência dos constituintes do sistema aquoso bifásico na atividade de endo-PG.

Amostra	Endo-PG (U/mL)	% interferência
PEG-400	10991,99 ± 627,57	-2,4
PEG-600	11251,10 ± 74,98	-0,1
PEG-1000	11268,47 ± 527,45	0,0
PEG-1450	10853,72 ± 207,89	-3,7
PEG-3350	11631,49 ± 180,02	3,2
PEG-8000	11258,86 ± 157,42	-0,1
PEG-10000	11235,08 ± 479,74	-0,3
Fosfato de potássio	11487,89 ± 274,56	2,0
Citrato de sódio	10845,34 ± 708,17	-3,7
Maltodextrina	11340,69 ± 412,82	-0,6
Água	11267,63 ± 168,65	0,0

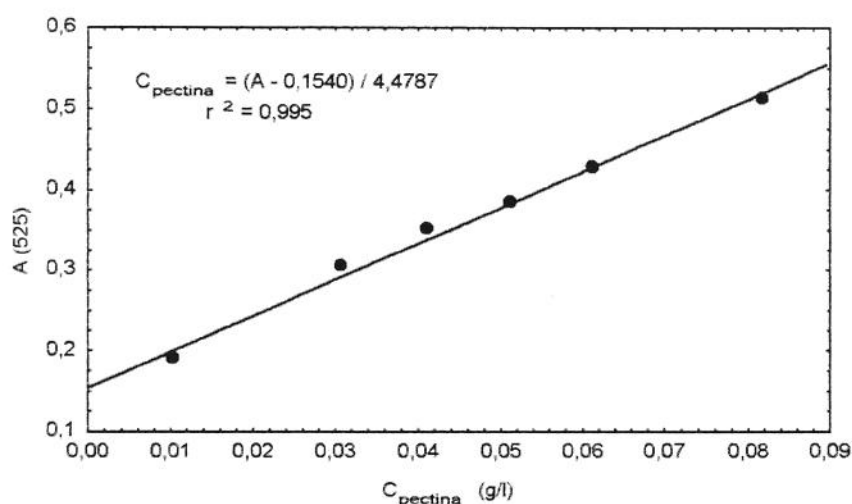


Figura A-1: Curva padrão de pectina pelo método de Dietz & Rouse (1953).

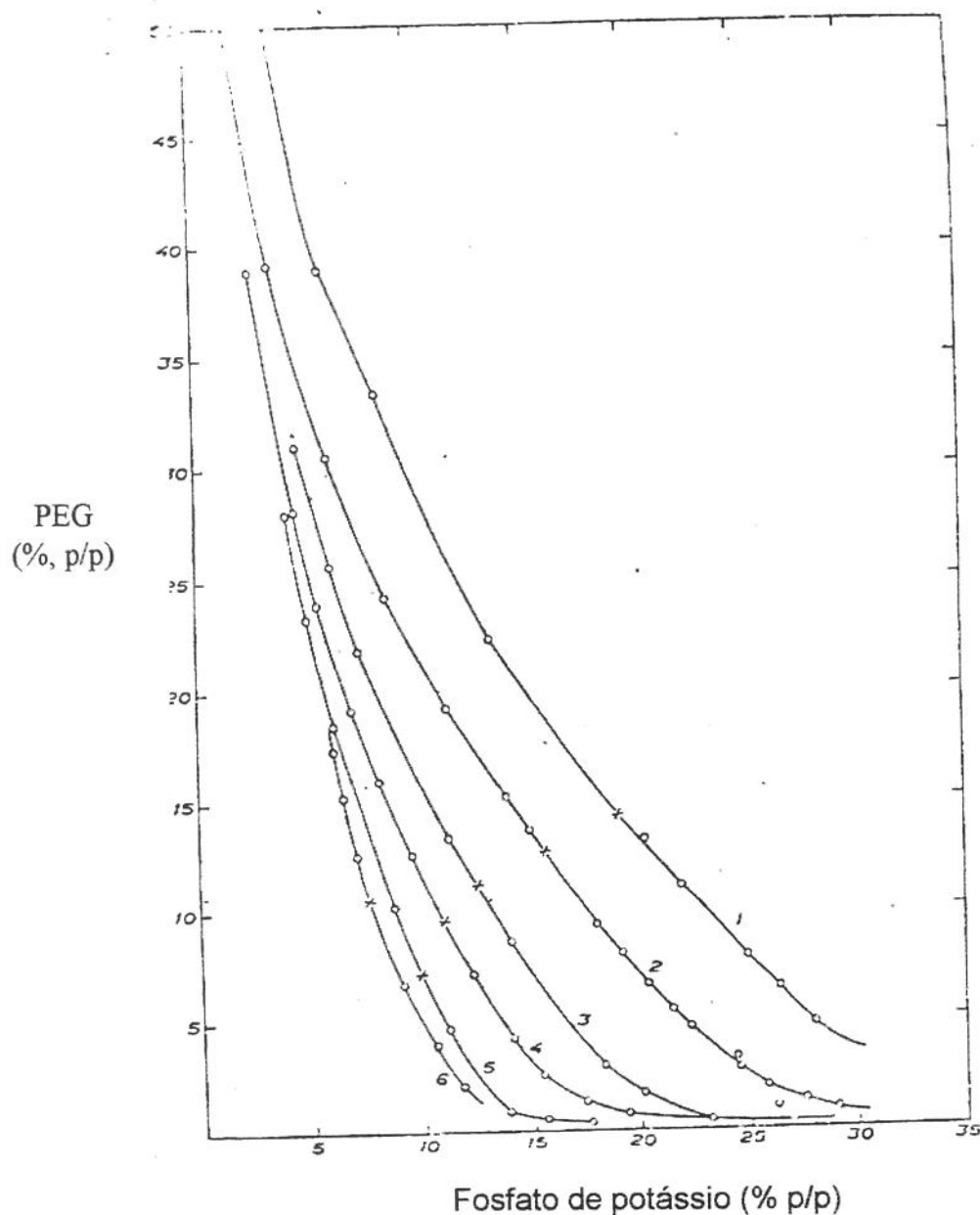


Figura A-2: Curvas binodais para o sistema PEG/fosfato com diferentes massas moleculares de PEG (1- PEG-300, 2- PEG-600, 3- PEG-1450, 4- PEG-4000, 5- PEG-6000 e 6- PEG-20000) a 20°C. Fonte: Albertsson (1986).

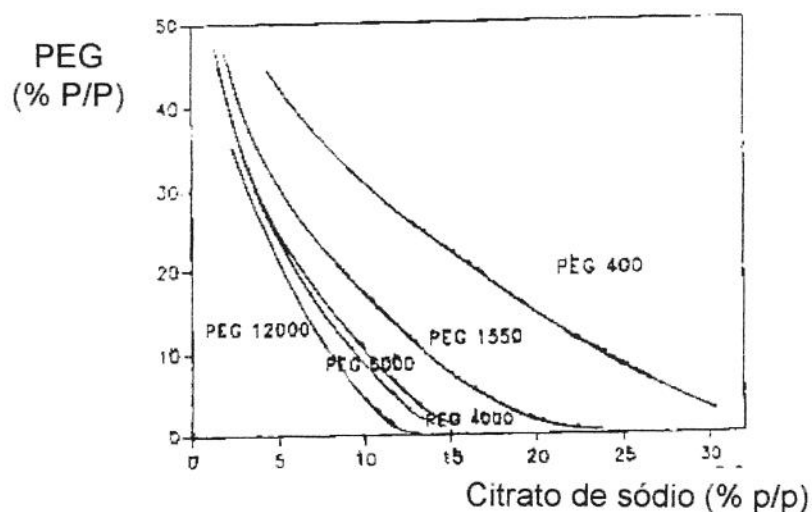


Figura A-3: Curvas binodais para o sistema PEG/citrato com diferentes massas moleculares de PEG a pH 7 e 25°C. Fonte: Vernau & Kula (1990).

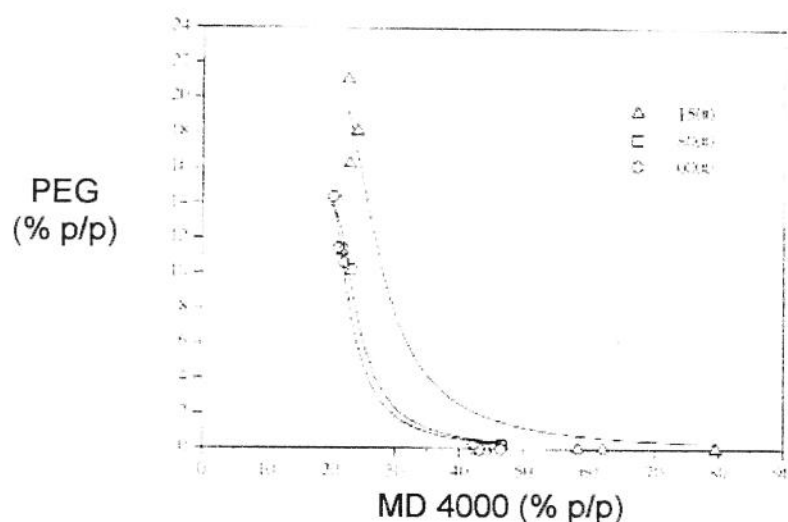


Figura A-4: Diagrama de fase para o sistema PEG/maltodextrina a pH 7 e 25°C. Fonte: Silva & Meirelles (2000).

Apêndice B

Tabelas Referentes ao Capítulo 3

Tabela B-1: Resultados da fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Pichia canadensis* CCT-2636 a 28°C e pH 5,0 em meio 03.

