



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

# **Desenvolvimento de kit para quantificação enzimática de etanol**

Karina Rateiro Lopes

Araraquara, 2011.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

# Desenvolvimento de kit para quantificação enzimática de etanol

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de Farmacêutico-Bioquímico.

**Nome:** Karina Rateiro Lopes

**Orientador:** Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini

**Co-orientador:** Profa. Dra. Edwil A. L. Gattás

Araraquara, 2011.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, Marina Rateiro Lopes e Alexandre Luiz Lopes, pela paciência, apoio e amor incondicionais.

Em especial, dedico-o também, em memória de minha avó Nélia Nieradka Rateiro, que nos deixou saudades.

Estes serão responsáveis por cada sucesso obtido e cada degrau avançado em toda a minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter me oferecido a oportunidade de viver, evoluir a cada dia e conhecer as pessoas que citarei abaixo.

À minha família, em especial aos meus pais, avós e irmão, que são minha fonte inesgotável de alegria, confiança, amor e incentivo.

Aos meus amigos, que participaram comigo desta jornada, tornando-a mais prazerosa, divertida, enfim, única e inesquecível.

E por fim, aos meus professores, por acreditarem em meu potencial, dedicando-se a compartilhar comigo seus conhecimentos e experiências.

## SUMÁRIO

RESUMO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. INTRODUÇÃO .....	10
2. OBJETIVO.....	13
2.1 OBJETIVO GERAL .....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1) Preparo de DNA genômico de levedura .....	14
3.2) Preparo de plasmídeos a partir de <i>E. coli</i> .....	14
3.3) Clonagem empregando a Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) .....	15
3.3.1) PCR .....	15
3.3.2) Digestão de inserto e de plasmídeo .....	16
3.3.3) Desfosforilação do vetor .....	16
3.3.4) Purificação de inserto e vetor .....	16
3.3.5) Reação de ligação .....	16
3.4) Transformação bacteriana .....	17
3.4.1) Preparo de <i>E. coli</i> competente.....	17
3.4.2) Transformação.....	17
3.5) Produção e purificação em larga escala da enzima álcool desidrogenase I de <i>S. cerevisiae</i> , produzida em bactéria .....	18
3.6) Dicroísmo circular .....	19

3.7) Atividade enzimática da proteína álcool desidrogenase I de <i>S. cerevisiae</i> , purificada de bactéria.....	20
3.8) Quantificação de etanol .....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1) Clonagem do gene codificador da enzima álcool desidrogenase I de <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> ( <i>ADH1</i> ) no vetor de expressão de bactéria pET28a .....	23
4.2) Checagem da produção e solubilidade da enzima álcool desidrogenase I de <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> , produzida em bactéria.....	23
4.3) Purificação em larga escala da enzima álcool desidrogenase I de <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> , produzida em bactéria.....	24
4.4) Atividade enzimática da proteína álcool desidrogenase I de <i>S. cerevisiae</i> , purificada de bactéria.....	26
4.5) Quantificação enzimática de etanol utilizando álcool desidrogenase I de <i>S.cerevisiae</i> , purificada a partir de bactéria .....	27
5. CONCLUSÕES .....	34
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	35

## RESUMO

A dosagem do etanol durante a produção de medicamentos, bebidas e combustíveis tem se mostrado bastante importante para o aumento de rendimento dos processos e qualidade dos produtos. Embora existam vários métodos para determinar a concentração do etanol, os enzimáticos são os mais interessantes por serem rápidos, precisos, de fácil manuseio e baixo custo. O objetivo geral desse trabalho foi a elaboração de um Kit de quantificação enzimática de etanol, utilizando a enzima álcool desidrogenase I recombinante de *S. cerevisiae* (Adh1). Para isso, o gene codificador da enzima álcool desidrogenase I (*ADH1*) de levedura foi clonado no vetor pET28a para expressão em *E. coli* (BL21). Em seguida, a produção e solubilidade da enzima álcool desidrogenase I foi determinada, sendo definida uma condição ideal de produção e purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade.

A atividade enzimática da álcool desidrogenase I purificada foi determinada através de ensaios já padronizados na literatura (UV), bem como sua estabilidade em diversas condições de tempo e temperatura. Os resultados obtidos aqui demonstraram que a enzima obtida apresentou boa atividade biológica *in vitro*, com sensibilidade na detecção de no mínimo  $2,3 \times 10^{-4}$  g/L de etanol em 2 minutos. Além disso, a proteína purificada teve sua atividade preservada quando estocada a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 120 dias, características que possibilitarão que a enzima álcool desidrogenase I recombinante, purificada pela metodologia apresentada nesse trabalho, seja utilizada em um kit de quantificação enzimática de etanol rápido, preciso e de baixo custo.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clonagem do gene codificador da enzima álcool desidrogenase I de <i>S. cerevisiae</i> ( <i>ADH1</i> ) no vetor de expressão de bactéria pET 28a.....	28
Figura 2. Checagem da produção e solubilidade da enzima álcool desidrogenase I de <i>S. cerevisiae</i> , produzida em bactéria.....	29
Figura 3. Purificação em larga escala da enzima álcool desidrogenase I de <i>S. cerevisiae</i> , produzida em bactéria.....	30
Figura 4. Desnaturação térmica da enzima álcool desidrogenase I purificada.....	31
Figura 5. Atividade enzimática da proteína álcool desidrogenase I de <i>S. cerevisiae</i> , purificada de bactéria.....	32
Figura 6. Quantificação enzimática de etanol utilizando álcool desidrogenase I de <i>S. cerevisiae</i> , purificada a partir de bactéria.....	33



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	graus Celcius
$\lambda$	comprimento de onda
$\mu\text{g}$	micrograma
$\mu\text{L}$	microlitro
$\mu\text{M}$	micromolar
CD	“circular dichroism” (dicroísmo circular)
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTPs	mistura de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)
D.O.	densidade ótica
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FPLC	“fast performance liquid chromatography” (cromatografia líquida de rápida execução)
g	grama
IPTG	isopropil--D-tiogalactopiranosídeo
kb	quilobase
kDa	quilodalton
L	litro
LB	meio Luria-Bertani
M	molar
mAU	miliabsorbância

mg	miligrama
min	minutos
mL	mililitro
mM	milimolar
NAD	“nicotinamide adenine dinucleotide” (nicotinamida adenina dinucleotídeo)
ng	nanograma
nm	nanômetro
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PCI	fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (24:25:1)
PCR	“Polymerase Chain Reaction” (reação de polimerase em cadeia)
pH	potencial hidrogeniônico
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila
pmol	picomol
SDS	dodecil sulfato de sódio
Tris	tris-hidroximetilaminometano
Triton X-100	polietilenoglicol-terc-octilfenil éter
U	unidade enzimática
UV	ultravioleta
xg	aceleração gravitacional

## 1. INTRODUÇÃO

O etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) é uma substância orgânica obtida por três maneiras gerais: por via destilatória, por via sintética e por via fermentativa, que é a mais importante no Brasil (LIMA et al., 2001). Esse álcool é encontrado em bebidas como cerveja, vinho e aguardente, bem como na indústria de perfumaria. No Brasil, tal substância é também muito utilizada como combustível de motores de explosão, constituindo assim um mercado em ascensão para um combustível obtido de maneira renovável e o estabelecimento de uma indústria química de base, sustentada na utilização de biomassa de origem agrícola e renovável (Maris e cols., 2006).

