

ANEXO :**ESTUDO DOS MÉTODOS MECÂNICOS DE ROMPIMENTO CELULAR****1. INTRODUÇÃO**

O aumento no uso de processos fermentativos para obtenção de bioprodutos específicos, como enzimas e produtos farmacêuticos, faz com que se tenha também um aumento da demanda no uso de processos visando a separação destes bioprodutos. Tem-se, portanto, uma necessidade constante de se estudarem métodos cada vez mais eficientes no tratamento destes produtos obtidos por fermentação, seja com técnicas de rompimento celular (visando a recuperação de produtos intracelulares), ou para a separação entre as células e o meio líquido onde estão contidas (Bowden *et al.*, 1984).

A recuperação de produtos intracelulares de microrganismos tem ganho um novo momento desde a última década devido a introdução de novas técnicas de aplicação comercial nas indústrias farmacêutica e alimentícia e também pela perspectiva de crescimento desta área com a entrada de produtos desenvolvidos com o auxílio da engenharia genética.

O Rompimento Celular constitui a primeira etapa na separação dos produtos intracelulares e é, portanto, crucial no processo de “*downstream*” ,pois qualquer dano causado ao produto, que ocorra nesta fase inicial, compromete e invalida todos os processos subseqüentes. Além disso, vale ressaltar que um rompimento de alto rendimento resulta em uma maior flexibilidade nos tratamentos subseqüentes dados ao produto (KESHAWARZ *et al.*, 1984).

A maior parcela das proteínas e enzimas estudadas recentemente foram isoladas a partir de fluidos extracelulares, mas, a grande parcela das enzimas são encontradas dentro das células, e muitas dessas, são muito pouco estáveis devido a ausência das pontes de dissulfeto (presentes nas proteínas extracelulares).

Existem muitos métodos de rompimento celular, até porque existem muitos tipos de células. A maior parte das células possuem características

particulares e que precisam de atenção especial durante o rompimento. Como exemplo, temos os tecidos animais, dos quais os eritrócitos são rompidos muito mais facilmente do que fibras resistentes, como o colágeno (encontrados nos vasos sanguíneos e músculos). As células de origem vegetal são, geralmente, mais difíceis de serem rompidas do que células de tecidos animais porque suas paredes celulares são formadas por materiais celulósicos. Bactérias são organismos de estruturas tão frágeis que podem ser rompidos através dos usos de enzimas digestivas ou choque osmótico, enquanto que para espécies mais resistentes e com paredes celulares mais grossas, se faz necessário um tratamento mecânico mais vigoroso para que se promova o rompimento.

Mesmo existindo vários exemplos específicos de rompimento químico (SCAWEN & HAMMOND, 1986) e enzimático (ASENJO & DUNNILL, 1981), são os métodos mecânicos que têm encontrado aplicação nas escalas piloto e industrial (SCAWEN *et al.*, 1980).

Fatores como o tipo de microrganismo, crescimento e condições de estocagem das células são importantes também na escolha do método de rompimento mais adequado. Apesar disso, a eficiência de um método de rompimento é, geralmente, avaliado por seu grau de rompimento das células e em que tempo se consegue este rompimento. Evidentemente, os métodos físicos são bem mais eficientes para o rompimento celular em uma pequena escala. Os equipamentos mais utilizados para rompimento são o homogenizador e o moinho de pérolas de vidro.

1.1. Rompimento Celular de Leveduras

No caso de rompimento de leveduras existem seis métodos (entre mecânicos e não-mecânicos) possíveis de serem utilizados:

- *Rompimento Mecânico*: O rompimento completo pode ser conseguido através da utilização de um homogenizador ou de um Moinho de Células. O usual é sua utilização em uma suspensão que ocupe de 2 a 5L de tampão por grama de massa seca.

- *Autólise por Tolueno*: Tem-se utilizado diversos métodos baseados em Tolueno, mas, sem dúvida, nenhum deles preenche completamente a qualidade exigida para um rompimento eficiente. O princípio é o de tratar a levedura com Tolueno, geralmente em temperatura de 35 – 40° C, quando após 20 – 30min. a levedura se “liquefaz” devido à extração dos componentes de sua parede celular. Em seguida, adiciona-se tampão, mantendo-se em repouso por algumas horas. O grande problema na utilização deste método está no fato de que além da estrutura da parede celular, algumas enzimas intracelulares também podem ser degradadas durante o tratamento.
- *Citólise por Amônia*: Este método é mais indicado para levedura seca e seu grande problema de utilização reside no fato de que enzimas que não sejam estáveis a pH 10 são totalmente perdidas. Neste método, a levedura seca é colocada em contato com NaOH 0,5M na concentração 2 L/g massa seca, em temperatura ambiente por 16 a 20h.
- *Moinho de Pérolas*: Consiste de um equipamento que agita uma suspensão celular mantida em contato com pérolas de vidro. A concentração celular é mantida a uma concentração de 1g massa seca por cada 3mL de tampão. As pérolas de vidro utilizadas possuem entre 0,5 e 1,0mm de diâmetro. A suspensão e as pérolas de vidro são acondicionadas em um compartimento apropriado onde serão vigorosamente agitadas enquanto água de resfriamento percorre uma manta ao redor da câmara de rompimento. Este procedimento pode ser efetuado de maneira contínua ou descontínua.
- *Rompimento Manual com Pérolas de Vidro*: Este método é considerado muito eficiente e ideal para escala laboratorial por não necessitar de grande aparato para seu processamento. Utiliza-se, basicamente, pérola de vidro de 0,5mm de diâmetro e o procedimento consta da adição de pérolas de vidro em um tubo

adequado contendo um volume pequeno de suspensão celular. O tubo é agitado vigorosamente, com auxílio de agitador de tubos, por um tempo que pode variar entre 5 e 10min. Após o rompimento, as pérolas são filtradas à vácuo e lavadas, enquanto o homogenato é centrifugado.