Tempo (h)	Massa seca (g/L)	PE (U/mL)	PL (U/mL)	Exo-PG (U/mL)	Endo-PG (U/mL)
0	0	0	0	0	0,000
24	2,94	0,019 ± 0,000	0	0,15 ± 0,03	0,000
48	2,48	0,017 ± 0,000	0,020 ± 0,000	0,14 ± 0,02	0,000
72	3,40	0,017 ± 0,000	0,210 ± 0,002	0	4,21 ± 0,48
96	3,10	0,028 ± 0,001	0,080 ± 0,015	0	15,68 ± 2,83
120	2,56	0,012 ± 0,002	0	0	8,12 ± 1,20
144	1,96	0,018 ± 0,000	0	0,20 ± 0,01	20,96 ± 1,84
168	2,44	0,016 ± 0,000	0,010 ± 0,000	0,08 ± 0,01	18,28 ± 1,85
192	0,90	0,017 ± 0,000	0	0	15,35 ± 1,38

Tabela B-2: Resultados do comportamento do pH, concentração de proteína e glicose na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Pichia canadensis* CCT-2636 a 28°C e pH 5,0 em meio 03.

Tempo (min)	pH	Glicose (g/L)	Proteína (g/L)	Tempo (min)	pH	Glicose (g/L)	Proteína (g/L)
0	5,05	26,88	1,53 ± 0,01	16	4,14	10,77	1,06 ± 0,01
1		26,33		17	4,12		
2	4,91	24,68		18	4,11	9,46	
3	4,84	24,63		19	4,09		
4		24,39	1,50 ± 0,01	20			
5		24,26		21	4,08	8,80	0,93 ± 0,01
6	4,60	22,06		22	4,10		
7	4,58	21,14		23	4,10		
8	4,46	20,77	1,38 ± 0,01	24	4,11	7,12	0,90 ± 0,04
9	4,43	20,32		48	4,86	2,04	1,32 ± 0,01
10	4,40	16,87		72	4,74	0,16	1,34 ± 0,12
11	4,32	16,30		96	4,72	0,17	1,46 ± 0,07
12	4,27			120	4,66	0,17	1,45 ± 0,02
13	4,22		1,34 ± 0,01	144	4,63	0,08	0,82 ± 0,00
14	4,17	15,69		168	4,70	0,05	1,01 ± 0,00
15	4,14	13,90		192	4,93	0,04	1,08 ± 0,01

Tabela B-3: Resultados da fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Penicillium italicum* IZ-1584 a 28°C e pH 4,5 em meio 01.

Tempo (h)	pH	Proteína (g/L)	Massa seca (g/L)	Pectina (g/L)	PE (U/mL)	PL (U/mL)	Exo-PG (U/mL)	Endo-PG (U/mL)
0	4,50	0	0	3,10 ± 0,00	0	0	0	0
24	4,04	0,02 ± 0,00	1,49	2,62 ± 0,00	0,010 ± 0,001	0	0,07 ± 0,01	0
48	3,48	0,03 ± 0,01	2,32	1,64 ± 0,02	0,009 ± 0,000	0,010 ± 0,000	0,10 ± 0,03	0
72	3,78	0,06 ± 0,00	2,05	1,46 ± 0,02	0,010 ± 0,000	0,020 ± 0,000	0,15 ± 0,00	2,71 ± 0,01
96	3,99	0,08 ± 0,01	1,97	1,72 ± 0,17	0,013 ± 0,000	0,060 ± 0,000	0,16 ± 0,00	1,58 ± 0,01
120	4,33	0,06 ± 0,00	1,83	0,88 ± 0,01	0,020 ± 0,002	0,120 ± 0,010	0,15 ± 0,00	0
144	4,86	0,06 ± 0,00	1,75	0,80 ± 0,04	0,019 ± 0,000	0,160 ± 0,010	0,18 ± 0,02	6,88 ± 0,01
168	5,60	0,08 ± 0,02	1,70	0,67 ± 0,01	0,025 ± 0,000	0,160 ± 0,010	0,19 ± 0,03	4,55 ± 0,01
192	5,61	0,14 ± 0,00	0,51	0,82 ± 0,07	0,026 ± 0,000	0,160 ± 0,010	0,22 ± 0,01	8,96 ± 0,01
216	5,71	0,11 ± 0,02	0,58	0,86 ± 0,00	0,020 ± 0,002	0,120 ± 0,020	0,25 ± 0,02	9,45 ± 0,01
240	5,82	0,09 ± 0,02	0,03	0,67 ± 0,03	0,025 ± 0,001	0,190 ± 0,010	0,16 ± 0,05	12,21 ± 0,01

Tabela B-4: Resultados da fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Penicillium italicum* IZ-1584 a 28°C e pH 4,5 em meio 02.

Tempo (h)	Proteína (g/L)	Massa seca (g/L)	Pectina (g/L)	PE (U/mL)	PL (U/mL)	Exo-PG (U/mL)	Endo-PG (U/mL)
0	0	0	8,11 ± 0,04	0	0	0	0
24	0,61 ± 0,04	0,18	6,85 ± 0,29	0	0	0,06 ± 0,01	0
48	0,97 ± 0,01	3,37	5,40 ± 0,93	0,058 ± 0,004	0	0,24 ± 0,02	0
72	1,04 ± 0,04	2,76	Nd	0,067 ± 0,005	0	0,13 ± 0,00	0
96	0,88 ± 0,01	4,51	5,49 ± 0,00	0,039 ± 0,000	0	0,20 ± 0,02	0
120	0,65 ± 0,06	4,40	4,75 ± 0,37	0	0,020 ± 0,001	0,59 ± 0,07	0
144	0,65 ± 0,06	4,00	3,75 ± 0,20	0,043 ± 0,011	0,010 ± 0,001	0,16 ± 0,02	0
168	0,85 ± 0,05	5,04	3,55 ± 0,63	0	0	0,09 ± 0,00	0
192	0,78 ± 0,03	5,60	Nd	0,024 ± 0,001	0	0,13 ± 0,00	0

Nd = não determinado

Tabela B-5: Resultados do comportamento do pH, concentração de sacarose e glicose na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Penicillium italicum* IZ-1584 a 28°C e pH 5,0 em meio 02.

Tempo (min)	pH	Glicose (g/L)	Sacarose (g/L)	Tempo (min)	pH	Glicose (g/L)	Sacarose (g/L)
0	4,69	0	30,00	15	4,62	1,20	15,78
1	4,60	1,64		16	4,61	1,47	
2	4,62	1,64		17	4,61	1,78	
3	4,63	1,12	22,83	18	4,61	1,69	
4	4,63	1,41		21	4,55	2,23	14,22
5	4,65	1,29		22	4,55		
6	4,65	1,52		23	4,52	2,50	13,28
7	4,65	1,64		24	4,48	2,63	13,27
8	4,65	1,35		48	3,58	13,64	2,41
9	4,65	1,64		72	3,46	11,81	2,34
10	4,65	2,11	19,54	96	3,60	7,24	1,11
11	4,64	1,64		120	3,94	7,25	3,81
12	4,63	1,41		144	6,21	1,61	0,27
13	4,63	1,82		168	5,90	0,09	0,09
14	4,63	1,29		192	5,06	0,00	0,00

Tabela B-6: Resultados da fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Penicillium italicum* IZ-1584 a 28°C e pH 4,5 em meio O3.

Tempo (h)	Massa seca (g/L)	Pectina (g/L)	PE (U/mL)	PL (U/mL)	Exo-PG (U/mL)	Endo-PG (U/mL)
0	0	9,39 ± 0,16	0	0	0	0
24	3,05	6,42 ± 0,00	0	0	0	0
48	3,90	4,12 ± 0,16	0	0	0	2,88 ± 0,01
72	4,00	3,05 ± 0,12	0	0,038 ± 0,000	0,11 ± 0,02	2,08 ± 0,01
96	3,29	Nd	0	0,024 ± 0,000	0,17 ± 0,00	0
120	4,01	3,47 ± 0,28	0	0	0,14 ± 0,01	4,24 ± 0,01
144	4,29	2,91 ± 0,11	0,011 ± 0,000	0,005 ± 0,000	0,07 ± 0,02	4,93 ± 0,01
168	3,72	2,35 ± 0,06	0,011 ± 0,001	0	0	3,28 ± 0,01
192	3,70	1,96 ± 0,20	0,011 ± 0,000	0	0,05 ± 0,00	0
216	2,46	1,60 ± 0,10	0,013 ± 0,002	0	0,02 ± 0,00	5,84 ± 0,01
240	3,30	1,29 ± 0,26	0,012 ± 0,000	0	0,04 ± 0,00	8,37 ± 0,01

Nd = não determinado

Tabela B-7: Resultados do comportamento do pH, concentração de proteína e glicose na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Penicillium italicum* IZ-1584 a 28°C e pH 5,0 em meio 03.

Tempo (min)	pH	Glicose (g/L)	Proteína (g/L)	Tempo (min)	pH	Glicose (g/L)	Proteína (g/L)
0	4,69	28,88	1,64 ± 0,01	17	4,60		
1	4,66		1,62 ± 0,01	18	4,59		1,53 ± 0,01
2	4,66			20	4,58		
3	4,65	28,34		21	4,56		
4	4,64			22	4,55	19,06	1,50 ± 0,01
5	4,64	25,03	1,61 ± 0,01	24	4,54	18,59	1,63 ± 0,08
7	4,63		1,59 ± 0,01	48	3,68	16,02	0,97 ± 0,00
8	4,63			72	3,33		0,92 ± 0,17
9	4,62	24,63	1,55 ± 0,01	96	3,31	11,60	0,88 ± 0,03
10	4,62			120	2,82	6,36	0,76 ± 0,01
11	4,61			144	2,63	0,11	0,87 ± 0,00
13	4,60		1,56 ± 0,01	168	2,56	0,07	0,93 ± 0,01
14	4,60	21,16		192	2,66	0,12	1,08 ± 0,01
15	4,60	20,68		216	2,75	0,31	0,88 ± 0,00
16	4,60			240	2,80	0,06	0,85 ± 0,10

Tabela B-8 Resultados da fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Humicola grisea* CCT-2664 a 28°C e pH 4,5 em meio 01.