As leveduras, especialmente do gênero *Saccharomyces*, são os microrganismos principais na obtenção do etanol por via fermentativa (LIMA et al., 2001). A fermentação para produção de etanol envolve 12 reações em seqüência ordenada (LIMA et al., 2001) e, resumidamente, consiste na transformação do açúcar (ou cereais, como a cevada e o malte) em álcool e gás carbônico, sob a ação das leveduras (RASOVSKY, 1973). A dosagem do etanol é descrita na literatura como sendo de grande importância em diversas áreas tais como a saúde, alimentos e bebidas, e na produção de bioetanol (BEUTLER, 1977). O interesse na determinação do etanol surgiu do monitoramento de sua formação para controlar a fermentação (NICULESCU et al., 2003), da necessidade de verificação do limite legal de aceitação, da influência nas características sensoriais (MATAIX e LUQUE DE CASTRO, 2000), do importante efeito no crescimento das leveduras (KITAGAWA et al., 1991) e, por razões econômicas, particularmente na relação entre as taxas impostas para álcool em diferentes países (YARITA et al., 2002).

Existem vários métodos para determinar a concentração de etanol que se subdividem em físicos, químicos e enzimáticos. Os métodos enzimáticos têm se mostrado mais baratos, precisos e de fácil manuseio. Uma das principais metodologias enzimáticas utilizadas foi descrita inicialmente por Racker (1955), a qual é baseada na reação de oxidação do etanol, catalisada pela enzima álcool desidrogenase, com a concomitante redução do NAD<sup>+</sup> (RACKER, 1955). Nesse processo, o NADH formado é medido a 340 nm e é proporcional a concentração do etanol.

As álcool desidrogenases - ADHs (EC 1.1.1.1) são oxidoreductases que catalisam a oxidação reversível do etanol para aldeídos ou cetonas, com a concomitante redução do NAD<sup>+</sup> ou NADP<sup>+</sup>. Elas são geralmente encontradas em bactérias, leveduras, plantas e animais (SUND e THEORELL, 1963; BRANDEN et al.,1975) e são subdivididas em 3 grupos (JORNVALL et al.,1987): as enzimas de cadeia longa ativadas por ferro, como as enzimas de *S. cerevisiae* ( WILLIAMSON e PAQUIN,1987), as de cadeia curta que são zinco independentes, como as enzimas do *Lactobacillus brevis* (NIEFIND et al.,2003) e as de cadeia média, que são zinco dependentes, como as enzimas do fígado ( ADOLPH et al.,2000) e as enzimas ( isoenzimas I–III) de *S. cerevisiae* ( SALIOLA et al., 1990). A Adh1 de *S. cerevisiae* é tetramérica e consiste em 4 subunidades idênticas ou semelhantes, com um sítio ativo cada, que necessita de um íon de zinco para ter atividade (VEILLON e SYTKOWSKI,1975; KINMAN e WELSH,1976; COLEMAN e WEINER,1973). Há um segundo íon de zinco em cada subunidade que tem papel conformacional, provavelmente pela estabilização da estrutura terciária (MARGONET et al.,1992).

A metodologia de quantificação de etanol utilizando a enzima álcool desidrogenase I de *S. cerevisiae* é conhecida (RACKER, 1955), mas não é

atualmente usada no controle de qualidade do processo industrial, por causa do alto custo desta enzima, sendo a determinação de etanol crítica para o controle de qualidade na indústria de bebidas (FLETCHER e STADEN, 2003), além de servir de dosagem de apoio na fabricação de combustíveis (álcool etílico e biodiesel). Portanto, o objetivo geral desse trabalho foi desenvolver um protocolo de baixo custo para produzir em larga escala a álcool desidrogenase I de *S.cerevisiae*, funcional e estável, para ser usada em um kit para determinação de etanol. Para isso, a enzima álcool desidrogenase I, fusionada a um tag de 6xHis foi produzida em bactéria e purificada por cromatografia de afinidade em condições desnaturantes. Depois do tratamento de refolding, ensaios de atividade e estabilidade demonstraram que a enzima Adh1 produzida pode ser usada em um kit para detectar etanol no limite  $2.3 \times 10^{-4}$  g/L em 2 minutos. Além disso, a Adh1 recombinante foi estável por até 120 dias quando estocada a - 20°C.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

O presente trabalho teve como objetivo geral o desenvolvimento de um kit para quantificação enzimática de etanol, ferramenta importante na indústria cosmética, alimentícia e de combustível.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**2.2.1)** Clonagem do gene codificador da enzima álcool desidrogenase I de *S. cerevisiae* no vetor pET28a para expressão em *E. coli*.

**2.2.2)** Determinação das condições de produção da proteína álcool desidrogenase I.

**2.2.3)** Purificação da proteína álcool desidrogenase I por cromatografia de afinidade.

**2.2.4)** Verificação da estabilidade da enzima álcool desidrogenase I em diversas condições de temperatura.

**2.2.5)** Determinação da atividade da enzima álcool desidrogenase I produzida e purificada.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1) Preparo de DNA genômico de levedura**

A linhagem de levedura de interesse foi crescida em 10 mL de YPD (extrato de levedura 10 g/L e peptona 20 g/L) até a saturação ( $D.O_{600nm} > 1$ ). A cultura foi centrifugada a 3.000 xg por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e as células lavadas com 500 µL de água Milli-Q. As células foram suspensas em 200 µL de tampão de lise (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, Triton X100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM e EDTA 1 mM) e 200 µL de PCI (fenol/clorofórmio/álcool isoamílico), e foram adicionados aproximadamente 300 mg de pérolas de vidro. As células foram submetidas à agitação vigorosa por 3 a 4 minutos, adicionadas de 200 µL de TE pH 8,0 e novamente submetidas a agitação por mais 1 minuto. As células foram centrifugadas a 13.400xg por 5 minutos, e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo. A extração com 200 µL de PCI foi repetida por 3 vezes. Os ácidos nucléicos foram então precipitados da fase aquosa com 1 mL de etanol absoluto gelado e submetidos à centrifugação a 13.400 xg por 2 minutos a 4°C. O precipitado foi suspenso em 400 µL de TE pH 8,0, adicionado de 3 µL de RNase A (10 mg/ml) e incubado a 37°C por 30 minutos. A extração com PCI foi repetida mais uma vez e o DNA precipitado com 10 µL de acetato de amônio 4 M e 1 mL de etanol absoluto. O tubo foi centrifugado a 13.400xg por 2 minutos a 4°C e o precipitado lavado com 400 µL de etanol 75% gelado. O precipitado foi seco ao ar livre e suspenso em 50 µL de TE pH 8,0.