- *Lise Enzimática*: Um grande número de enzimas que atuam na parede celular das leveduras vem sendo descrito no decorrer dos anos; de fato, uma mistura de glucanases, quitinases, entre outras pode ser utilizada para esse fim. Algumas dessas enzimas são produzidas por organismos que se alimentam de leveduras e este método é mais utilizado em escala laboratorial, por ser inviável economicamente o seu uso em escalas maiores.

1.2. Rompimento utilizando Moinho de Pérolas

Originalmente, os moinhos de pérolas foram utilizados na indústria para um trituração fino e dispersão de corantes e pigmentos. ZETELAKI (1969) descreveu brevemente o uso de pérolas de vidro para rompimento de *Aspergillus niger* e CURRIE *et al.* (1972) examinou a possibilidade de se utilizar as pérolas de vidro para o rompimento de leveduras. Até então, nenhum equipamento havia sido construído com o intuito de romper células, vindo isto a acontecer somente a partir das pesquisas realizadas por DUNNILL & LILLY (1975), ENGLER (1985) e CHISTI & MOO-YOUNG (1986). O moinho consiste de uma câmara disposta verticalmente ou horizontalmente, contendo agitadores concêntricos ou não, e de um motor que aciona e mantém a agitação do sistema. O sistema é equipado com sistemas de refrigeração para que se consigam processar rompimentos visando a obtenção de bioprodutos que percam sua estabilidade diante do aumento da temperatura (enzimas, por exemplo). A eficiência do rompimento por este método varia com a concentração celular, existindo uma queda no rendimento do rompimento no caso de se utilizarem concentrações celulares acima de 60% peso/volume. Segundo SCHUTTE *et al.* (1983), para leveduras, a localização da enzima desejada na célula é que influencia no

tamanho ótimo da pérola a ser utilizada. No caso de enzimas localizadas no espaço periplasmático (Invertase, por exemplo), as pérolas de diâmetro maior seriam as mais indicadas, enquanto que as pérolas de diâmetro menor são mais indicadas para recuperar enzimas existentes no citoplasma.

1.3. Rompimento por Ultrassom

Ondas sonoras têm sido aplicadas em diversos processos de separação, seja como uma etapa de pré-tratamento ou como o processo integral. As ondas ultrassônicas são aquelas cuja frequência está por volta de 16Hz e forma a maior parte das aplicações experimentais deste tipo de técnica. A maior parte da energia das ondas ultrassônicas é dissipada no sistema líquido através de bolhas de cavitação. Este fenômeno vem sendo largamente pesquisado e formula toda a teoria das interações ultrassônicas. As bolhas de cavitação oscilando de forma estável formam uma espécie de campo, onde ocorre aumento de massa e conseqüente transferência de calor para o meio líquido, produzindo um gradiente de velocidade e a criação de uma força capaz de romper as células. O grande problema, que trava a utilização deste método de rompimento, é o alto custo do processo gerado pelo elevado consumo de energia.

1.4. Rompimento em Homogenizador

A Homogenização em alta pressão é processo mais utilizado para o caso de rompimentos em larga escala (SCAWEN *et al.*, 1980). O procedimento consiste no bombeamento constante, sobre pressão positiva, do líquido contendo as células por um sistema de orifícios de tamanho reduzido. O que difere os equipamentos desse tipo é: sua capacidade, o tipo de orifícios, a taxa de pressão, o mecanismo de bombeamento e o número de pistões. Diversos parâmetros vem sendo estudados para tentar identificar o que interfere na performance dos equipamentos. HETHERINGTON *et al.* (1971) estudou diversos destes fatores, como pressão, número de passes e concentração celular e concluiu que o maior efeito sobre a eficiência do rompimento, no caso deste método, está ligada à concentração celular.

ENGLER AND ROBINSON (1981) concluíram que as células crescendo em uma velocidade específica elevada são mais fáceis de romper e que, portanto, células coletadas durante a fase exponencial de crescimento são mais suscetíveis à homogeneização que outras em estado estacionário. As células de bactérias Gram negativas são mais fáceis de serem rompidas que as Gram positivas e, estas, por sua vez são mais fáceis de serem rompidas que as leveduras. O estudo concluiu também que os microrganismos mais difíceis para serem rompidos são os fungos, devido sua estrutura filamentosa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas amostras de suspensão celular na concentração de 0.5g/L coletadas com auxílio de pipeta volumétrica e, em seguida, submetidas à centrifugação em 4100rpm por 20min. Após centrifugação, o sobrenadante era descartado e as células ressuspensas utilizando solução tampão com inibidores de proteases. Esta solução, denominada solução de rompimento, foi constituída por Tampão Tris-HCl 50mM pH 7.5, MgCl₂ 5mM, β-Mercaptoetanol 10mM, Ácido Aminocapróico 2mM, PMSF 1mM e EDTA 0.2mM. Os rompimentos foram acompanhados através da contagem celular em câmara de Neubauer (1/400 mm² x 0.100mm) antes e após o rompimento da amostra. A eficiência do rompimento foi avaliada pela relação $(N_R / N_T) \times 100$, que representa a porcentagem de células rompidas em cada amostra, onde N_R representa o número de células contadas na câmara de Neubauer após o rompimento e N_T representa o número de células contadas na câmara de Neubauer antes do rompimento.

A otimização do método de rompimento foi realizada com a análise da atividade de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase, Proteínas Totais e Contagem em Câmara de Neubauer e o ponto ótimo de rompimento foi definido como aquele onde se alcançou a maior taxa de rompimento aliada à maior atividade enzimática sem incorrer em aumento expressivo na concentração de proteínas totais.