Tempo (h)	pH	Proteína (g/L)	Massa seca (g/L)	Pectina (g/L)	PE (U/mL)	PL (U/mL)	Exo-PG (U/mL)	Endo-PG (U/mL)
0	4,34	0	0	6,17 ± 0,05	0	0	0	0
24	3,47	0	3,13	3,77 ± 0,08	0,029 ± 0,000	0,005 ± 0,000	0,05 ± 0,00	0
48	2,86	0,01 ± 0,01	5,33	2,31 ± 0,06	0,033 ± 0,000	0	0,08 ± 0,00	0,64 ± 0,01
72	3,37	0,16 ± 0,02	6,36	Nd	0,050 ± 0,000	0	0,06 ± 0,00	0
96	4,03	0,23 ± 0,03	4,91	1,63 ± 0,02	0,069 ± 0,002	0	0,12 ± 0,00	0
120	4,10	0,15 ± 0,03	3,91	1,50 ± 0,02	0,076 ± 0,002	0,006 ± 0,000	0,13 ± 0,01	0
144	4,15	0,18 ± 0,00	1,94	1,10 ± 0,06	0,061 ± 0,002	0,003 ± 0,000	0,15 ± 0,00	0
168	4,18	0,17 ± 0,04	1,38	1,07 ± 0,00	0,061 ± 0,000	0	0,13 ± 0,00	0
192	4,25	0,13 ± 0,02	1,47	1,17 ± 0,04	0,065 ± 0,001	0,015 ± 0,000	0,16 ± 0,01	6,08 ± 0,00
216	4,32	0,12 ± 0,01	1,43	1,19 ± 0,00	0,069 ± 0,000	0	0,14 ± 0,01	3,32 ± 0,00
240	4,43	0,22 ± 0,01	1,87	1,02 ± 0,03	0,068 ± 0,001	0	0,15 ± 0,00	15,87 ± 3,32

Nd = não determinado

Tabela B-9: Resultados da fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Humicola grisea* CCT-2664 a 28°C e pH 4,5 em meio O2.

Tempo (h)	Proteína (g/L)	Massa seca (g/L)	Pectina (g/L)	PE (U/mL)	PL (U/mL)	Exo-PG (U/mL)	Endo-PG (U/mL)
0	0	0	5,26 ± 0,08	0	0	0	0
24	0,02 ± 0,00	2,16	5,10 ± 0,16	0	0,008 ± 0,000	0	0
48	0	5,12	5,20 ± 0,05	0,030 ± 0,000	0,009 ± 0,000	0	0
72	0,09 ± 0,00	5,64	4,03 ± 0,08	0,030 ± 0,000	0	0,08 ± 0,00	0
96	0,05 ± 0,00	6,46	2,08 ± 0,08	0,030 ± 0,000	0	0,08 ± 0,01	0
120	0,12 ± 0,02	5,40	2,11 ± 0,01	0,030 ± 0,000	0	0	0
144	0,17 ± 0,01	4,62	2,14 ± 0,03	0,030 ± 0,000	0	0,08 ± 0,00	0
168	0,11 ± 0,03	5,76	1,70 ± 0,10	0	0	0,06 ± 0,00	0
192	0,19 ± 0,02	6,25	2,12 ± 0,07	0,030 ± 0,000	0	0	0
216	0,37 ± 0,00	5,07	1,83 ± 0,10	0	0	0,09 ± 0,02	0
240	0,45 ± 0,01	3,93	1,00 ± 0,03	0	0	0,11 ± 0,03	0

Tabela B-10: Resultados do comportamento do pH, concentração de sacarose e glicose na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Humicola grisea* CCT-266436 a 28°C e pH 5,0 em meio O2.

Tempo (min)	pH	Glicose (g/L)	Sacarose (g/L)	Tempo (min)	pH	Glicose (g/L)	Sacarose (g/L)
0	4,50	0	27,15	16	3,13	0,97	
1		0,32		17	3,12	0,25	
2		1,46		18	3,09	0,18	
3		2,05	10,70	19	3,05	0,17	6,54
4		0,84	10,57	22	2,94	0,10	
5	3,54	0,44		23	2,90	0,17	
6	3,40	1,78		24	2,88	3,62	
7	3,32	0,60		48	2,13	0,03	6,34
8	3,27	2,63	8,44	72	3,98	0,08	
9	3,24	2,90	7,84	96	3,94	0,12	2,38
10	3,22	2,95		120	3,82	0,11	2,28
11	3,21	0,74		144	4,40	0,01	1,76
12	3,20	2,68		168	4,67	0,01	1,24
13	3,19	0,28		192	4,79	0,00	1,28
14	3,17	0,45		216	5,38	0,00	0,18
15	3,15	0,28		240	6,23	0,00	0,02

Tabela B-11: Resultados da fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Humicola grisea* CCT-2664 a 28°C e pH 4,5 em meio 03.

Tempo (h)	Massa seca (g/L)	Pectina (g/L)	PE (U/mL)	PL (U/mL)	Exo-PG (U/mL)	Endo-PG (U/mL)
0	0	4,65 ± 0,00	0	0	0	0
24	6,02	4,97 ± 0,00	0,031 ± 0,000	0,019 ± 0,001	0	0
48	5,73	Nd	0,031 ± 0,000	0	0	0
72	6,62	Nd	0	0,143 ± 0,002	0,15 ± 0,07	0
96	8,05	Nd	0,032 ± 0,001	0	0,08 ± 0,01	0
120	7,83	3,83 ± 0,12	0,031 ± 0,000	0	0,05 ± 0,00	1,82 ± 0,24
144	8,63	3,04 ± 0,01	0,029 ± 0,000	0	0	12,33 ± 0,58
168	9,82	Nd	0,031 ± 0,000	0,001 ± 0,000	0,06 ± 0,01	8,32 ± 0,15
192	8,60	1,34 ± 0,07	0,043 ± 0,000	0,024 ± 0,005	0	16,30 ± 0,43
216	8,05	0,99 ± 0,05	0,044 ± 0,001	0,040 ± 0,002	0,17 ± 0,01	28,83 ± 0,63
240	6,62	0,91 ± 0,09	0,044 ± 0,001	0,060 ± 0,003	0,11 ± 0,00	31,04 ± 0,28

Nd = não determinado

Tabela B-12: Resultados do comportamento do pH, concentração de proteína e glicose na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Humicola grisea* CCT-2664 a 28°C e pH 5,0 em meio O3.

Tempo (min)	pH	Glicose (g/L)	Proteína (g/L)	Tempo (min)	pH	Glicose (g/L)	Proteína (g/L)
0	4,99	22,24	1,45 ± 0,01	16	6,36		1,29 ± 0,01
1	5,08	22,21	1,60 ± 0,01	17	6,39		1,45 ± 0,01
3	5,22		1,57 ± 0,01	21	5,48	19,65	1,35 ± 0,01
4	5,38		1,59 ± 0,01	22	5,39		1,33 ± 0,01
5	5,49	20,78	1,51 ± 0,01	23	5,38	18,95	1,19 ± 0,01
6	5,74		1,49 ± 0,01	24	5,40		1,07 ± 0,00
7	5,98	21,53	1,35 ± 0,01	48	4,66	18,89	0,88 ± 0,00
8	6,18		1,67 ± 0,01	72	3,92	13,46	1,13 ± 0,01
9	6,29	19,49	1,57 ± 0,01	96	3,52	0,37	0,82 ± 0,04
10	6,35		1,52 ± 0,01	120	3,21	0	0,42 ± 0,04
11	6,36	19,42	1,50 ± 0,01	144	2,97	0	0,27 ± 0,00
12	6,36		1,46 ± 0,01	168	2,91	0	0,93 ± 0,04
13	4,60		1,40 ± 0,01	192	2,67	0	0,59 ± 0,01
14	4,60		1,35 ± 0,01	216	2,90	0	0,94 ± 0,07
15	4,60	18,26	1,36 ± 0,01	240	3,11	0	0,56 ± 0,02

Tabela B-13: Resultados da fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Aspergillus niger* NRRL-3122 a 28°C e pH 4,5 em meio 01.

Tempo (h)	pH	Proteína (g/L)	Massa seca (g/L)	Pectina (g/L)	PE (U/mL)	PL (U/mL)	Exo-PG (U/mL)	Endo-PG (U/mL)
0	4,50	0	0	6,58 ± 0,06	0	0	0	0
24	3,68	0,11 ± 0,00	3,55	6,08 ± 0,44	0,030 ± 0,000	0	0	0
48	3,27	Nd	2,05	4,02 ± 0,08	0,030 ± 0,000	0,008 ± 0,000	0,06 ± 0,00	2,25 ± 0,02
72	3,46	0,45 ± 0,03	2,40	2,69 ± 0,17	0,034 ± 0,000	0,007 ± 0,000	0,09 ± 0,02	0
96	3,56	0,17 ± 0,00	3,44	2,25 ± 0,02	0,038 ± 0,000	0,008 ± 0,000	0,10 ± 0,00	0
120	3,80	0,13 ± 0,01	3,45	0,99 ± 0,05	0,038 ± 0,000	0,042 ± 0,000	0,13 ± 0,02	5,79 ± 0,02
144	4,04	0,20 ± 0,00	3,96	0,51 ± 0,00	0,044 ± 0,001	0,065 ± 0,002	0,11 ± 0,03	16,01 ± 0,05
168	4,63	0,21 ± 0,02	3,84	0,43 ± 0,01	0,044 ± 0,000	0,076 ± 0,002	0,12 ± 0,00	9,85 ± 0,04
192	5,43	0,23 ± 0,01	1,57	0,32 ± 0,03	0,037 ± 0,000	0,083 ± 0,005	0,11 ± 0,01	24,89 ± 3,40
216	5,86	0,15 ± 0,01	2,59	0,35 ± 0,00	0,036 ± 0,000	0,070 ± 0,005	0,17 ± 0,00	12,89 ± 2,40
240	5,73	0,14 ± 0,03	2,24	0,35 ± 0,00	0,035 ± 0,000	0,052 ± 0,004	0,15 ± 0,02	22,13 ± 4,10

Nd = não determinado

Tabela B-14: Resultados da fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Aspergillus niger* NRRL-31222664 a 28°C e pH 4,5 em meio O2.