#### **3.2) Preparo de plasmídeos a partir de *E. coli*.**

##### **3.2.1) Em pequena escala – Miniprep:**

Bactérias contendo os plasmídeos de interesse foram inoculadas em 3 mL de meio LB contendo 50 µg/mL de ampicilina e incubadas a 37°C por aproximadamente

16 horas, sob agitação constante. A cultura (1,5 mL) foi centrifugada por 1 minuto a 12.000 xg. As células foram suspensas em 200 µL de TE (Tris 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0). Foram adicionados 200 µL de solução NaOH/SDS (NaOH 0,2 M, SDS 1%), incubando-se por 5 minutos a 37°C. Em seguida, foram adicionados 150 µL de acetato de sódio 3 M pH 4,8. O tubo foi invertido várias vezes e centrifugado por 6 minutos a 12.000 xg. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e, a seguir, foi adicionado isopropanol (3 vezes o volume da amostra). Após incubação de 5 minutos a 37°C, o tubo foi centrifugado por 10 minutos a 12.000 xg. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com etanol 75%. Depois de seco, o DNA foi suspenso em 50 µL de TE pH 8,0.

### 3.2.2) Em média escala – Midiprep:

Uma colônia de bactéria transformada com o plasmídeo desejado foi inoculada em 25 mL de meio seletivo (LB adicionado de ampicilina 50 µg/mL) e incubada a 37°C durante a noite, sob agitação. Os plasmídeos foram extraídos e purificados por lise alcalina, utilizando o kit “QIAfilter Plasmid Midi” da Qiagen

## **3.3) Clonagem empregando a Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)**

### 3.3.1) PCR:

As reações de amplificação foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 mL contendo 1µM de cada oligonucleotídeo, 20 a 40 ng de DNA genômico ou DNA plasmidial, 2 unidades da enzima Taq Hifi DNA polimerase (Invitrogen) e 2 µL de uma mistura de desoxinucleotídeos (10 mM cada), num volume final de reação de 100 µL. As condições das reações foram estabelecidas de acordo com os oligonucleotídeos utilizados. Após o último ciclo, a reação foi mantida a 72 °C por 5 minutos e, a seguir, a 4 °C até o momento da próxima etapa. Os produtos da reação



de PCR foram purificados utilizando o Kit “QIAquick PCR Purification” da Qiagen e analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

### 3.3.2) Digestão de inserto e de plasmídeo:

Os produtos amplificados foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição, de acordo com o sítio de restrição gerados pelos oligonucleotídeos e seguindo as condições recomendadas pelo fabricante (New England Biolabs). Da mesma forma, os vetores plasmidiais de interesse foram digeridos em um volume de 20  $\mu$ L, utilizando as condições recomendadas para as diferentes enzimas de restrição (New England Biolabs).

### 3.3.3) Desfosforilação do vetor:

Após digestão do vetor, foram adicionadas 5-10 unidades de fosfatase alcalina (CIAP-Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) e a reação incubada a 37°C por 30 minutos. A reação foi interrompida por aquecimento a 75°C por 10 minutos.

### 3.3.4) Purificação de inserto e vetor:

Os produtos de digestão do inserto e do vetor foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8% em TAE (Tris 40 mM, ácido acético glacial 0,11% e EDTA 1 mM), contendo 0,5  $\mu$ g/mL de brometo de etídio. Ao DNA foi adicionado tampão de amostra (azul de bromofenol 0,125%, xileno cianol 0,125% e glicerol 50%) e a solução foi aplicada no gel, o qual foi submetido a voltagem de 80 V. O DNA foi visualizado utilizando luz ultravioleta e a imagem documentada utilizando o aparelho Alphamager 2200 (Alpha Innotech Corporation). Os fragmentos desejados foram purificados utilizando o kit “QIAquick Gel Extraction” da Qiagen.

### 3.3.5) Reação de ligação:

Os fragmentos (vetor e inserto), após a purificação, foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% para avaliar a pureza e estimar a concentração

dos mesmos. A reação de ligação foi realizada utilizando um volume final de 10  $\mu\text{L}$ , tampão apropriado, um excesso de inserto em relação ao vetor (usualmente 10 vezes) e 200-400 unidades de T4 DNA ligase. A reação foi incubada a 16°C por 4-24 horas.

### **3.4) Transformação bacteriana**

#### **3.4.1) Preparo de *E. coli* competente:**

Uma colônia da cepa de *E. coli* desejada foi crescida em 5mL de meio LB (extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L; triptona 10 g/L) a 37°C, durante a noite e sob agitação. No outro dia, a cultura foi diluída (1:100) em 100 mL de meio fresco e crescida a 37°C, sob agitação até atingir  $\text{D.O.}_{600\text{nm}}=0,3-0,5$ . A cultura bacteriana foi resfriada em banho de gelo e centrifugada a 1.600 xg a 4°C por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e as células foram suspensas em 20 mL de cloreto de cálcio 100 mM gelado. As células foram incubadas no gelo por 20 minutos. A seguir, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 1.600 xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e as células suspensas em 2-4 mL de cloreto de cálcio 100 mM gelado. Novamente, as células foram mantidas no gelo por 1-24 horas. A suspensão celular foi congelada em alíquotas individuais de 100-200  $\mu\text{L}$  a -80°C, em glicerol 20%.

#### **3.4.2) Transformação:**

As células de *E. coli* competentes estocadas foram descongeladas em banho de gelo. Em um tubo de microcentrífuga foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  das células competentes e os produtos da reação de ligação ou 50–250 ng de DNA plasmidial. Os tubos foram mantidos em banho de gelo por 30 minutos e submetidos ao choque térmico em banho-maria a 42°C por 2 minutos. A seguir, 1mL de meio LB líquido foi adicionado ao tubo, o qual foi incubado por 1 hora a 37°C, sob agitação. Finalmente,

as células foram plaqueadas em meio seletivo (meio LB contendo ampicilina 50 µg/mL) e incubadas a 37°C até a obtenção de colônias.

### **3.5) Produção e purificação em larga escala da enzima álcool desidrogenase I de *S. cerevisiae*, produzida em bactéria**

Uma colônia da linhagem BL21 de *E. coli* transformada com a construção plasmidial pET28a contendo o gene codificador de *ADH1* foi crescida em 50mL de meio LB líquido com 100 µg/mL de ampicilina e 25 µg/mL de cloranfenicol a 37°C por uma noite sob agitação. Em seguida, a cultura foi diluída para D.O.<sub>600nm</sub> = 0,1 em 4 L de meio LB líquido com 100 µg/mL de ampicilina e 25 µg/mL de cloranfenicol e crescida nas mesmas condições até D.O.<sub>600nm</sub> = 0,6. A expressão do gene que codifica a proteína de fusão foi induzida com 0,4 mM de IPTG a 37°C. Após 3 horas de crescimento, as células foram coletadas por centrifugação a 4.000xg por 20 minutos a 4°C, lavadas com tampão PBS 1X e estocadas a -80°C.

As células foram descongeladas em gelo e lisadas em tampão de lise desnaturante (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8,8 ; 20 mM Imidazol; 300 mM NaCl e 6 M Uréia). Para a lise, as células foram submetidas à sonicação com ciclos de 4,0 s de sonicação e 9,0 s de repouso, durante 2 minutos, numa amplitude de 60% a 4°C. O lisado foi então centrifugado a 25.000 xg por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante submetido aos passos cromatográficos de purificação por afinidade. Todos os passos cromatográficos foram executados em cromatógrafo manual.