2.1. Estudo do Rompimento em Ultrassom

Para a realização desse estudo foi mantido sob agitação constante uma suspensão de células de *Saccharomyces cerevisiae* na concentração de 0.5g/L. Para tanto, era pesado uma massa de 0.417g de fermento prensado úmido em balança analítica e esta massa era suspensa em 250mL de água destilada. Com auxílio de pipeta volumétrica, eram coletados 5mL de amostra, que era centrifugada e ressuspensa em Tampão Tris – HCl contendo inibidores de proteases. Então, as condições de rompimento eram ajustadas no aparelho de ultrassom Vibracell® VC100 (Sonic and Materials

Inc.). O aparelho possui uma sonda de 45mm de comprimento e 3mm de diâmetro. O tubo era colocado em contato com a sonda (observando-se sempre a distância em que a sonda estava do fundo do tubo). Iniciava-se o rompimento, mantendo sempre a amostra em banho de gelo, de forma a simular a temperatura em que se deve manter a amostra. O banho de gelo é necessário devido ao problema de desnaturação da enzima por aumento de temperatura. Foram estudados três variáveis para o rompimento em ultrassom.

2.1.1. Estudo da Amplitude (Frequência):

A amplitude no aparelho de ultrassom foi variada em 10, 30 e 90. Para a execução dos ensaios o pulso foi fixado em 1 segundo (pulsos periódicos de 1 segundo) e o tempo de rompimento foi fixado em 5 minutos. As amostras foram rompidas em duplicata para cada frequência estudada e submersas em banho de gelo de forma a manter a amostra em temperatura inferior a 10° C durante o período de rompimento. Foi efetuada a contagem celular das amostras antes e após o rompimento e calculado a porcentagem de rompimento obtida.

2.1.2. Estudo do Pulso Periódico:

O Pulso utilizado foi variado em 1, 4 e 6 segundos. Para a execução dos ensaios a amplitude foi fixada em 10 e o tempo de rompimento em 5 minutos. As amostras foram rompidas em duplicata para cada pulso estudado e submersas em banho de gelo de forma a manter a amostra em temperatura inferior a 10° C durante o período de rompimento. Foi efetuada a contagem celular das amostras antes e após o rompimento e calculado a porcentagem de rompimento obtida. O Pulso corresponde ao tempo em que a amostra é exposta à onda ultrassônica.

2.1.3. Estudo do Tempo de Rompimento:

O tempo de rompimento foi variado em 1, 3, 5 e 10 minutos. Para a execução dos ensaios, a amplitude foi mantida em 10 e o pulso periódico

fixado em 4. As amostras foram rompidas em duplicata para cada pulso estudado e submersas em banho de gelo de forma a manter a amostra em temperatura inferior a 10° C durante o período de rompimento. Foi efetuada a contagem celular das amostras antes e após o rompimento e calculado a porcentagem de rompimento obtida.

2.2. Estudo do Rompimento por Cisalhamento

Para a realização desse estudo foi mantido sob agitação constante uma suspensão de células de *Saccharomyces cerevisiae* na concentração de 0.5g/L. Para tanto, era pesado uma massa de 1.670g de fermento prensado úmido em balança analítica e esta massa era suspensa em 1000mL de água destilada. Com auxílio de proveta, eram coletados 100mL de amostra, que era centrifugada e ressuspensa em Tampão Tris – HCl contendo inibidores de proteases. Então, as condições de rompimento eram ajustadas no aparelho Homogenizador Shear Power DiAx 900® (Heidolph). O aparelho utilizado trabalha com rotações na faixa de 8000 a 26000 rpm, alcançados através do controle lateral que vai de 1 a 6. Iniciava-se o rompimento, mantendo sempre a amostra em banho de gelo, de forma a simular a temperatura em que se deve manter a amostra.

2.2.1. Estudo da velocidade de rotação:

Foram estudadas 3 condições diferentes para a velocidade de rotação no aparelho: 8000, 17000 e 26000 rpm. Os ensaios foram realizados em duplicata e o tempo de rompimento foi fixado em 6 minutos. As amostras foram submersas em banho de gelo de forma a manter a amostra em temperatura inferior a 10° C durante o período de rompimento. Foi efetuada a contagem celular das amostras antes e após o rompimento e calculado a porcentagem de rompimento obtida.

2.2.2. Estudo do Tempo de Rompimento:

Foram estudadas duas condições diferentes para o tempo de rompimento: 6 e 12 minutos. Os ensaios foram realizados em duplicata e a rotação no aparelho foi fixada em 26000 rpm. As amostras foram submersas em banho de gelo de forma a manter a amostra em temperatura inferior a 10° C durante o período de rompimento. Foi efetuada a contagem celular das amostras antes e após o rompimento e calculado a porcentagem de rompimento obtida.

2.3. Estudo do Rompimento por agitação em presença de abrasivos

Foi mantida sob agitação constante uma suspensão de células de *Saccharomyces cerevisiae* na concentração de 0.5g/L. Para tanto, era pesado uma massa de 0.417g de fermento prensado úmido em balança analítica e esta massa era suspensa em 250mL de água destilada. Com auxílio de pipeta volumétrica, eram coletados 5mL de amostra, em seguida transferidos para tubos de centrifuga de 15mL, onde a amostra era centrifugada e ressuspensa em Tampão Tris – HCl contendo inibidores de proteases. Pesava-se o equivalente a 8.0g de pérolas de vidro (0.5mm de diâmetro – MARFFY *et al.*,1974), que foram utilizadas como agente abrasivo no rompimento, e que então foram adicionadas à amostra ressuspensa em tampão Tris-HCl de forma a estarmos trabalhando com uma proporção mássica 1:300 (1g de célula para 300g de pérolas). Esta proporção mássica foi estabelecida partindo de resultados anteriores obtidos por SILVA (2000) e RICCI – SILVA *et al.* (1999). Os rompimentos foram efetuados sob agitação em vórtice, utilizando a rotação máxima do aparelho (aproximadamente 3000 rpm), e sendo estes realizados em períodos regulares de 0.5min sob vórtice e 0.5min em banho de gelo para evitar a elevação da temperatura da amostra. Foi efetuada a contagem celular das amostras antes e após o rompimento e calculado a porcentagem de rompimento obtida.