Tempo (h)	Proteína (g/L)	Massa seca (g/L)	Pectina (g/L)	PE (U/mL)	PL (U/mL)	Exo-PG (U/mL)	Endo-PG (U/mL)
0	0	0	7,19 ± 0,15	0	0	0	0
24	1,41 ± 0,02	2,42	7,34 ± 0,18	0	0	0	10,19 ± 0,41
48	0,56 ± 0,00	6,18	3,70 ± 0,13	0	0	0,73 ± 0,30	13,03 ± 0,07
72	1,28 ± 0,09	9,48	Nd	0	0,016 ± 0,002	0,59 ± 0,00	5,18 ± 0,08
96	0,48 ± 0,00	7,78	2,69 ± 0,12	0	0,011 ± 0,001	0	13,87 ± 0,29
120	0,68 ± 0,01	18,69	Nd	0	0	0,68 ± 0,12	0
144	1,12 ± 0,02	13,00	1,72 ± 0,14	0,030 ± 0,000	0,005 ± 0,000	0,19 ± 0,04	3,98 ± 0,16
168	0,57 ± 0,00	13,56	Nd	0,030 ± 0,000	0,003 ± 0,000	0	6,35 ± 0,11
192	0,73 ± 0,12	8,87	Nd	0	0,032 ± 0,005	0	14,77 ± 2,36
216	0,71 ± 0,02	7,87	1,18 ± 0,13	0	0,006 ± 0,000	0	16,71 ± 1,63
240	0,63 ± 0,01	5,01	0,92 ± 0,00	0	0	0,20 ± 0,08	0

Nd = não determinado

Tabela B-15: Resultados do comportamento do pH, concentração de sacarose e glicose na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Aspergillus niger* NRRL-3122 a 28°C e pH 5,0 em meio 02.

Tempo (min)	pH	Glicose (g/L)		Tempo (min)	pH	Glicose (g/L)		Sacarose (g/L)
		Glicose (g/L)	Sacarose (g/L)			Glicose (g/L)	Sacarose (g/L)	
0	4,31	0	6,89	16	4,19	5,55	1,41	
1	4,44	2,25		17	4,14	6,00	0,89	
2	4,48	2,25		18	4,09			
3	4,47	2,07		21	3,83	9,39		
4	4,46	2,57	4,21	22	3,75	10,11		
5	4,44	2,34		23	3,65	9,93		
6	4,41	2,34		24	3,53	18,08	0	
7	4,39	2,12		48	3,12	15,09	0	
8	4,38	2,52		72	3,15	9,79	0	
9	4,37			96	2,95	3,03	0	
10	4,36	3,17	4,18	120	2,76	0,21	0	
11	4,34	3,25		144	2,74	0	0	
12	4,31	3,35	3,43	168	2,70	0	0	
13	4,28	3,75	3,39	192	3,04	0	0	
14	4,26	3,84	3,34	216	5,55	0	0	
15	4,23	3,96		240	6,20	0	0	

Tabela B-16: Resultados da fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Aspergillus niger* NRRL-31222664 a 28°C e pH 4,5 em meio 03.

Tempo (h)	Massa seca (g/L)	Pectina (g/L)	PE (U/mL)	PL (U/mL)	Exo-PG (U/mL)	Endo-PG (U/mL)
0	0	9,71 ± 1,01	0	0	0	0
24	6,61	Nd	0	0,002 ± 0,000	0,42 ± 0,08	0
48	6,53	2,63 ± 0,40	0	0,004 ± 0,000	0,50 ± 0,00	0
72	8,20	1,43 ± 0,17	0,029 ± 0,000	0	0,14 ± 0,03	0
96	8,69	Nd	0,044 ± 0,005	0	0	0
120	9,42	Nd	0,033 ± 0,000	0,003 ± 0,000	0	0
144	8,21	1,02 ± 0,03	0	0,011 ± 0,000	0,04 ± 0,01	0
168	8,89	Nd	0	0,024 ± 0,014	0,10 ± 0,01	4,41 ± 0,33
192	10,25	Nd	0	0,020 ± 0,003	0,05 ± 0,00	20,71 ± 2,50
216	10,50	0,73 ± 0,05	0,034 ± 0,000	0,054 ± 0,001	0,20 ± 0,02	42,76 ± 6,05
240	12,12	0,70 ± 0,00	0,035 ± 0,000	0,069 ± 0,007	0,19 ± 0,02	56,83 ± 3,44

Tabela B-17: Resultados do comportamento do pH, concentração de proteína e glicose na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Aspergillus niger* NRRL-3122 a 28°C e pH 5,0 em meio 03.

Tempo (min)	pH	Glicose (g/L)	Proteína (g/L)	Tempo (min)	pH	Glicose (g/L)	Proteína (g/L)
0	4,92	25,29	0,65 ± 0,01	16	3,93		0,85 ± 0,01
1	4,82	27,21	0,85 ± 0,01	17	3,81	25,36	0,83 ± 0,01
3	4,73		0,92 ± 0,01	21	3,48		0,97 ± 0,01
4	4,71		0,92 ± 0,01	22	3,41	23,59	0,73 ± 0,01
5	4,70		1,42 ± 0,01	23	3,34		0,85 ± 0,01
6	4,70		1,11 ± 0,01	24	3,28	22,93	0,37 ± 0,02
7	4,67		1,01 ± 0,01	48	2,69	10,72	0,76 ± 0,07
8	4,64		1,04 ± 0,01	72	2,63	5,96	1,17 ± 0,06
9	4,62		1,28 ± 0,01	96	2,57	0	0,89 ± 0,03
10	4,59		1,00 ± 0,01	120	2,45	0	0,88 ± 0,04
11	4,53		0,87 ± 0,01	144	2,33	0	0,81 ± 0,03
12	4,40		1,04 ± 0,01	168	2,22	0	1,01 ± 0,02
13	4,32		1,18 ± 0,01	192	2,20	0	0,68 ± 0,06
14	4,20		0,90 ± 0,01	216	2,41	0	0,73 ± 0,06
15	4,07		0,75 ± 0,01	240	2,74	0	0,60 ± 0,02

Apêndice C

Tabelas Referentes ao Capítulo 4

Tabela C-1: Volume das fases e do sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C para separar enzimas pectinolíticas contidas na Pectinex-3XL.

Massa Molecular do PEG	V _{topo} (mL)	V _{fundo} (mL)	V _{sistema} (mL)	% topo	% fundo
400	7,6 ± 0,00	3,2 ± 0,00	10,8	70,37	29,63
600	7,1 ± 0,10	4,7 ± 0,01	11,8	60,17	39,83
1000	6,4 ± 0,05	5,0 ± 0,00	11,4	55,95	44,05
1450	6,0 ± 0,00	5,4 ± 0,02	11,4	52,63	47,37
3350	5,8 ± 0,00	5,6 ± 0,00	11,4	50,88	49,12
8000	5,1 ± 0,10	5,8 ± 0,00	10,9	46,79	53,21
10000	5,1 ± 0,10	6,0 ± 0,02	11,1	45,95	54,05

Tabela C-2: Coeficientes de partição para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C para separar enzimas pectinolíticas contidas na Pectinex-3XL.

MM do PEG	Proteína	PE	PL	Exo-PG	Endo-PG
400	0,82 ± 0,036	1,33 ± 0,077	6,43 ± 0,604	1,86 ± 0,027	1,09 ± 0,017
600	0,54 ± 0,051	1,51 ± 0,174	43,18 ± 14,539	0,67 ± 0,037	1,04 ± 0,028
1000	0,10 ± 0,030	0,78 ± 0,050	1,98 ± 0,040	0,16 ± 0,021	1,13 ± 0,065
1450	0,11 ± 0,005	0,70 ± 0,048	1,76 ± 0,040	0,24 ± 0,042	0,81 ± 0,035
3350	0,06 ± 0,001	0,62 ± 0,020	0,86 ± 0,011	0,08 ± 0,001	0,78 ± 0,145
8000	0,07 ± 0,023	0,70 ± 0,046	0,51 ± 0,020	0,46 ± 0,018	0,84 ± 0,048
10000	0,04 ± 0,005	1,14 ± 0,009	0,86 ± 0,076	1,35 ± 0,199	0,18 ± 0,002

Tabela C-3: Recuperações (%) na fase de fundo para o sistema PEG/fosfato de potássio (20-15%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Proteína	PE	PL	Exo-PG	Endo-PG
400	33,9	24,0	5,5	18,5	27,80
600	55,0	30,4	1,5	49,5	38,83
1000	89,0	50,2	28,4	83,1	41,01
1450	88,9	56,3	33,8	79,2	52,53
3350	94,5	60,8	52,8	92,0	55,45
8000	94,0	61,7	69,1	71,3	57,56
10000	97,0	50,9	57,7	86,7	46,53

Tabela C-4: Fatores de Purificação na fase de fundo para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	PE	PL	Exo-PG	Endo-PG
400	0,71	0,18	0,54	0,81
600	0,56	0,04	0,90	0,77
1000	0,57	0,32	0,93	0,52
1450	0,63	0,38	0,89	0,48
3350	0,64	0,56	0,97	0,37
8000	0,66	0,74	0,76	0,57
10000	0,52	0,60	0,89	0,34

Tabela C-5: Resultados da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Pectinex-3XL pelo sistema PEG 400/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	8,33	5,18	2,66
PE (U)	14,23	8,67	2,74
PL (U)	31,26	22,18	1,47
Exo-PG (U)	165,74	79,43	17,99
Endo-PG (U)	11728,15	7885,11	3040,76

Tabela C-6: Resultados da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Pectinex-3XL pelo sistema PEG-600/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	9,94	3,47	4,28
PE (U)	16,99	9,01	4,05
PL (U)	37,32	30,87	0,67
Exo-PG (U)	197,86	44,52	43,86
Endo-PG (U)	14000,58	7339,04	4663,99

Tabela C-7: Resultados da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Pectinex-3XL pelo sistema PEG-1000/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	9,20	0,74	5,95
PE (U)	15,72	5,05	5,18
PL (U)	34,52	36,64	14,58
Exo-PG (U)	183,05	13,42	65,20
Endo-PG (U)	12953,10	5545,50	4324,21

Tabela C-8: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Pectinex-3XL pelo sistema PEG-1450/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	9,28	0,83	6,65
PE (U)	15,86	4,81	6,20
PL (U)	13067,48	37,71	19,32
Exo-PG (U)	184,67	14,03	52,00
Endo-PG (U)	34,83	4029,91	4481,39

Tabela C-9: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Pectinex-3XL pelo sistema PEG-3350/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	9,28	0,38	6,59
PE (U)	15,86	4,11	6,39
PL (U)	34,83	12,04	13,48
Exo-PG (U)	184,67	5,62	64,66
Endo-PG (U)	13067,48	3152,42	3404,97

Tabela C-10: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Pectinex-3XL pelo sistema PEG-8000/fosfato de potássio (20-15%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	8,48	0,42	6,64
PE (U)	14,49	3,80	6,14
PL (U)	31,84	6,42	14,41
Exo-PG (U)	168,83	26,65	66,25
Endo-PG (U)	11946,35	3687,10	5314,28

Tabela C-11: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Pectinex-3XL pelo sistema PEG-10000/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	8,80	0,22	7,35
PE (U)	15,03	5,37	5,56
PL (U)	33,02	8,27	11,35
Exo-PG (U)	175,08	10,15	66,29
Endo-PG (U)	12388,77	3230,32	3489,57

Tabela C-12: Volume das fases para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C com NaCl (6%) para separar enzimas pectinolíticas contidas na Pectinex-3XL.