O extrato bruto foi submetido a uma etapa cromatográfica de afinidade em coluna carregada com níquel (NINTA - Qiagen) de 5 mL. Foi utilizado 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8,8, 20 mM Imidazol, 300 mM NaCl e 6 M Uréia como tampão de corrida e 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8,8, 250 mM Imidazol, 300 mM NaCl e 6 M Uréia como tampão de eluição. Alíquotas das frações obtidas foram analisadas por SDS-

PAGE e coloração por Coomassie Blue. Nessa análise, a amostra da proteína final foi considerada pura (maior que 95%).

Para o refolding, as frações obtidas da cromatografia anterior que continham a proteína de fusão 6xHis-Adh1 desnaturada (0,5mg/mL) foram reunidas e submetidas à diálise seriada a 4°C, realizada em membrana SpectraPor (Spectrum) com poro de seleção de 12-14.000 Da, contra 2L de tampão de refolding (10 mM Tris-HCl pH 8,5; 0,1mM DTT; 10  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>) contendo concentração decrescente de uréia (4M, 2M, 1M e 0M de uréia).

### **3.6) Dicroísmo circular**

A proteína álcool desidrogenase I de *S. cerevisiae*, purificada por afinidade em condições desnaturantes e renaturada através de diálise seriada com concentrações decrescentes de uréia, foi submetida a ensaios de dicroísmo circular no Instituto de Biofísica da UNESP de São José do Rio Preto, com a colaboração do Prof. Dr. Marcelo Andres Fossey e da Profa. Dra. Fátima Pereira de Souza, responsáveis pela coleta e análise dos dados. Os experimentos de dicroísmo circular foram realizados no espectropolarímetro Jasco J-710 equipado com controle de temperatura (Japan Spectroscopic Co.). Os espectros de dicroísmo circular na região do UV distante (190 - 250 nm) foram obtidos utilizando-se uma cubeta de quartzo de 0,1 cm de caminho ótico, a uma concentração de 0.031 mg/ml de proteína em tampão 10mM Tris-HCl pH7,2. Todos os espectros de dicroísmo circular foram corrigidos pela contribuição do tampão utilizado e as elipticidades observadas foram transformadas em elipticidade molar por resíduo [ $\theta$ ].

A curva de desnaturação térmica foi obtida monitorando as mudanças na elipticidade no comprimento de onda de 222 nm, variando a temperatura em 0,25 +/- 0,005 °C/min, de 20 a 70°C.

### **3.7) Atividade enzimática da proteína álcool desidrogenase I de *S. cerevisiae*, purificada de bactéria**

O ensaio da atividade da Adh1 foi realizado conforme descrito por Racker (1955), baseada na conversão enzimática do etanol a acetaldeído através de reação de óxido-redução, tendo o NAD<sup>+</sup> (Nicotinamide adenine dinucleotide) como aceptor de elétrons. A atividade da enzima frente ao etanol foi feita pela diferença da absorbância a 340 nm, por minuto, entre o ensaio e o controle correspondente (reação sem a presença da enzima). A reação foi realizada utilizando-se a seguinte mistura: 0,5 mL solução tampão pirofosfato de sódio 0,06 M, pH 8,8; 0,1 mL de etanol 3 M; 0,1 mL de NAD<sup>+</sup> 0,015 M; 0,1 mL da enzima Adh1 purificada e 2,2 mL água completando um volume final de reação de 3,0 mL em cubeta de quartzo. A reação foi iniciada pela adição da enzima purificada e a formação do NADH foi acompanhada espectroscopicamente a 340 nm. A absorbância foi correlacionada com concentração usando-se o coeficiente de absorvidade molar do NADH de  $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Um controle contendo todos os reagentes do ensaio, exceto o substrato, que foi substituído por água destilada, foi preparado e procedeu-se a leitura da absorbância a 340 nm. Os valores do ensaio controle foram subtraídos dos valores obtidos para o ensaio enzimático e as diferenças foram utilizadas para a obtenção das curvas de tempo.

Uma unidade de atividade (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima que produziu 1  $\mu\text{mol}$  de NADH por mL de enzima por minuto de acordo com as condições de ensaio, que foram realizados em triplicata para cada amostra. A atividade da enzima foi expressa como a quantidade de NAD<sup>+</sup> reduzido em 1 minuto por mL de extrato e os cálculos foram obtidos utilizando-se a seguinte fórmula:

$$U/mL = \frac{\Delta A_x V_x \text{dil.}}{\Delta t_x \varepsilon_x d_x v}$$

Onde:

$\Delta A$  = diferença de absorvância a 340 nm;

$V$  = volume total do ensaio (mL);

dil = diluição;

$\Delta t$  = variação de tempo (minuto);

$\varepsilon$  = coeficiente de absorvância molar do NADH;

$d$  = caminho óptico (cm);

$v$  = volume de amostra no ensaio (mL).

A atividade específica (U/mg) foi calculada através do quociente da atividade (U/mL) e pelo conteúdo protéico (mg/mL).

### 3.8) Quantificação de etanol

A determinação do etanol foi ensaiada segundo Gattás et al. (2002). O método baseia-se na conversão enzimática do álcool etílico a acetaldeído e NADH, através de reação de óxido-redução, tendo o NAD<sup>+</sup> como aceptor de elétrons. A reação ocorre a pH 8,8 com o equilíbrio deslocado para a formação do acetaldeído pela reação do mesmo com semicarbazida. O Tubo R onde ocorreu a reação enzimática completa foi preparado da seguinte forma: 0,1 mL de NAD<sup>+</sup> 0,015 M; 0,04 mL de amostra (bebidas alcoólicas) diluída 2000 vezes; 0,5 mL de pirofosfato de sódio 0,13M pH 8,8, 0,1 mL de semicarbazida 0,079 M e 0,1 mL de glicina 0,024 M, 0,5U da enzima Adh1 purificada e 1,1 mL de água.

Uma curva padrão para a dosagem do etanol foi construída utilizando soluções de etanol em diferentes concentrações. O Tubo P diferiu do Tubo R por conter solução padrão do etanol (concentração final no Tubo R ao redor de  $6,9 \times 10^{-3} \text{ g. L}^{-1}$ ) no lugar da amostra, sendo que o Tubo Br-e foi preparado para conter água no lugar da amostra (controle da preparação enzimática). A reação enzimática foi iniciada no tempo zero com a adição da preparação enzimática e a reação procedeu por 5 min a temperatura ambiente. As diferenças entre as absorvâncias (340 nm) das soluções dos tubos R e Br-e ( $A_R - A_{Br-e}$ ), bem como, a diferença entre o Tubo P e o tubo Br-e ( $A_P - A_{Br-e}$ ) foram obtidas e utilizadas na determinação da concentração do etanol utilizando-se a seguinte equação:

$$C \text{ g/l} = \frac{(A_R - A_{Br-e})}{(A_P - A_{Br-e})} \times V \times \text{dil.} \times \frac{1}{v} \times c \times PM_{(\text{etanol})}$$

Onde:

C = concentração do etanol em g/L;

( $A_R - A_{Br-e}$ ) = Abs. amostra – Abs. branco;

( $A_P - A_{Br-e}$ ) = Abs. padrão – Abs. branco;

V = volume da reação (mL);

dil. = diluição da amostra;

v = volume da amostra (mL);

c = concentração do padrão na cubeta (M);

PM = massa molecular do etanol

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1) Clonagem do gene codificador da enzima álcool desidrogenase I de *S. cerevisiae* (*ADH1*) no vetor de expressão de bactéria pET28a