2.3.1. Estudo do Tempo de Rompimento:

Foram estudados três tempos distintos de rompimento celular: 3, 6 e 12 min. Os rompimentos foram realizados em agitador de tubos Phoenix® AP56

(Uniscience do Brasil), onde a rotação empregada no aparelho foi fixada em 3000 rpm (controle 9) e a proporção mássica fixada em 1:300. Os rompimentos foram realizados em duplicada para cada tempo estudado.

2.4. Estudo do Rompimento em Moinho Vertical

Foi mantida sob agitação constante uma suspensão de células de *Saccharomyces cerevisiae* na concentração de 0,5g/L. Para tanto, era pesada uma massa de 1,670g de fermento prensado úmido em balança analítica e esta massa era suspensa em 1000mL de água destilada. Com auxílio de proveta, eram coletados 100mL de amostra, que era centrifugada e ressuspensa em Tampão Tris – HCl contendo inibidores de proteases. O equipamento utilizado para este estudo constava de um Moinho Vertical (mostrado na Figura 6.1) no qual se utilizava uma câmara de rompimento de volume útil de 200mL. A câmara foi mantida resfriada através de circulação de água a 5° C. Foi efetuada a contagem celular das amostras antes e após o rompimento e calculado a porcentagem de rompimento obtida.

2.4.1. Estudo do Tempo de Rompimento:

Foram estudados três tempos distintos de rompimento celular: 3, 6 e 12 min. Os rompimentos foram realizados em Moinho Vertical com sistema de refrigeração acoplado, onde a rotação empregada no aparelho foi fixada em 3000 rpm e a proporção mássica fixada em 1:300 conforme o estabelecido por RICCI – SILVA *et al.* (1999). Os rompimentos foram realizados em duplicada para cada tempo estudado.

4.1. ESTUDO DOS MÉTODOS MECÂNICOS DE ROMPIMENTO CELULAR

Para obter maior eficiência no rompimento de *S.cerevisiae*, foram avaliados três métodos distintos de rompimento mecânico: agitação com abrasivos (Moinho de Pérolas e Agitação em Vórtice com Pérolas), ultrassom e cisalhamento através de aparelho Homogenizador.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Estudo do Rompimento em Ultrassom

O estudo do Rompimento em Ultrassom buscou avaliar a possibilidade de aplicação deste método para o rompimento das amostras retiradas do fermentador durante os ensaios descontínuos e descontínuo-alimentados. Para tanto, as amostras rompidas foram de 5mL em uma concentração celular de 0,5g/L em massa seca.

Primeiramente, buscou-se a otimização do método através do estudo de suas variáveis e qual a resposta mais eficiente sobre o ganho no rompimento celular. As variáveis estudadas foram: Pulso Periódico, Amplitude (Frequência) e Tempo de Rompimento.

3.1.1. Estudo do Pulso Periódico

Na Tabela A.1, a seguir, mostram-se os resultados obtidos quando se variou o pulso periódico aplicado durante o rompimento.

TABELA A.1: Rompimento celular em função do pulso periódico aplicado no ultrassom sobre amplitude de 10 seg, sendo o tempo de rompimento de 5 min.

Pulso (seg)	Nº Células/ mm ³	% Rompimento
1	15500	11
4	15750	10
6	16750	4
Amostra Não Rompida	17500	-----

Através dos resultados apresentados na Tabela A.1, verificou-se que o rompimento celular em ultrassom foi dependente do pulso periódico aplicado à amostra a ser rompida. No equipamento estudado, o tempo em que o pulso aplicado ficou desativado foi sempre fixo e igual a 1 seg., por isso,

apenas o tempo em que o pulso ficou ativado é que pôde ser variado. Definindo o pulso como sendo o tempo em que o equipamento emite a onda ultrassônica, concluiu-se que a emissão de ondas ultrassônicas em tempos curtos foi mais eficiente do que a emissão de ondas ultrassônicas por longos períodos.

Uma justificativa para este resultado estaria no fato de que à medida que se aumentava o tempo em que a onda esteve sendo emitida, diminuía-se o tempo de dissipação das bolhas de cavitação formadas, e que seriam as grandes responsáveis pelo rompimento celular. Além disso, deve-se salientar que quanto maior o tempo em que o pulso esteve ativado, ou seja, emitindo a onda, menos pulsos ocorreram no mesmo intervalo de rompimento e, com isso, menos bolhas de cavitação estiveram sendo formadas. Levando-se em consideração os pontos discutidos, considerou-se o pulso de 1 seg. o mais eficiente para este método de rompimento celular.

3.1.2. Estudo da Amplitude

Na tabela A.2, a seguir, mostram-se os resultados obtidos quando se variou a amplitude da onda ultrassônica a que foi submetida à amostra durante o rompimento.

Tabela A.2 : Rompimento celular em função da amplitude da onda ultrassônica aplicada no ultrassom sobre pulso periódico de 1seg. e tempo de rompimento de 5 min.