Massa Molecular do PEG	V _{topo} (mL)	V _{fundo} (mL)	V _{sistema} (mL)	% topo	% fundo
400	7,0 ± 0,00	4,4 ± 0,00	11,40	61,40	38,60
600	6,5 ± 0,10	5,0 ± 0,00	11,50	56,52	43,48
1000	6,0 ± 0,00	5,6 ± 0,20	11,60	51,72	48,28
1450	5,8 ± 0,00	5,6 ± 0,00	11,40	50,88	49,12
3350	5,6 ± 0,00	5,8 ± 0,00	11,40	49,12	50,88
8000	5,0 ± 0,00	6,2 ± 0,00	11,20	44,64	55,36
10000	4,7 ± 0,10	6,0 ± 0,20	10,70	43,93	56,07

Tabela C-13: Coeficientes de partição para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C com NaCl (6%) para separar enzimas pectinolíticas contidas na Pectinex-3XL.

MM do PEG	Proteína	PE	PL	Exo-PG	Endo-PG
400	1,43 ± 0,023	1,34 ± 0,005	7,64 ± 0,008	5,35 ± 0,222	1,15 ± 0,107
600	0,67 ± 0,012	0,99 ± 0,038	9,55 ± 0,029	0,94 ± 0,078	1,01 ± 0,005
1000	0,24 ± 0,000	0,67 ± 0,003	2,66 ± 0,003	0,22 ± 0,052	0,90 ± 0,027
1450	0,10 ± 0,002	0,63 ± 0,010	1,40 ± 0,010	0,15 ± 0,023	0,65 ± 0,022
3350	0,07 ± 0,009	0,65 ± 0,006	1,33 ± 0,008	0,16 ± 0,053	0,80 ± 0,028
8000	0,17 ± 0,008	0,71 ± 0,070	1,15 ± 0,006	0,39 ± 0,037	0,48 ± 0,011
10000	0,17 ± 0,017	0,85 ± 0,006	1,18 ± 0,045	0,74 ± 0,027	0,85 ± 0,046

Tabela C-14: Recuperações (%) na fase de fundo para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Proteína	PE	PL	Exo-PG	Endo-PG
400	30,5	31,9	7,6	10,5	35,4
600	53,4	43,8	7,5	44,9	43,2
1000	79,8	58,0	26,0	81,2	50,9
1450	91,0	60,7	40,8	86,9	59,6
3350	93,5	61,6	43,7	86,4	56,5
8000	88,2	63,7	51,8	76,1	72,0
10000	88,4	60,0	52,0	63,2	59,9

Tabela C-15: Fatores de Purificação na fase de fundo para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	PE	PL	Exo-PG	Endo-PG
400	1,04	0,25	0,35	1,13
600	0,82	0,14	0,84	0,81
1000	0,73	0,33	1,02	0,63
1450	0,67	0,45	0,95	0,64
3350	0,66	0,47	0,92	0,60
8000	0,72	0,59	0,86	0,78
10000	0,68	0,59	0,72	0,66

Tabela C-16: Resultados da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Pectinex-3XL pelo sistema PEG 400/fosfato de potássio (20-15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	9,28	4,88	2,15
PE (U)	13,26	6,79	3,17
PL (U)	34,83	36,96	3,04
Exo-PG (U)	184,67	63,93	7,55
Endo-PG (U)	13067,48	7374,89	3872,01

Tabela C-17: Resultados da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Pectinex-3XL pelo sistema PEG-600/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	9,44	3,20	3,67
PE (U)	13,49	6,29	4,89
PL (U)	35,44	40,17	3,23
Exo-PG (U)	187,92	31,54	25,75
Endo-PG (U)	13297,74	6555,73	5012,11

Tabela C-18: Resultados da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Pectinex-3XL pelo sistema PEG-1000/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	9,61	1,34	5,27
PE (U)	13,73	4,74	6,55
PL (U)	36,06	41,46	14,57
Exo-PG (U)	191,21	13,13	56,58
Endo-PG (U)	13530,01	5047,43	5090,15

Tabela C-19: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Pectinex-3XL pelo sistema PEG-1450/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	9,28	0,54	5,40
PE (U)	13,26	4,20	6,48
PL (U)	34,83	33,31	22,92
Exo-PG (U)	184,67	7,50	48,49
Endo-PG (U)	13067,48	4423,08	6087,85

Tabela C-20: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Pectinex-3XL pelo sistema PEG-3350/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	9,28	0,40	5,75
PE (U)	13,26	4,01	6,43
PL (U)	34,83	28,99	22,52
Exo-PG (U)	184,67	8,49	53,83
Endo-PG (U)	13067,48	4525,98	5879,22

Tabela C-21: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Pectinex-3XL pelo sistema PEG-8000/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	8,96	0,76	5,65
PE (U)	12,79	3,92	6,29
PL (U)	33,62	22,61	24,30
Exo-PG (U)	178,25	13,93	44,12
Endo-PG (U)	12612,99	2195,30	4905,37

Tabela C-22: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Pectinex-3XL pelo sistema PEG-10000/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	8,17	0,75	5,69
PE (U)	11,68	4,20	6,31
PL (U)	30,68	18,88	20,44
Exo-PG (U)	162,69	32,28	55,84
Endo-PG (U)	11511,97	4275,81	5974,28

Tabela C-23: Volume das fases para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C para separar enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L.

MM do PEG	V _{topo} (mL)	V _{fundo} (mL)	V _{sistema} (mL)	% topo	% fundo
600	5,2 ± 0,08	4,7 ± 0,10	9,90	52,53	47,47
1000	4,7 ± 0,08	5,2 ± 0,05	9,85	47,72	52,28
1450	4,5 ± 0,00	5,1 ± 0,05	9,55	47,12	52,88
3350	4,3 ± 0,08	5,0 ± 0,05	9,25	46,49	53,51
8000	4,3 ± 0,09	5,1 ± 0,05	9,32	45,80	54,20
10000	3,9 ± 0,09	5,0 ± 0,00	8,93	44,03	55,97

Tabela C-24: Coeficientes de partição para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C para separar enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L.

MM do PEG	Proteína	PL	Exo-PG	Endo-PG
600	0,83 ± 0,014	1,09 ± 0,019	0,60 ± 0,052	1,06 ± 0,020
1000	0,43 ± 0,004	1,60 ± 0,009	0,18 ± 0,017	0,90 ± 0,025
1450	0,36 ± 0,004	0,12 ± 0,006	0,10 ± 0,004	0,38 ± 0,028
3350	0,35 ± 0,001	0,23 ± 0,015	0,43 ± 0,003	0,88 ± 0,049
8000	0,90 ± 0,009	0,69 ± 0,001	0,93 ± 0,048	0,96 ± 0,002
10000	0,73 ± 0,006	0,82 ± 0,002	1,85 ± 0,305	0,76 ± 0,054

Tabela C-25: Recuperações (%) na fase de fundo para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Proteínas	PL	Exo-PG	Endo-PG
600	52,2	45,4	60,0	46,0
1000	71,8	40,7	86,1	55,0
1450	75,9	90,4	92,1	74,6
3350	76,7	83,2	72,8	56,6
8000	56,9	63,3	56,1	55,3
10000	63,5	60,7	40,7	62,5

Tabela C-26: Fatores de Purificação na fase de fundo para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	PL	Exo-PG	Endo-PG
600	0,87	1,15	0,88
1000	0,57	1,20	0,77
1450	1,19	1,21	0,97
3350	1,08	0,95	0,74
8000	1,11	0,98	0,97
10000	0,96	0,66	0,98

Tabela C-27: Resultados da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-600/citrato de sódio (20/15%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	54,40	11,11	12,15
PL (U)	50,57	34,98	29,07
Exo-PG (U)	67,82	42,00	63,60
Endo-PG (U)	11132,07	5318,25	4540,08

Tabela C-28: Resultados da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-1000/citrato de sódio (20/15%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	24,16	6,22	15,86
PL (U)	50,06	41,74	28,63
Exo-PG (U)	67,14	14,54	90,75
Endo-PG (U)	11,019,91	3859,47	4718,32

Tabela C-29: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-1450/citrato de sódio (20/15%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	22,71	5,19	16,32
PL (U)	47,06	3,20	30,08
Exo-PG (U)	63,11	6,61	77,34
Endo-PG (U)	10358,87	1797,40	4984,24

Tabela C-30: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-3350/citrato de sódio (20/15%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	21,31	4,57	15,05
PL (U)	44,15	5,90	29,19
Exo-PG (U)	59,21	20,52	55,04
Endo-PG (U)	9718,27	3801,16	4965,67

Tabela C-31: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-8000/citrato de sódio (20/15%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	21,61	8,67	11,47
PL (U)	44,79	18,51	31,87
Exo-PG (U)	60,07	48,56	61,97
Endo-PG (U)	9858,86	4618,15	5703,13

Tabela C-32: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L em sistema PEG-10000/citrato de sódio (20/15%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	19,87	7,08	12,33
PL (U)	41,18	20,20	31,28
Exo-PG (U)	55,22	63,95	45,63
Endo-PG (U)	9064,27	3401,63	5675,97

Tabela C-33: Volume das fases para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C para separar enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L.