O gene codificador da enzima álcool desidrogenase I (*ADH1*) foi inicialmente amplificado por PCR utilizando como molde DNA genômico de *S. cerevisiae*. Em seguida, tanto o produto de PCR como o vetor pET28a foram submetidos a digestão com as enzimas *EcoRI* e *XhoI* (painel A da Figura 1) e unidos através da reação de ligação utilizando T4 DNA ligase. Após transformação do produto de ligação na linhagem DH5 $\alpha$  de *E. coli*, quatro clones obtidos foram submetidos a checagem de clonagem como apresentado no painel B da Figura 1. Para isso, inóculos individuais de quatro clones foram feitos em 5mL de meio LB contendo 100  $\mu$ g/mL de Ampicilina e grande quantidade de plasmídeo foi produzido e purificado. Em seguida, os plasmídeos correspondentes a cada clone foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI*, mesmas enzimas utilizadas na obtenção dos clones. Como pode ser observado no painel B da Figura 1, os clones 2 e 3 foram positivos pois liberaram na digestão um fragmento de aproximadamente 1700pb, tamanho correspondente ao gene codificador da enzima álcool desidrogenase de *S. cerevisiae*.

### 4.2) Checagem da produção e solubilidade da enzima álcool desidrogenase I de *S. cerevisiae*, produzida em bactéria

Inicialmente, a linhagem BL21 de *E. coli* foi transformada com a construção plasmidial pET28a-*ADH1* (clone 2) e crescida em 3 mL de meio LB líquido contendo 100  $\mu$ g/mL de ampicilina e 25  $\mu$ g/mL de cloranfenicol a 37°C por uma noite sob agitação. Em seguida, a cultura foi diluída para D.O.<sub>600nm</sub> = 0,1 em 50 mL de meio LB líquido com 100  $\mu$ g/mL de ampicilina e 25  $\mu$ g/mL de cloranfenicol e crescida nas



mesmas condições até  $D.O_{600nm} = 0,6$  (Fase logarítmica de crescimento). A expressão do gene que codifica a proteína de fusão foi induzida com 0,4 mM de IPTG a 37°C por 3 horas. Após a indução da expressão gênica, as células foram coletadas por centrifugação a 4.000 xg por 20 minutos a 4°C, lavadas com tampão PBS 1X e estocadas a -80°C. Para a checagem da produção da proteína de interesse, as células foram descongeladas em gelo e lisadas em tampão desnaturante (50 mM  $NaH_2PO_4$  pH 8,8; 20 mM Imidazol; 300 mM NaCl e 6 M Uréia). O lisado foi então centrifugado a 25.000 xg por 30 minutos a 4°C e tanto o sobrenadante como o precipitado foram avaliados por SDS-PAGE. A Figura 2 apresenta essa análise por SDS-PAGE onde pode-se observar a produção da enzima álcool desidrogenase I em 1, 2 e 3 horas após indução com IPTG (canaletas 3 a 5). Também verifica-se que na condição de lise apresentada a proteína álcool desidrogenase I apresenta-se solúvel (canaleta 6) sendo possível sua futura purificação por cromatografia de afinidade. Apesar de inúmeras tentativas, não foi possível obter a proteína álcool desidrogenase I solúvel em condições não desnaturantes (sem a utilização de uréia no tampão de lise), sendo necessário purificá-la na sua forma desnaturada.

#### **4.3) Purificação em larga escala da enzima álcool desidrogenase I de *S. cerevisiae*, produzida em bactéria**

Com o propósito de obter grande quantidade da enzima álcool desidrogenase de *S. cerevisiae* funcional, a produção em larga escala da proteína recombinante foi realizada em bactéria e esta foi purificada, como descrito na metodologia. Após a lise celular por sonicação e clarificação do lisado por centrifugação, o extrato foi submetido à cromatografia de afinidade utilizando coluna NINTA (Qiagen). A Figura 3 apresenta as etapas dessa purificação, onde pode-se verificar que várias frações

contêm a proteína álcool desidrogenase I pura fusionada a 6 histidinas. Após purificação, o volume total de eluição (30mL), contendo 20 mg da proteína álcool desidrogenase I desnaturada, foi submetido a renaturação através de uma sequência de 4 diálises de 6 horas cada, a 4°C, contra 2 L de tampão 10 mM Tris-HCl pH 8.5; 0.1 mM DTT; 10  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> contendo concentração decrescente de uréia (4M, 2M, 1M e 0M de uréia).

A fim de verificar se a proteína purificada apresentava estruturas secundárias após a diálise seriada de renaturação, esta foi submetida ao ensaio de dicroísmo circular. O dado obtido por essa técnica fornece uma medida estimada do conteúdo de estruturas secundárias existentes na proteína, resultado que pode ser comparado com a estrutura já determinada por cristalografia da álcool desidrogenase I de *S. cerevisiae*, depositada no banco de dados Protein Data Bank (PDB-2HCY). Para isso, amostras da proteína 6xHis-adh1 purificadas foram enviadas para o Instituto de Biofísica da UNESP de São José do Rio Preto, onde os ensaios foram realizados com a colaboração do Prof. Dr. Marcelo Andres Fossey e da Profa. Dra. Fátima Pereira de Souza.

O perfil obtido para a proteína 6xHis-Adh1 evidenciou um predomínio de estruturas secundárias  $\alpha$ -hélices (46%), com 30% de estruturas irregulares e 24% de estruturas  $\beta$  (resultados não mostrados), confirmando dados anteriormente descritos (PDB-2HCY). Em posse desses dados, foi realizado também um ensaio de estabilidade estrutural dessa proteína por desnaturação térmica e análise de suas estruturas secundárias no comprimento de onda de 222 nm. Sob variação de temperatura de 20°C a 70°C foi possível constatar que a proteína 6xHis-Adh1 sofre nenhuma ou pouca modificação estrutural até 30°C e que a partir de 44°C metade das moléculas de 6xHis-Adh1 estão desnaturadas e inativas (Figura 4). Esse dado

indica que a enzima álcool desidrogenase I purificada é estável a temperatura ambiente, sendo possível utilizá-la em testes de atividade nessa temperatura.

#### **4.4) Atividade enzimática da proteína álcool desidrogenase I de *S. cerevisiae*, purificada de bactéria**

O ensaio de atividade enzimática da proteína álcool desidrogenase I purificada foi realizado conforme descrito na metodologia apresentada, baseada na conversão enzimática do etanol a acetaldeído através de reação de óxido-redução, tendo o NAD<sup>+</sup> como aceptor de elétrons. A atividade do extrato frente ao etanol foi feita pela diferença da absorbância a 340 nm, por minuto, entre o teste e o controle correspondente, como pode ser observado na Figura 5.