Amplitude (seg)	Nº Células/ mm ³	% Rompimento
10	26000	37
30	34250	17
90	37000	10
Amostra Não Rompida	41000	-----

Definindo a amplitude como a metade do intervalo completo de qualquer vibração de onda, ou seja, metade de um período de onda e através dos

resultados mostrados na Tabela A.2 verificou-se que o rompimento celular em ultrassom foi dependente da amplitude da onda ultrassônica aplicada. No equipamento estudado, a amplitude da onda ultrassônica resultante podia ser variada de 0 a 100 seg.

Podemos concluir pelos resultados da Tabela A .2 que, para efeitos de rompimento celular, o ideal foi trabalhar com períodos curtos de onda ultrassônica e em faixas inferiores a amplitude de 30seg, uma vez que para amplitudes maiores, a porcentagem de células rompidas foi três vezes menor. Como justificativa a este resultado, pode-se dizer que quanto menor a amplitude aplicada, maior o número de períodos de onda resultantes durante a aplicação do pulso, ou seja, do tempo de aplicação da vibração ultrassônica. Estando este método de rompimento ligado à capacidade da onda ultrassônica gerar bolhas de cavitação, o número de bolhas geradas será maior quanto maior for o número de períodos de onda gerados. Quanto maior o número de períodos de onda gerados, maior a energia gerada e maior será sua eficiência sobre o rompimento celular.

Diante dos resultados obtidos, considerou-se a amplitude de 10 seg a mais indicada para ser aplicada durante o rompimento celular.

3.1.3 Estudo do tempo de rompimento

Na tabela A.3, a seguir, mostram-se os resultados obtidos quando se variou o tempo de rompimento a que foi submetida a amostra durante o rompimento.

Tabela A.3: Rompimento celular em função do tempo de rompimento aplicado no ultrassom sobre pulso periódico de 1seg. e Amplitude de 10seg.

Tempo (min)	Nº Células/ mm ³	% Rompimento
1	14500	5
3	14000	8
5	10750	30
10	8250	46
20	7500	49
Amostra Não Rompida	15250	-----

Através dos resultados obtidos e visualizados na Tabela A.3, concluiu-se que a eficiência do rompimento em ultrassom também foi dependente do tempo a que se expôs a amostra ao rompimento. Através da Tabela A.3 verificou-se também que a porcentagem de rompimento aumentou em, praticamente, quatro vezes quando se alterou o tempo de rompimento de 3 min para 5 min. O mesmo salto na porcentagem de rompimento não foi verificado quando se dobrou o tempo de rompimento de 5 min para 10 min, tendo-se obtido aumento de 35%.

A partir da Figura A.4, concluiu-se que a condição limite de rompimento foi alcançada após 10 min de aplicação de ultrassom na suspensão celular.

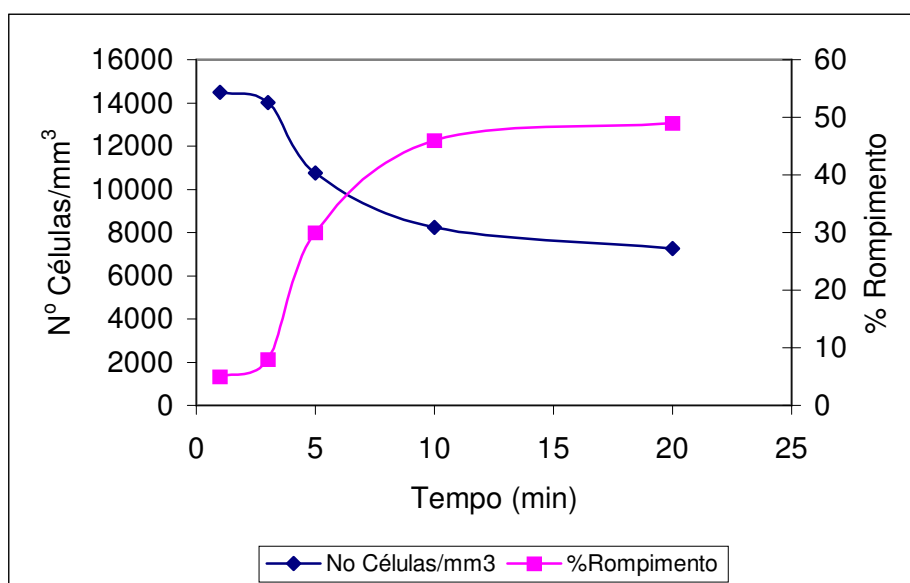


Figura A.4: Rompimento celular em função do tempo de rompimento aplicado no ultrassom sobre pulso periódico de 1seg. e amplitude de 10seg.

3.1.4. Melhor condição de rompimento em ultrassom

Após a definição da melhor condição para o rompimento em ultrassom, foi efetuado ensaio visando determinar a taxa máxima de rompimento possível de ser alcançada por este método.

A Tabela A.5 descreve os resultados obtidos em ensaios efetuados em duas datas diferentes, de forma a comprovar a reprodutibilidade do método. As condições tidas como ótimas para rompimento em ultrassom seriam: Pulso Periódico 1seg, Amplitude 10Hz e Tempo de Rompimento de 10 min.

Tabela A.5: Rompimento celular em ultrassom utilizando condições otimizadas (pulso 1 seg, amplitude 10Hz e tempo de rompimento de 10 min)

Amostra (Data)	Nº Células/ mm ³	% Rompimento
A1 - 01/06/02	10250	41
A2 - 18/06/02	8250	47
Não Rompida	17250	-----

De acordo com MARFFY & KULLA (1974), um método de rompimento celular é considerado eficiente se ele consegue atingir uma taxa de rompimento entre 60% e 80% no caso de obtenção de enzimas por meio de leveduras.

Analisando-se os resultados obtidos no estudo do rompimento de leveduras através do método do ultrassom, a taxa de rompimento alcançada foi de apenas 47%, portanto, abaixo do mínimo desejado. Sendo assim, concluiu-se que o método de rompimento celular em ultrassom, mesmo diante de suas condições ótimas, não foi indicado para rompimento de leveduras.