MM do PEG	V _{topo} (mL)	V _{fundo} (mL)	V _{sistema} (mL)	% topo	% fundo
600	5,2 ± 0,05	4,6 ± 0,15	9,72	53,17	46,83
1000	4,8 ± 0,05	4,8 ± 0,05	9,52	50,09	49,91
1450	4,8 ± 0,05	4,7 ± 0,00	9,47	50,35	49,65
3350	4,7 ± 0,12	4,9 ± 0,00	9,57	48,78	51,22
8000	4,3 ± 0,09	5,2 ± 0,05	9,42	45,31	54,69
10000	3,8 ± 0,00	5,0 ± 0,05	8,85	42,94	57,06

Tabela C-34: Coeficientes de partição para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C para separar enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L.

MM do PEG	Proteína	PL	Exo-PG	Endo-PG
600	1,01 ± 0,015	1,64 ± 0,010	0,47 ± 0,021	1,05 ± 0,012
1000	0,59 ± 0,006	2,43 ± 0,126	0,31 ± 0,013	0,78 ± 0,006
1450	0,44 ± 0,001	1,69 ± 0,064	0,15 ± 0,027	0,72 ± 0,024
3350	0,42 ± 0,003	2,00 ± 0,006	0,56 ± 0,002	1,02 ± 0,059
8000	0,70 ± 0,013	0,81 ± 0,050	0,96 ± 0,062	1,04 ± 0,086
10000	0,44 ± 0,038	1,20 ± 0,004	0,53 ± 0,014	0,96 ± 0,053

Tabela C-35: Recuperações (%) na fase de fundo para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Proteínas	PL	Exo-PG	Endo-PG
600	46,5	35,0	65,4	45,7
1000	62,9	29,1	76,2	56,1
1450	69,2	36,9	86,6	57,7
3350	71,5	34,4	65,1	50,7
8000	63,3	59,7	55,6	53,6
10000	75,2	52,6	71,5	58,1

Tabela C-36: Fatores de Purificação na fase de fundo para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	PL	Exo-PG	Endo-PG
600	0,75	1,41	0,98
1000	0,46	1,21	0,93
1450	0,53	1,25	0,83
3350	0,48	0,93	0,69
8000	0,95	0,88	0,84
10000	0,70	0,96	0,78

Tabela C-37: Resultados da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-600/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	18,13	11,34	9,89
PL (U)	56,93	36,08	19,44
Exo-PG (U)	75,72	38,21	72,54
Endo-PG (U)	10711,89	5721,36	4808,43

Tabela C-38: Resultados da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-1000/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	17,39	7,71	13,03
PL (U)	54,61	33,62	13,80
Exo-PG (U)	72,63	26,25	84,20
Endo-PG (U)	10275,45	3608,59	5064,25

Tabela C-39: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-1450/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	17,21	6,30	14,09
PL (U)	54,04	32,75	19,09
Exo-PG (U)	71,87	9,75	63,10
Endo-PG (U)	10167,76	3401,13	4527,74

Tabela C-40: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-3350/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 07 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	17,57	5,49	13,74
PL (U)	55,19	32,09	16,86
Exo-PG (U)	73,40	26,68	51,14
Endo-PG (U)	10383,71	5003,04	4823,26

Tabela C-41: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-8000/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	17,03	7,27	12,49
PL (U)	53,47	24,43	36,41
Exo-PG (U)	71,12	45,87	57,26
Endo-PG (U)	10060,64	4822,81	5439,44

Tabela C-42: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-10000/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	15,04	4,51	13,48
PL (U)	47,23	24,20	26,86
Exo-PG (U)	62,81	28,30	71,24
Endo-PG (U)	8886,24	3964,25	5509,57

Tabela C-43: Volume das fases para o sistema PEG/maltodextrina (20/15%) a pH 7,0 e 4°C para separar enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L.

MM do PEG	V _{topo} (mL)	V _{fundo} (mL)	V _{sistema} (mL)	% topo	% fundo
600	8,9 ± 0,08	0,8 ± 0,05	9,67	92,07	7,93
1000	8,5 ± 0,12	1,1 ± 0,12	9,60	88,89	11,11
1450	8,5 ± 0,08	1,1 ± 0,08	9,60	88,54	11,46
3350	8,1 ± 0,05	1,2 ± 0,16	9,33	87,14	12,86
8000	7,8 ± 0,26	1,6 ± 0,00	9,43	83,04	16,96
10000	7,6 ± 0,12	1,9 ± 0,09	9,50	79,65	20,35

Tabela C-44: Coeficientes de partição para o sistema PEG/maltodextrina (20/15%) a pH 7,0 e 4°C para separar enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L.

MM do PEG	Proteína	PL	Exo-PG	Endo-PG
600	2,06 ± 0,217	1,04 ± 0,035	0,27 ± 0,003	1,02 ± 0,020
1000	1,47 ± 0,017	0,73 ± 0,052	0,25 ± 0,006	1,13 ± 0,033
1450	0,45 ± 0,001	0,69 ± 0,014	0,45 ± 0,096	1,06 ± 0,022
3350	0,08 ± 0,001	0,79 ± 0,009	0,03 ± 0,002	1,37 ± 0,116
8000	0,03 ± 0,020	1,00 ± 0,048	0,02 ± 0,002	0,58 ± 0,086
10000	0,04 ± 0,001	1,89 ± 0,189	0,02 ± 0,003	0,89 ± 0,068

Tabela C-45: Recuperações (%) na fase de fundo para o sistema PEG/maltodextrina (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Proteínas	PL	Exo-PG	Endo-PG
600	4,0	7,7	24,4	7,8
1000	7,9	14,6	33,4	10,0
1450	22,2	15,8	22,3	10,9
3350	65,0	16,6	81,7	9,7
8000	85,8	16,9	89,4	25,9
10000	87,6	11,9	93,7	22,2

Tabela C-46: Fatores de Purificação na fase de fundo para o sistema PEG/maltodextrina (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	PL	Exo-PG	Endo-PG
600	1,90	6,01	1,90
1000	1,85	4,24	1,27
1450	0,71	1,01	0,52
3350	0,26	1,26	0,15
8000	0,20	1,04	0,26
10000	0,14	1,07	0,27

Tabela C-47: Resultados da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-600/maltodextrina (20/15%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	20,28	16,22	0,69
PL (U)	89,24	54,87	4,59
Exo-PG (U)	37,10	177,37	57,26
Endo-PG (U)	9341,83	9817,91	819,59

Tabela C-48: Resultados da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-1000/maltodextrina (20/15%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	20,00	15,51	1,32
PL (U)	88,01	51,58	4,59
Exo-PG (U)	36,59	208,10	104,16
Endo-PG (U)	9213,42	9605,52	1065,75

Tabela C-49: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-1450/maltodextrina (20/15%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	20,00	14,18	4,03
PL (U)	88,01	48,43	9,05
Exo-PG (U)	36,59	296,89	85,38
Endo-PG (U)	9213,42	8982,78	1170,44

Tabela C-50: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-3350/maltodextrina (20/15%) a pH 07 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	18,90	4,85	8,99
PL (U)	83,19	64,79	12,93
Exo-PG (U)	34,58	22,61	101,07
Endo-PG (U)	8708,67	8535,77	899,30

Tabela C-51: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-8000/maltodextrina (20/15%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	19,31	2,45	14,62
PL (U)	84,98	38,11	7,80
Exo-PG (U)	35,33	15,61	132,67
Endo-PG (U)	8896,29	3497,88	1025,96

Tabela C-52: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-10000/maltodextrina (20/15%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	19,58	2,05	14,43
PL (U)	86,19	47,83	6,58
Exo-PG (U)	35,83	11,91	178,05
Endo-PG (U)	9022,47	4856,67	1475,93

Tabela C-53: Volume das fases para o sistema PEG/maltodextrina (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C para separar enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L.

MM do PEG	V _{topo} (mL)	V _{fundo} (mL)	V _{sistema} (mL)	% topo	% fundo
600	8,8 ± 0,12	0,5 ± 0,09	9,30	94,98	5,02
1000	8,5 ± 0,05	1,0 ± 0,00	9,45	89,42	10,58
1450	8,0 ± 0,12	1,5 ± 0,09	9,50	83,86	16,14
3350	6,6 ± 0,43	2,6 ± 0,58	9,17	72,00	28,00
8000	7,3 ± 0,12	2,0 ± 0,29	9,33	78,57	21,43
10000	6,4 ± 0,08	2,9 ± 0,19	9,27	69,06	30,94

Tabela C-54: Coeficientes de partição para o sistema PEG/maltodextrina (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C para separar enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L.