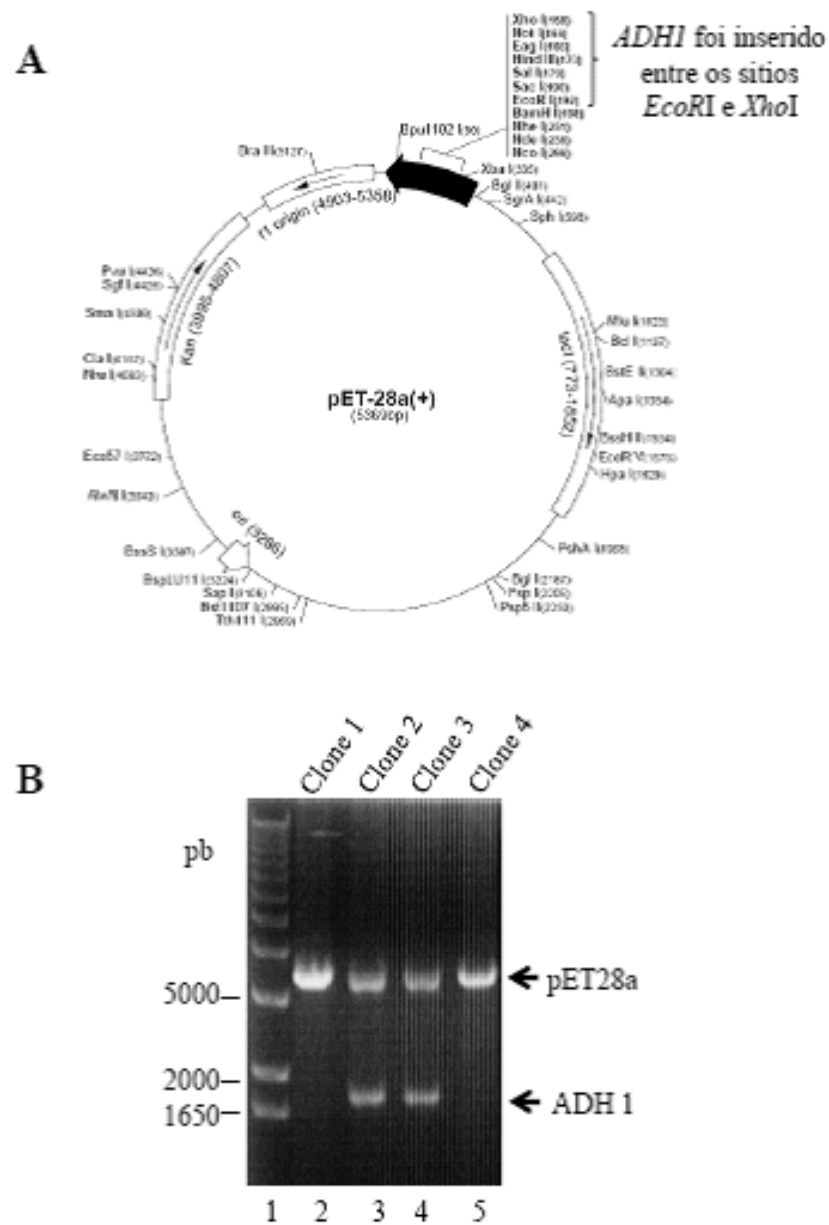
Como esperado, no painel A da Figura 5 verifica-se que o aumento da atividade da enzima 6xHis-Adh1 é proporcional ao aumento de sua quantidade no ensaio. No entanto, o mesmo não ocorre com relação ao tempo (painel B da Figura 5). Pode-se observar que não existe diferença significativa entre reações com duração de 1 a 90 minutos, sendo possível afirmar que a proteína 6xHis-Adh1 purificada é capaz de converter etanol a acetaldeído a partir de 1 minuto de reação.

O mesmo teste de atividade também foi realizado após estocagem da enzima a 4°C (geladeira) ou a - 20°C (congelador), por até cento e vinte dias. Como pode ser observado no painel C, existe drástica redução de atividade enzimática já após dez dias de estocagem a 4°C, atividade que é completamente perdida após 30 dias nessa condição. No entanto, a estocagem da enzima a - 20°C (congelador) permitiu que sua atividade fosse mantida a pelo menos cento e vinte dias, tempo máximo analisado.

#### **4.5) Quantificação enzimática de etanol utilizando álcool desidrogenase I de *S.cerevisiae*, purificada a partir de bactéria**

Seguindo o protocolo estabelecido em Gattás et al. (2002), é possível verificar no painel A da Figura 6 que o método de quantificação de etanol apresentou sensibilidade já em 5  $\mu\text{M}$  no tubo de dosagem após 2 minutos de reação, o que equivale a uma solução padrão de etanol de  $2,3 \times 10^{-4}$  g/L.

A quantificação de etanol em diferentes bebidas alcoólicas também foi realizada seguindo o mesmo protocolo apresentado, com a utilização de 0,5 U de 6xHis-Adh1 purificada. Como pode ser observado no painel B da Figura 6, as amostras foram diluídas 2000 vezes e foi observado um desvio máximo de apenas 0,4%, quando comparados com as especificações do produtor.



**Figura1. Clonagem do gene codificador da enzima álcool desidrogenase de *S. cerevisiae* (*ADH1*) no vetor de expressão de bactéria pET28a. (A). Apresentação do mapa do vetor pET28a com seus sítios de restrição. O gene *ADH1* foi inserido entre os sítios *EcoRI* e *XhoI*. (B) Checagem da inserção do gene *ADH1* no vetor pET28a através da análise das digestões dos clones obtidos por gel de agarose. As canaletas 3 e 4 apresentam os clones que liberaram o gene *ADH1* após digestão com *EcoRI* e *XhoI*, confirmando a clonagem. A canaletta 1 apresenta o marcador de tamanho de DNA.**

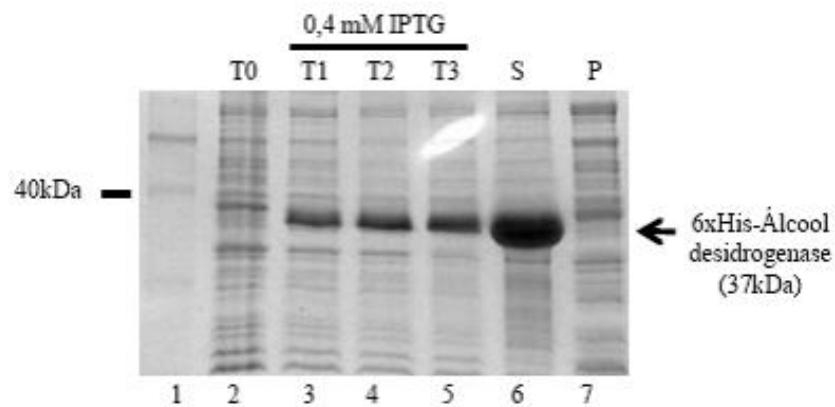
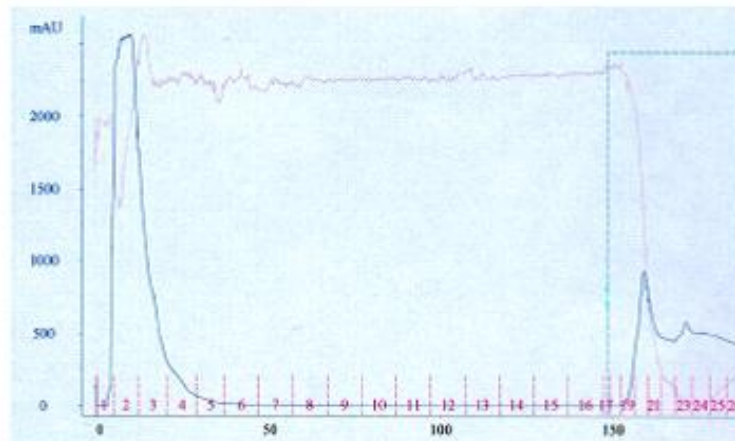


Figura 2. Checagem da produção e solubilidade da enzima álcool desidrogenase de *S. cerevisiae*, produzida em bactéria. Amostras referentes ao teste de produção e solubilidade foram separadas por SDS-PAGE e coradas por Coomassie Blue. Aliquotas da cultura bacteriana antes (canaleta 2) e após indução com 0,4mM IPTG (canaletas 3 a 5). As canaletas 6 e 7 apresentam a proteína no sobrenadante e no precipitado, respectivamente. A seta indica a proteína álcool desidrogenase. A canaleta 1 apresenta o marcador de peso molecular de proteína.