Uma possível explicação para a ineficácia do método estaria no fato das leveduras possuírem parede celular, o que dificultaria a ação de rompimento das bolhas de cavitação. A parede celular constituir-se-ia uma barreira a mais a ser rompida, que faz da levedura um microrganismo mais resistente do que as bactérias à ação das chamadas forças ultrassônicas.

3.2. Estudo do rompimento celular por cisalhamento utilizando Homogenizador

O estudo do rompimento em Homogenizador buscou avaliar a possibilidade de aplicação deste método para o rompimento das amostras finais de cultivo retiradas do fermentador durante os ensaios descontínuos e descontínuo-alimentados. Para tanto, as amostras rompidas foram de 100mL em uma concentração celular de 0,5g/L em massa seca.

Primeiramente, buscou-se a otimização do método através do estudo de suas variáveis e qual a resposta mais eficiente sobre o ganho no rompimento celular. As variáveis estudadas foram: Velocidade de Rotação e Tempo de Rompimento.

3.2.1. Estudo da velocidade de rotação

Na Tabela A.6., a seguir, mostram-se os resultados obtidos quando se variou a Velocidade de Rotação aplicada durante o rompimento.

Verificou-se, através dos resultados apresentados na Tabela A.6, que a taxa de rompimento celular dependia da velocidade de rotação aplicada pelo aparelho.

Tabela A.6: Rompimento celular em função da velocidade de rotação durante tempo de rompimento de 6 min.

Rotação (rpm)	Nº Células/ mm ³	% Rompimento
8000	14250	14
17000	14000	15
26000	13000	21
Não Rompidas	16500	-----

Os resultados indicaram que mesmo diante de uma rotação de 21000 rpm, não se conseguiu atingir uma taxa de rompimento considerável, sendo inclusive, cerca de três vezes menor que a mínima desejada.

3.2.2. Estudo do Tempo de Rompimento

Na Tabela A.7., a seguir, mostram-se os resultados obtidos quando se variou o Tempo de Rompimento a que foi submetida a amostra.

Tabela A.7: Rompimento Celular em função do Tempo de Rompimento em Homogenizador sob Rotação de 28000 rpm.

Tempo (min)	Nº Células/ mm ³	% Rompimento
6	13250	20
12	12500	24
Não Rompida	16500	-----

Verificou-se, que mesmo sendo dobrado o tempo de rompimento da amostra no homogenizador, não houve expressiva alteração da taxa de rompimento (apenas cerca de 4 pontos percentuais conforme mostrado na Tabela A.7). Ficou, portanto, claro que o método de rompimento não pôde ser otimizado em função do tempo de rompimento.

HETHERINGTON *et al.* (1971) já haviam estudado diversos fatores de forma a avaliar o que poderia interferir sobre a taxa de rompimento em homogenizador e haviam concluído que o fator de maior interferência seria a concentração celular. Segundo SCHENE *et al.* (2000), a existência do plasmídeo no interior da célula, promoveria um aumento na necessidade de ATP pela célula, provocando, diante das mesmas condições de cultivo, uma diminuição da velocidade de crescimento celular quando comparada à célula sem plasmídeo. Pode-se dizer, então, que em cultivos de microrganismos geneticamente modificados, as concentrações celulares resultantes no final da fermentação serão sempre menores que as obtidas em cultivos com o microrganismo não modificado geneticamente. SILVA (2000) obteve uma produtividade em células (Pr_x) por volta de 0,60 g célula/h, enquanto que, para os ensaios descontínuos efetuados neste trabalho, com o mesmo microrganismo, porém, modificado geneticamente, a máxima produtividade em células alcançada foi de apenas 0,13 g célula/h. Tendo em vista este dado, concluiu-se que o crescimento celular foi um fator limitante no processo e que não se poderiam alcançar resultados muito mais expressivos para a taxa de rompimento em Homogenizador dos já alcançados para 0,5g/L de concentração celular.

Concluiu-se, portanto, que o método de rompimento celular através de Homogenizador não foi indicado para rompimento de leveduras geneticamente modificadas, a não ser que se efetuasse uma concentração da massa celular final obtida no fermentador, a fim de aumentarmos a concentração celular obtida e, com isso, a eficiência do processo. Não procedendo desta forma, as taxas de rompimento obtidas estarão abaixo do limite mínimo estabelecido para uma eficiente taxa de rompimento celular (MARFFY & KULLA, 1974).

3.3. Estudo do rompimento por agitação em presença de abrasivos

Para esse estudo, foram avaliados dois tipos de sistemas de agitação: o primeiro avaliou a eficácia do método para rompimento das amostras retiradas do fermentador e o segundo avaliou a eficácia do método para rompimentos do volume de células obtido no final do cultivo, em volumes maiores e utilizando o equipamento denominado **Moinho de Pérolas**, existente no Laboratório de Enzimologia do Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica.

3.3.1. Estudo do método de rompimento por agitação com abrasivos utilizando pérolas de vidro em agitador de tubos

O estudo do rompimento em agitador de tubos utilizando pérolas de vidro buscou avaliar a possibilidade de aplicação deste método para o rompimento das amostras de cultivo retiradas do fermentador durante os ensaios descontínuos e descontínuo-alimentados. Para tanto, as amostras rompidas foram de 5mL em uma concentração celular de 0,5g/L em massa seca.

O estudo focou otimizar o tempo de rompimento para este método e avaliar sua eficiência para o fim estipulado.

Na Tabela A .8, a seguir, são apresentados os resultados obtidos ao se variar o tempo de rompimento em agitador de tubos utilizando uma proporção de 1:300 entre massa de células e massa de pérolas.