MM do PEG	Proteína	PL	Exo-PG	Endo-PG
600	3,75 ± 0,022	3,07 ± 0,679	0,70 ± 0,187	0,94 ± 0,045
1000	4,76 ± 0,053	1,84 ± 0,413	0,56 ± 0,009	1,11 ± 0,007
1450	1,72 ± 0,003	1,92 ± 0,021	0,67 ± 0,131	0,97 ± 0,008
3350	0,36 ± 0,007	2,42 ± 0,019	0,51 ± 0,041	0,98 ± 0,027
8000	0,09 ± 0,002	2,42 ± 0,058	0,39 ± 0,037	0,51 ± 0,022
10000	0,11 ± 0,034	7,68 ± 1,725	0,16 ± 0,001	1,02 ± 0,012

Tabela C-55: Recuperações (%) na fase de fundo para o sistema PEG/maltodextrina (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Proteínas	PL	Exo-PG	Endo-PG
600	1,4	1,7	7,0	5,3
1000	2,4	6,0	17,5	9,7
1450	10,1	9,1	22,4	16,5
3350	51,7	13,8	43,3	28,3
8000	75,0	10,1	41,0	35,0
10000	80,5	5,5	73,5	30,5

Tabela C-56: Fatores de Purificação na fase de fundo para o sistema PEG/maltodextrina (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	PL	Exo-PG	Endo-PG
600	1,35	5,75	3,71
1000	2,70	7,23	3,98
1450	0,91	2,33	1,65
3350	0,27	0,84	0,55
8000	0,13	0,55	0,48
10000	0,07	0,91	0,38

Tabela C-57: Resultados da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-600/maltodextrina (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	9,25	13,23	0,19
PL (U)	34,34	56,20	1,08
Exo-PG (U)	75,33	61,61	5,36
Endo-PG (U)	8646,58	9562,71	521,10

Tabela C-58: Resultados da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-1000/maltodextrina (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	9,56	14,01	0,35
PL (U)	35,45	62,39	4,38
Exo-PG (U)	77,78	160,42	34,14
Endo-PG (U)	8927,75	9489,56	1013,82

Tabela C-59: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-1450/maltodextrina (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	9,66	11,48	1,29
PL (U)	35,83	60,80	6,12
Exo-PG (U)	78,61	177,99	54,52
Endo-PG (U)	9022,47	8086,49	1606,41

Tabela C-60: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-3350/maltodextrina (20/15%) com NaCl (6%) a pH 07 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	8,99	6,14	6,61
PL (U)	33,36	71,96	11,56
Exo-PG (U)	73,19	65,42	50,75
Endo-PG (U)	8400,43	6489,44	2567,50

Tabela C-61: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-8000/maltodextrina (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	9,32	3,20	9,80
PL (U)	34,58	86,88	9,77
Exo-PG (U)	75,87	154,99	154,99
Endo-PG (U)	8708,67	3257,23	1843,01

Tabela C-62: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas contidas na Citrosym Cloud 100L pelo sistema PEG-10000/maltodextrina (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	9,19	2,46	10,31
PL (U)	34,09	68,74	4,29
Exo-PG (U)	74,79	37,26	37,26
Endo-PG (U)	8584,71	6718,29	2950,01

Apêndice D

Tabelas Referentes ao Capítulo 5

Tabela D-1: Resultados do comportamento do pH, concentração de proteína e glicose na fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Aspergillus niger* NRRL-3122 em Fermentador Bioflo a 28°C e pH 5,0 em meio 03.

Tempo (min)	pH	Glicose (g/L)	Proteína (g/L)	Tempo (min)	pH	Glicose (g/L)	Proteína (g/L)
0	4,72	22,78	0,44 ± 0,03	16	4,22	11,49	4,53 ± 0,09
1	4,76	22,03	0,46 ± 0,01	17	4,20	12,50	5,09 ± 0,20
2	4,78	21,99	0,45 ± 0,02	19	4,13	10,35	5,22 ± 0,04
3	4,79	21,99	0,39 ± 0,03	21	3,99		3,93 ± 0,11
4	4,76	20,60	1,41 ± 0,08	22	3,90		4,82 ± 0,05
6	4,73		2,46 ± 0,12	24	3,62	4,81	5,04 ± 0,04
7	4,69	19,94	2,37 ± 0,11	48	2,97		0,34 ± 0,00
8	4,68		2,59 ± 0,54	72	2,58	3,00	1,87 ± 0,16
9	4,65	19,24	2,77 ± 0,00	96	2,33	0	1,37 ± 0,07
10	4,60		3,70 ± 0,04	120	2,83	0	0,38 ± 0,00
11	4,55	19,05	3,39 ± 0,14	144	2,99	0	0,43 ± 0,02
12	4,52	18,54	3,42 ± 0,03	168	3,45	0	0,46 ± 0,01
13	4,45		3,90 ± 0,04	192	4,14	0	0,54 ± 0,02
14	4,40		4,07 ± 0,08	216	5,06	0	0,17 ± 0,02
15	4,33		4,76 ± 0,07	240	5,39	0	0,27 ± 0,03

Tabela D-2: Resultados da fermentação de pectina comercial tipo 8002 por *Aspergillus niger* NRRL-31222 em fermentador Bioflo a 28°C e pH 4,5 em meio 03.

Tempo (h)	Massa seca (g/L)	PE (U/mL)	PL (U/mL)	Exo-PG (U/mL)	Endo-PG (U/mL)
0	0	0	0	0	0
24	14,19	0,009 ± 0,000	0,030 ± 0,002	0,11 ± 0,00	0
48	9,66	0,002 ± 0,000	0,220 ± 0,018	0	0
72	11,55	0,004 ± 0,000	0,006 ± 0,000	0,10 ± 0,01	0
96	12,09	0,008 ± 0,001	0,068 ± 0,006	0,17 ± 0,01	0
120	10,87	0,019 ± 0,000	0,005 ± 0,000	0,25 ± 0,02	0
144	7,35	0	0	0,34 ± 0,02	36,61 ± 1,31
168	8,62	0,010 ± 0,004	0,003 ± 0,000	0,10 ± 0,01	36,64 ± 2,02
192	8,29	0,018 ± 0,002	0,021 ± 0,003	0,15 ± 0,01	26,75 ± 2,31
216	11,41	0,010 ± 0,000	0	0,22 ± 0,03	39,89 ± 1,66
240	11,95	0,003 ± 0,000	0,007 ± 0,000	0,24 ± 0,00	39,40 ± 1,37

Tabela D-3: Resultado da precipitação de Pectinex-3XL por álcool etílico absoluto a -20°C .

Volume de etanol por 1 mL de enzima (mL)	Massa precipitada (g)
1	$0,1125 \pm 0,0088$
2	$0,1541 \pm 0,0018$
3	$0,1848 \pm 0,0010$
4	$0,1870 \pm 0,0100$
5	$0,1819 \pm 0,0010$
6	$0,1805 \pm 0,0010$
7	$0,1834 \pm 0,0018$
8	$0,1861 \pm 0,0019$
9	$0,1912 \pm 0,0036$

Tabela D-4: Volume das fases para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C para separar enzimas pectinolíticas produzidas por *Aspergillus niger* NRRL-3112.

MM do PEG	V_{topo} (mL)	V_{fundo} (mL)	V_{sistema} (mL)	% topo	% fundo
1000	$6,30 \pm 0,62$	$3,40 \pm 0,40$	9,70	64,95	35,05
1450	$5,97 \pm 0,05$	$3,43 \pm 0,09$	9,40	63,48	36,52
3350	$5,53 \pm 0,12$	$3,87 \pm 0,09$	9,40	58,87	41,13
8000	$5,47 \pm 0,12$	$3,97 \pm 0,25$	9,43	57,95	42,05
10000	$5,10 \pm 0,28$	$4,20 \pm 0,14$	9,30	54,84	45,16

Tabela D-5: Coeficientes de partição para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C para separar enzimas pectinolíticas produzidas por *Aspergillus niger* NRRL-3112.

MM do PEG	Proteína	PE	PL	Exo-PG	Endo-PG
1000	0,33 ± 0,008	2,08 ± 0,278	0,02 ± 0,001	0,91 ± 0,030	0,03 ± 0,001
1450	0,78 ± 0,064	4,00 ± 0,000	0,63 ± 0,031	0,70 ± 0,039	0,03 ± 0,001
3350	0,69 ± 0,027	1,44 ± 0,111	0,38 ± 0,020	0,79 ± 0,084	0,06 ± 0,006
8000	0,78 ± 0,026	3,17 ± 0,167	2,57 ± 0,159	1,77 ± 0,239	0,06 ± 0,011
10000	0,55 ± 0,000	9,50 ± 0,500	0,58 ± 0,077	1,15 ± 0,149	0,02 ± 0,001

Tabela D-6: Recuperações (%) na fase de fundo para o sistema PEG/fosfato de potássio (20-15%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Proteína	PE	PL	Exo-PG	Endo-PG
1000	25,3	20,6	96,2	37,2	94,1
1450	44,1	12,6	47,6	45,2	95,8
3350	46,6	32,7	65,0	47,0	92,1
8000	35,2	18,6	22,0	29,1	92,4
10000	37,3	8,0	58,9	41,7	97,4

Tabela D-7: Fatores de Purificação na fase de fundo para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	PE	PL	Exo-PG	Endo-PG
1000	0,34	1,55	0,60	1,52
1450	0,29	1,11	1,06	2,25
3350	0,65	1,29	0,93	1,83
8000	0,39	0,46	0,61	1,91
10000	0,13	0,99	0,70	1,63

Tabela D-8: Resultados da extração das enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* NRRL-3122 pelo sistema PEG-1000/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	12,03	1,87	3,04
PE (U)	0,272	0,252	0,068
PL (U)	0,29	0,13	3,18
Exo-PG (U)	16,20	14,06	8,35
Endo-PG (U)	1494,96	53,20	851,32

Tabela D-9: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* NRRL-3122 pelo sistema PEG-1450/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	11,66	6,91	5,14
PE (U)	0,263	0,191	0,028
PL (U)	0,28	0,91	0,82
Exo-PG (U)	15,70	10,44	8,68
Endo-PG (U)	1498,73	37,79	868,93

Tabela D-10: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* NRRL-3122 pelo sistema PEG-3350/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	11,66	5,35	5,43
PE (U)	0,263	0,798	0,397
PL (U)	0,28	1,00	1,86
Exo-PG (U)	15,70	7,54	6,91
Endo-PG (U)	1498,73	49,19	576,35

Tabela D-11: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* NRRL-3122 pelo sistema PEG-8000/fosfato de potássio (20-15%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	11,70	4,41	4,12
PE (U)	0,264	0,416	0,095
PL (U)	0,28	1,09	0,31
Exo-PG (U)	15,75	17,48	7,24
Endo-PG (U)	1453,87	42,18	521,95

Tabela D-12: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* NRRL-3122 pelo sistema PEG-10000/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	11,53	2,88	4,30
PE (U)	0,260	0,388	0,034
PL (U)	0,28	0,26	0,38
Exo-PG (U)	15,53	8,74	6,26
Endo-PG (U)	1433,32	32,28	1216,01

Tabela D-13: Volume das fases para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C com NaCl (6%) para separar enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* NRRL-3122.