A



B

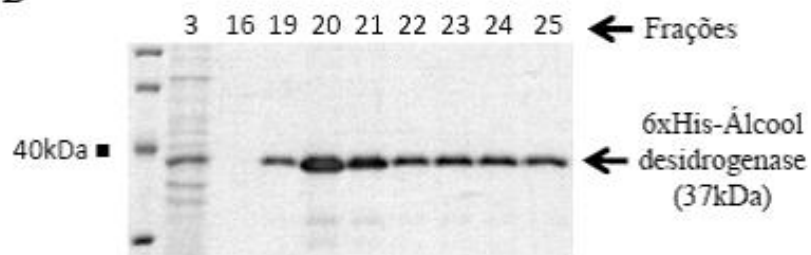


Figura 3. Purificação em larga escala da enzima álcool desidrogenase de *S. cerevisiae*, produzida em bactéria. (A) Cromatograma de purificação de 6xHis-Adh1 em coluna de afinidade carregada com níquel. A linha azul representa a absorbância a 280 nm e a verde a porcentagem do tampão de eluição (contendo alta concentração de imidazol). As frações protéicas estão indicadas em vermelho. (B) Análise das frações coletadas da cromatografia anterior. Amostras foram separadas por SDS-PAGE e coradas por Coomassie Blue. A primeira canaleta contém o padrão de massa molecular de proteína (Invitrogen). A fração 3 contém proteínas não ligadas a coluna (FT = "Flowthrough"), a fração 16 corresponde a última da lavagem da coluna antes da eluição da proteína fusionada a 6 histidinas, apresentada nas frações de 19 a 25.

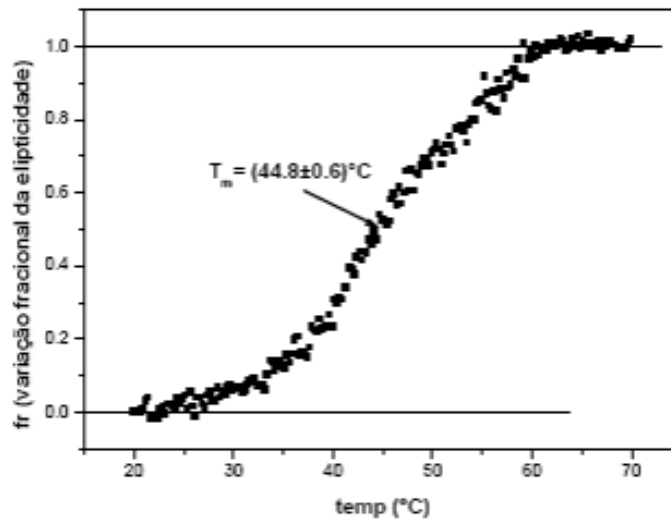


Figura 4. Desnaturação térmica da enzima álcool desidrogenase purificada. Análise da estabilidade térmica da enzima purificada através de alterações na sua elipticidade no comprimento de onda de 222nm, sob variação de temperatura (20°C – 70°C).  $T_m$  corresponde a temperatura de melting, temperatura na qual 50% das moléculas de 6xHis-Adh1 estão desnaturadas e inativas.



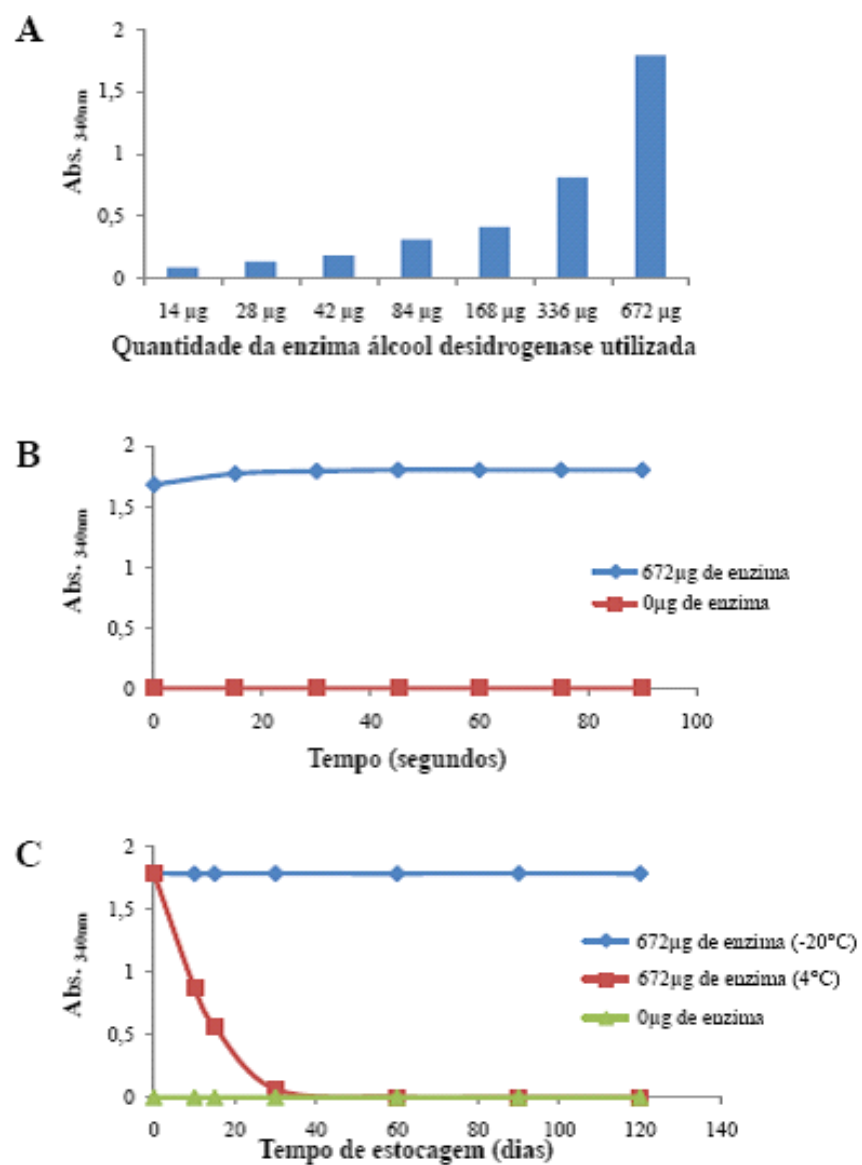
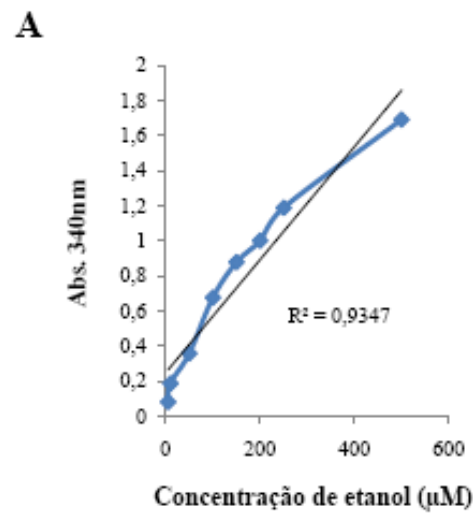


Figura 5. Atividade enzimática da proteína álcool desidrogenase de *S. cerevisiae*, purificada de bactéria. (A) Teste de atividade da enzima purificada em diferentes quantidades. (B) Variação da atividade da enzima com o tempo. (C) Atividade da enzima após diferentes condições de estocagem.