Tabela A.8: Rompimento Celular em função do tempo em que a amostra foi submetida a este rompimento utilizando pérolas de diâmetro 0,5mm e proporção mássica 1:300 (g célula / g pérolas).

Tempo (min)	Nº Células/ mm ³	% Rompimento	Proteínas (mg/L)	Atividade _{G6PDH} (U/L)
0	21250	----	0	2
3	5750	65	0.073	12
6	5000	70	0.085	24
12	1750	89	0.088	30

Verificou-se que bastaram 3 min de Rompimento nessas condições (Tabela A.8) para que se atingisse o limite mínimo para a Taxa de Rompimento considerado ideal no caso de leveduras (60%) (MARFFY *et al.*, 1974). Com 12 min de Rompimento, logrou-se atingir uma taxa próxima de 90%, considerada excelente para o rompimento de leveduras (MARFFY *et al.*, 1974). Tendo sido atingido valores tão significativos de taxa de rompimento, pôde-se considerar este método muito eficiente para o rompimento de leveduras, visando a obtenção de enzimas intracelulares.

Definiu-se o ponto ótimo de rompimento celular como sendo aquele em que ocorreu a maior taxa de rompimento celular, aliada à maior atividade enzimática possível e sem incorrer em aumento significativo na proporção entre a atividade enzimática e a concentração total de proteína na amostra. Para que se avaliasse qual o ponto ótimo de rompimento, os dados da tabela A.8 foram discutidos em gráfico.

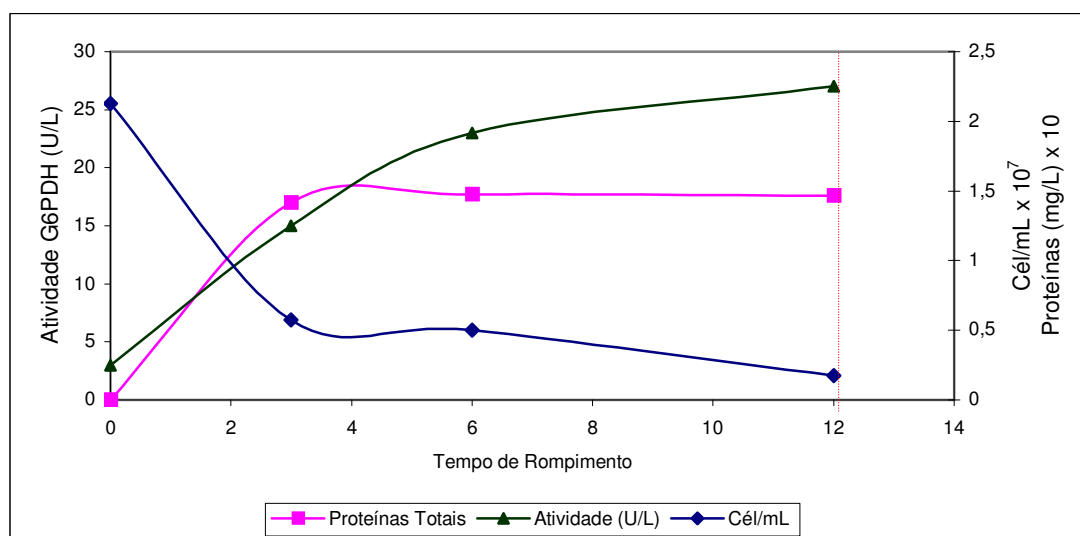


Figura A.9: Definição do ponto ótimo de rompimento celular para o método de agitação em agitador de tubos utilizando pérolas de vidro como agente abrasivo

De acordo com o gráfico obtido na Figura A.9, o ponto ótimo de rompimento ocorreu no instante 12 min. Neste ponto, atingiu-se cerca de 89% de células rompidas e o máximo de atividade de G6PDH. Esta condição aproximou-se da ideal, a maior atividade de G6PDH coincidindo com 100% de rompimento celular.

O fato do tempo de rompimento ter sido dobrado não implicou em aumento significativo na concentração de proteínas totais, o que significa que não aumentou a concentração de outras proteínas na amostra e que poderiam interferir de alguma forma nos resultados, especialmente no cálculo da atividade específica (U/mg Proteína).

Uma vez otimizado, concluiu-se que o método mais eficiente, dentre os estudados, foi o de agitação com abrasivos, sendo as condições ótimas : proporção mássica 1:300 (1 g célula / 300 g pérolas de vidro de diâmetro 0,5mm) e tempo de rompimento de 12min.

3.3.2 Estudo do método de rompimento por agitação com abrasivos utilizando pérolas de vidro em Moinho Vertical

O estudo do rompimento utilizando pérolas de vidro em Moinho Vertical buscou avaliar a possibilidade de aplicação deste método para o rompimento do volume final de cultivo do fermentador durante os ensaios descontínuos e descontínuo-alimentados. Para tanto, as amostras rompidas foram de 200mL em uma concentração celular de 0,5g/L em massa seca.

O estudo visou otimizar o tempo de rompimento para este método e avaliar sua eficiência para o fim estipulado.

Na Tabela A.10, a seguir, foram apresentados os resultados obtidos ao se variar o tempo de rompimento em Moinho Vertical utilizando proporção 1:300 entre massa de células e massa de pérolas.

Tabela A.10: Rompimento celular em função do tempo em que a amostra é submetida ao rompimento utilizando pérolas de diâmetro 0,5mm e proporção mássica 1:300 (g célula / g pérolas) em Moinho Vertical.