MM do PEG	V _{topo} (mL)	V _{fundo} (mL)	V _{sistema} (mL)	% topo	% fundo
3350	5,67 ± 0,09	3,87 ± 0,17	9,53	59,44	40,56
8000	5,03 ± 0,05	4,27 ± 0,05	9,30	54,12	45,88
10000	4,70 ± 0,08	4,40 ± 0,14	9,10	51,65	48,35

Tabela D-14: Coeficientes de partição para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C com NaCl (6%) para separar enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* NRRL-3122.

MM do PEG	Proteína	PE	PL	Exo-PG	Endo-PG
3350	0,85 ± 0,037	1,08 ± 0,021	13,79 ± 0,471	0,51 ± 0,030	1,29 ± 0,062
8000	0,67 ± 0,000	10,46 ± 1,611	0,52 ± 0,030	0,60 ± 0,094	0,12 ± 0,030
10000	0,79 ± 0,005	1,19 ± 0,133	0,96 ± 0,119	1,25 ± 0,023	0,41 ± 0,020

Tabela D-15: Recuperações (%) na fase de fundo para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Proteína	PE	PL	Exo-PG	Endo-PG
3350	44,56	38,79	4,72	57,14	34,66
8000	55,71	7,50	62,17	58,73	87,34
10000	54,30	43,97	49,42	42,84	69,39

Tabela D-16: Fatores de Purificação na fase de fundo para o sistema PEG/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	PE	PL	Exo-PG	Endo-PG
3350	0,87	0,11	1,28	0,78
8000	0,14	1,12	1,06	1,57
10000	0,82	0,92	0,79	1,28

Tabela D-17: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* NRRL-3122 pelo sistema PEG-3350/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	11,82	5,63	4,54
PE (U)	0,267	0,658	0,418
PL (U)	0,29	0,91	0,09
Exo-PG (U)	15,92	5,72	7,63
Endo-PG (U)	1448,73	496,35	263,34

Tabela D-18: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* NRRL-3122 pelo sistema PEG-8000/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	11,53	5,36	6,74
PE (U)	0,260	1,452	0,120
PL (U)	0,28	1,00	1,65
Exo-PG (U)	15,53	8,06	11,58
Endo-PG (U)	1453,87	77,84	537,21

Tabela D-19: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* NRRL-3122 pelo sistema PEG-10000/fosfato de potássio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	11,28	3,58	4,25
PE (U)	0,255	0,377	0,300
PL (U)	0,27	1,14	1,14
Exo-PG (U)	15,20	9,62	7,21
Endo-PG (U)	1433,32	330,11	748,28

Tabela D-20: Volume das fases para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C para separar enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* NRRL-3122.

MM do PEG	V _{topo} (mL)	V _{fundo} (mL)	V _{sistema} (mL)	% topo	% fundo
1450	6,87 ± 0,29	2,43 ± 0,05	9,30	73,84	26,16
3350	6,03 ± 0,12	3,47 ± 0,05	9,50	63,51	36,49
8000	5,57 ± 0,21	3,80 ± 0,00	9,37	59,43	40,57
10000	5,87 ± 0,09	2,87 ± 0,09	8,73	67,18	32,82

Tabela D-21: Coeficientes de partição para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C para separar enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* NRRL-3122.

MM do PEG	Proteína	PE	PL	Exo-PG	Endo-PG
1450	0,32 ± 0,008	0,01 ± 0,001	1,78 ± 0,248	0,66 ± 0,073	0,12 ± 0,008
3350	0,05 ± 0,006	0,62 ± 0,125	1,35 ± 0,003	0,96 ± 0,059	0,11 ± 0,009
8000	0,15 ± 0,005	0,05 ± 0,018	0,21 ± 0,006	1,16 ± 0,005	0,15 ± 0,008
10000	0,44 ± 0,031	0,65 ± 0,120	2,85 ± 0,266	0,84 ± 0,014	0,29 ± 0,002

Tabela D-22: Recuperações (%) na fase de fundo para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	Proteínas	PE	PL	Exo-PG	Endo-PG
1450	52,3	98,6	16,6	35,0	75,32
3350	91,7	47,9	29,9	37,3	83,51
8000	81,8	92,7	76,9	37,0	81,56
10000	52,3	42,9	14,6	36,7	62,74

Tabela D-23: Fatores de Purificação na fase de fundo para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	PE	PL	Exo-PG	Endo-PG
1450	1,89	0,33	0,67	1,42
3350	0,52	0,33	0,41	0,87
8000	1,13	0,94	0,45	0,79
10000	0,81	0,28	0,70	1,91

Tabela D-24: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* NRRL-3122 pelo sistema PEG-1450/citrato de sódio (20/15%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	3,91	3,00	3,29
PE (U)	0,047	0,032	2,428
PL (U)	0,93	1,81	0,95
Exo-PG (U)	37,76	10,35	5,60
Endo-PG (U)	2791,40	236,42	721,66

Tabela D-25: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* NRRL-3122 pelo sistema PEG-3350/citrato de sódio (20/15%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	3,99	0,27	2,99
PE (U)	0,047	0,070	0,064
PL (U)	0,95	0,59	0,25
Exo-PG (U)	38,57	12,24	7,29
Endo-PG (U)	2851,43	247,04	1251,15

Tabela D-26: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* NRRL-3122 pelo sistema PEG-8000/citrato de sódio (20/15%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	3,93	0,74	3,30
PE (U)	0,047	0,039	0,493
PL (U)	0,94	0,38	1,25
Exo-PG (U)	38,03	10,05	5,92
Endo-PG (U)	2811,45	317,15	1402,47

Tabela D-27: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* NRRL-3122 pelo sistema PEG-10000/citrato de sódio (20/15%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	3,67	1,41	1,55
PE (U)	0,044	0,081	0,060
PL (U)	0,87	0,35	0,06
Exo-PG (U)	35,46	8,70	5,03
Endo-PG (U)	2621,31	782,29	1317,04

Tabela D-28: Volume das fases para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C para separar enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* NRRL-3122.

MM do PEG	V _{topo} (mL)	V _{fundo} (mL)	V _{sistema} (mL)	% topo	% fundo
1000	6,00 ± 0,22	3,03 ± 0,12	9,03	66,42	33,58
1450	5,67 ± 0,09	3,93 ± 0,25	9,60	59,03	40,97
3350	5,23 ± 0,17	4,47 ± 0,09	9,70	53,95	46,05
8000	4,67 ± 0,09	4,67 ± 0,09	9,33	50,00	50,00
10000	5,90 ± 0,28	3,10 ± 0,22	9,00	65,56	34,44

Tabela D-29: Coeficientes de partição para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C para separar enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* NRRL-3122.

MM do PEG	Proteínas	PE	PL	Exo-PG	Endo-PG
1000	0,09 ± 0,003	0,01 ± 0,000	1,15 ± 0,089	1,04 ± 0,219	0,21 ± 0,017
1450	0,06 ± 0,002	0,02 ± 0,000	0,18 ± 0,048	1,36 ± 0,000	0,24 ± 0,003
3350	0,05 ± 0,009	0,05 ± 0,000	1,93 ± 0,023	0,98 ± 0,015	0,19 ± 0,018
8000	0,08 ± 0,009	0,03 ± 0,000	0,57 ± 0,047	0,97 ± 0,032	0,27 ± 0,028
10000	0,07 ± 0,003	0,04 ± 0,000	0,17 ± 0,025	2,27 ± 0,270	0,55 ± 0,002

Tabela D-30: Recuperações (%) na fase de fundo para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C.

MM PEG	Proteínas	PE	PL	Exo-PG	MM PEG
1000	84,5	98,3	30,6	32,8	71,1
1450	91,5	96,8	79,0	33,7	25,4
3350	94,9	94,3	30,7	46,4	18,1
8000	92,2	97,3	63,7	50,8	21,2
10000	88,4	93,4	75,5	18,8	51,25

Tabela D-31: Fatores de Purificação na fase de fundo para o sistema PEG/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7,0 e 4°C.

MM do PEG	PE	PL	Exo-PG	Endo-PG
1000	1,16	0,36	0,39	0,84
1450	1,06	0,86	0,37	0,81
3350	0,99	0,32	0,49	0,86
8000	1,05	0,69	0,55	0,85
10000	1,06	0,87	0,21	0,55

Tabela C-32: Resultados da extração das enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* NRRL-3122 pelo sistema PEG-1000/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	3,79	0,46	2,53
PE (U)	0,045	0,028	1,615
PL (U)	0,90	0,67	0,30
Exo-PG (U)	36,68	13,22	6,61
Endo-PG (U)	2711,36	328,40	808,25

Tabela C-33: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* NRRL-3122 pelo sistema PEG-1450/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	4,03	0,35	3,74
PE (U)	0,048	0,026	0,783
PL (U)	0,96	0,37	1,41
Exo-PG (U)	38,98	11,64	5,93
Endo-PG (U)	2881,44	308,88	905,12

Tabela C-34: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* NRRL-3122 pelo sistema PEG-3350/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 07 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	4,07	0,20	3,67
PE (U)	0,049	0,097	1,592
PL (U)	0,97	0,59	0,26
Exo-PG (U)	39,38	8,54	7,40
Endo-PG (U)	2911,46	336,35	1517,49

Tabela C-35: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* NRRL-3122 pelo sistema PEG-8000/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	3,92	0,32	3,83
PE (U)	0,047	0,043	1,534
PL (U)	0,93	0,61	1,07
Exo-PG (U)	37,89	6,68	6,92
Endo-PG (U)	2801,40	267,31	996,79

Tabela C-36: Resultado da extração das enzimas pectinolíticas de *Aspergillus niger* NRRL-3122 pelo sistema PEG-10000/citrato de sódio (20/15%) com NaCl (6%) a pH 7 e 4°C.

Análise	Entrada	Topo	Fundo
Proteínas (mg)	3,78	0,29	2,22
PE (U)	0,045	0,027	0,388
PL (U)	0,90	0,17	0,55
Exo-PG (U)	2701,35	671,75	638,15
Endo-PG (U)	36,54	32,51	7,52