**B**

Amostra	Valor esperado (% Vol.)	Valor encontrado (% Vol.)
Cerveja Brama	4,8	4,8 +/- 0,2
Cerveja Antartica	4,6	4,6 +/- 0,3
Whisky J&L	40	39,5 +/- 0,4
Aguardente Ypióca	39	41 +/- 0,3

**Figura 6. Quantificação enzimática de etanol utilizando álcool desidrogenase de *S.cerevisiae*, purificada a partir de bactéria. (A) Teste de atividade da enzima em diferentes concentrações de etanol. Condição do ensaio: solução tampão (contendo pirofosfato de sódio 0,13 M, semicarbazida 0,079 M e glicina 0,024 M, pH 8,8); NAD<sup>+</sup> 0,015 M; etanol (5 a 500 µM) e a enzima 6xHis-adh1 purificada.  $R^2$  0,9347 (B) Doseamento do etanol presente em diferentes bebidas através da utilização da enzima álcool desidrogenase purificada.**

## 5. CONCLUSÕES

Através da tecnologia do DNA recombinante, foi possível clonar o gene codificador da enzima álcool desidrogenase I de *S. cerevisiae* em um vetor de expressão de bactéria. A proteína álcool desidrogenase I ativa, em fusão com seis histidinas, pôde então ser produzida em larga escala (10 mg de enzima por litro de cultura bacteriana) e purificada pela técnica de cromatografia de afinidade que, além de ser simples e rápida, também apresenta baixo custo.

A enzima obtida apresentou boa atividade biológica *in vitro*, demonstrando sensibilidade na detecção de até  $2,3 \times 10^{-4}$  g/L de etanol em 2 minutos. Essa característica possibilita que a enzima álcool desidrogenase I purificada seja utilizada em um kit rápido e barato de quantificação enzimática de etanol, ferramenta importante na indústria cosmética, alimentícia e de combustível.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADOLPH,H.W.; ZWART,P.; MEIJERS,R.; HUBATSCH,I.; KIEFER,M.; LAMZIN,V. *Biochemistry* 39 (2000) 12885–97.

BEUTLER, H-O. Ethanol. In: BERGMEYER, H. U. *Methods of enzymatic analysis*. 3rd.ed. New York: Academic Press, 1977. v.6, p.598-606.

BRANDEN,C.I; JORNVALL,H.; EKLUND,H.; FURUGEN,B. In: Boyer,P.D. (Eds.), *Enzymes*, Inc New York, 1975, pp. 103-190

COLEMAN,P.L.; WEINER,H. *Biochemistry* 12 (1973) 3466-3472.

FLETCHER, P. J.; STADEN, J. F. Determination of ethanol in distilled liquors using sequential injection analysis with spectrophotometric detection. *Anal. Chim. Acta*, v.499, p.123-128, 2003.

GATTÁS, E.A.L.; TININIS, C.R.C.S.; LALUCE, C. Kit econômico de aplicação na rotina industrial para os ensaios de glicerol, malato e etanol. BR n. PI 0205552, 2002.

JORNVALL,H.; PERSSON,B.; JEFFERY,J. *Eur. J. Biochem.* 167 (1987) 195–201.

KINMAN,J.P.; WELSH,K. *Biochem. Biophys. Res. Comun.* 70 (1976) 878-884.

KITAGAWA, Y.; KITABATAKE, K.; SUDA, M.; MURAMATSU, H.; ATAKA, T.; MORI, A.; TAMIYA, E.; KARUBE, I. Amperometric detection of alcohol in beer using a flow cell and immobilized alcohol dehydrogenase. *Anal. Chem.*, v.63, p.2391-2393, 1991.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: LIMA, U.

A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coord.). *Biotechnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v.3, cap.1, p.1-43.

MARIS, A. J. A. VAN, ABBOTT, D. A., BELLISSIMI, E., BRINK, J. VAN DEN, KUYPE, M., LUTTIK, M. A. H., WISSELINK, H. W., SCHEFFERS, W. A., DIJKEN, J. P. VAN, PRONK, J. T., Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie van Leeuwenhoek* (2006) 90: p. 391-418.

MARGONET, E.; HAYEN, P.; DELFORGE, D.; DELAIVE, E.; REMACLE, J. *Biochem. J.* 287 (1992) 361-365.

MATAIX, E.; LUQUE DE CASTRO, M. D. L. Simultaneous determination of ethanol and glycerol in wines by a flow injection-pervaporation approach with in parallel photometric and fluorimetric detection. *Talanta*. v.51, p.489-496, 2000.

NIEFIND, K.; MULLER, J.; RIEBEL, B.; HUMMEL, W.; SCHOMBURG, D. *J. Mol. Biol.* 327 (2003) 317–28.

NICULESCU, M.; MIELIAUSKIENE, R.; LAURINAVICIUS, V.; CSÖREGI, E. Simultaneous detection of ethanol, glucose and glycerol in wines using pyrroloquinoline quinone-dependent dehydrogenases based biosensors. *Food Chem.*, v.82, p.481-48, 2003.

RACKER, E. Alcohol dehydrogenase from baker's yeast. In: COLOWICK, S.P.; KAPLAN, N.O. (Ed.). *Methods in enzymology*. New York: Academic Press, 1955. v.1, p.500-503.

RASOVSKY, E. M. *Álcool: destilarias*. Rio de Janeiro: IAA, 1973. 384p.

SALIOLA,M.; SHUSTER,J.R.; FALCONE,C. Yeast 6 (1990) 193–204.

SUND.H.; THEORELL,H. In: Boyer,P.D.; Lardy,H.; Mirback,K. (Eds),  
Enzymes, Inc. New York, 1963,pp.25-83.

VEILLON,C.; SYTKOWSKI,A.J. Biochem. Biophys. Res. Comun. 67 (1975)  
1494-1500.

YARITA, T.; NAKAJIMA, R.; OTSUKA, S.; IHARA, T.; TAKATSU, A.;  
SHIBUKAWA, M. Determination of ethanol in alcoholic beverages by high-  
performace liquid chromatography-flame ionization detection using pure water as  
mobile phase. J. Chromatography A. v.976, p.387-391, 2002.

WILLIAMSON,V.M.; PAQUIN,C.E. Mol. Genet. 209 (1987) 371–81.