Tempo (min)	Nº Células/ mm ³	% Rompimento	Proteínas (mg/L)	Atividade _{G6PDH} (U/L)
0	23750	----	0	3
3	8000	66	0.153	15
6	7000	71	0.170	23
12	2750	88	0.177	27

Da Tabela A.10 concluiu-se que os resultados encontrados para o rompimento de volumes maiores de suspensão celular, utilizando o Moinho Vertical e pérolas de vidro como o agente abrasivo, foram similares aos encontrados para o rompimento utilizando agitador de tubos e pérolas de vidro. Os resultados demonstraram que bastava um tempo de rompimento relativamente curto (3 min) para que se atingisse uma taxa de rompimento celular satisfatória. Observou-se, também, ser possível atingir até 88% de

células rompidas utilizando esse método, valor alcançado em 12min de rompimento.

Apesar de terem sido mantidas as mesmas condições nos dois métodos avaliados para agitação com abrasivos, a concentração de proteínas totais obtidas no Moinho Vertical foi 45% maior que a obtida pelo agitador de tubos. Uma justificativa para isso estaria no fato de que o Moinho Vertical romperia, também, organelas intracelulares em maior número que o agitador de tubos.

No presente trabalho, sendo a G6PDH uma enzima citossólica, para liberá-la bastaria romper a parede celular e a membrana citoplasmática. Este fato justificaria a obtenção dos mesmos valores para a atividade enzimática nos dois métodos, mesmo tendo um aumento na concentração de proteínas totais.

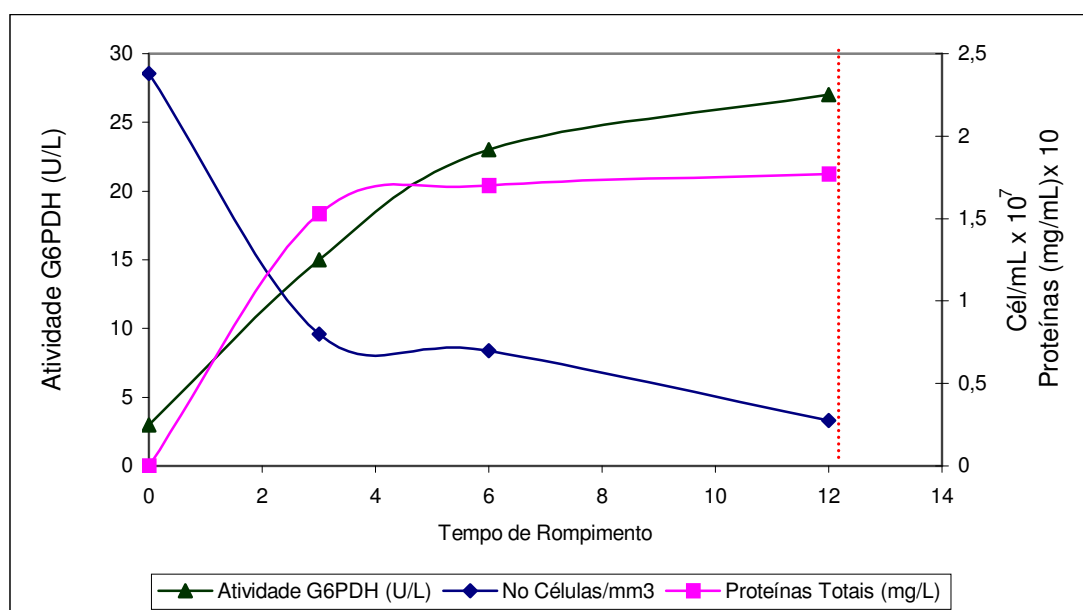


Figura A.11: Definição do ponto ótimo de rompimento celular para o método de agitação em Moinho Vertical utilizando pérolas de vidro como agente abrasivo.

De acordo com a Figura A.11, o ponto ótimo de rompimento para o Moinho Vertical ocorreu no instante 12 min, usando-se a proporção mássica de 1:300 (1g de célula/ 300g de pérolas de vidro de 0.5mm de diâmetro).

O Método de Agitação com Abrasivos mostrou-se o método mais indicado para o rompimento de células de leveduras, quer para pequenos volumes, como os das amostras coletadas, quer para volumes maiores de suspensão celular, como no caso de volumes total do caldo fermentativo.

Após ter-se definido o melhor método de rompimento, efetuou-se um estudo da reprodutibilidade da taxa de rompimento diante do aumento da concentração celular.

Os rompimentos foram efetuados segundo o método descrito no item 3.3.1 referente ao Agitador de Tubos com Pérolas de Vidro. Os dados são apresentados na Tabela A.12, depreendendo-se que o aumento na concentração de células resultou em um aumento na taxa de rompimento. Acrescenta-se, também, que mesmo diante de baixas concentrações celulares (cerca de 15 vezes menor), o método mostrou-se eficiente e reprodutivo.

Tabela A.12: Rompimento Celular pelo Método de Agitação com Abrasivos em função da Concentração Celular.

Amostra	Nº Células/ mm ³	% Rompimento
1	10250	88
2	59000	95
3	68000	97
4	117500	97
5	144500	99

4. CONCLUSÕES:

Com base nos resultados do presente trabalho anexo, conclui-se que:

- O método de rompimento mais indicado para ser utilizado em *Saccharomyces cerevisiae* foi o de agitação com abrasivos (pérolas de vidro), com taxas de rompimento na ordem de 88%.
- A existência de parede celular dificulta a utilização de determinados métodos de rompimento, sendo este, fator limitante para uma boa eficiência do método de rompimento empregado.
- O tempo de 12 min de Rompimento mostrou-se o mais adequado por ter resultado na maior obtenção da enzima , após o rompimento, sem necessariamente acarretar em aumento na concentração total de proteínas, o que seria prejudicial para uma posterior etapa de purificação.
- A concentração celular influencia na taxa de rompimento alcançada, podendo –se chegar a um aumento de 10 pp (pontos percentuais) para este valor.