

URI – CAMPUS DE ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

PURIFICAÇÃO DE INULINASE DE *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571
PRODUZIDA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO
PRECIPITAÇÃO E ULTRAFILTRAÇÃO

SIMONE MARIA GOLUNSKI

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI – Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Campus de Erechim.

ERECHIM, RS - BRASIL
JULHO DE 2011

**PURIFICAÇÃO DE INULINASE DE *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571
PRODUZIDA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO
PRECIPITAÇÃO E ULTRAFILTRAÇÃO**

Simone Golunski

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

Helen Treichel, D. Sc.
(Orientadora)

Marco Di Luccio, D. Sc.
(Orientador)

Marcio Antonio Mazutti, D. Sc.

Geciane Toniazzo, D. Sc.

Erechim, 08 de julho de 2011.

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DO URI – CAMPUS DE ERECHIM.

*“Muitos dos fracassos da vida
ocorrem com as pessoas que não reconheceram o quão
próximo elas estavam do sucesso quando desistiram.”*

(Thomas A. Edison)

Dedicatória
À minha família,
por todo apoio, dedicação
e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Deixo aqui os meus sinceros agradecimentos as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

À Deus sempre presente em meus dias.

Aos meus pais, Laurindo e Lídia, que sempre me incentivaram, ajudaram e torceram por minhas conquistas.

Aos meus orientadores Helen Treichel e Marco Di Luccio pela confiança, amizade, compreensão, dedicação e diversos ensinamentos na orientação deste trabalho.

À minha irmã Cátia, sempre presente, pela amizade e disponibilidade em me ajudar.

Ao Pablo, por me incentivar e apoiar.

À Naira e Adriana pela ajuda prestada neste trabalho.

As minhas colegas Zuleica e Gabriela, pela sincera amizade, companheirismo e risadas.

As minhas amigas Silvana e Marceli, pela companhia diária e pelos risos que me divertiram, e claro pelos auxílios dados na elaboração deste trabalho.

Aos demais colegas e amigos do Curso de Mestrado em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim: Mara, Sandy, Sheila, Aline, Jamile, Jonaína, Viviane, Chaline, Graci, Dani, Lenir, pelos momentos de alegrias e descontração, e pelas experiências compartilhadas.

Aos professores do curso de química, em especial, Kátia Baggio, Luciana Venquiaruto, Rogério Marcos Dallago, Fábio Penha e Natália Paroul, pela amizade e conselhos que sempre favoreceram para que eu caminhasse sempre adiante no mundo acadêmico.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado que permitiu a realização dos estudos.

A todos que de uma forma ou de outra, contribuíram e incentivaram para a conclusão deste trabalho, o meu muito obrigada!

Resumo da Dissertação ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

**PURIFICAÇÃO DE INULINASE DE *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571
PRODUZIDA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO
PRECIPITAÇÃO E ULTRAFILTRAÇÃO**

Simone Golunski

Julho/2010

Orientadores: Helen Treichel

Marco Di Luccio

O presente estudo investigou o isolamento e purificação da enzima inulinase (EC 3.2.1.7), produzida por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 por fermentação em estado sólido de bagaço de cana utilizando técnicas de precipitação e ultrafiltração. O desempenho da ultrafiltração foi avaliado por sistema de escoamento tangencial e transversal. Membranas comerciais com massa molecular de corte de 30 a 100 kDa foram testadas. Os resultados mostraram que um fator de purificação de 2,82 vezes foi obtido utilizando módulo de escoamento tangencial em uma membrana de 30 kDa. O aumento da força iônica influenciou positivamente o fator de purificação, que aumentou de 1,83-2,90 vezes quando a concentração de 4,5 mol.L⁻¹ de NaCl foi utilizada em célula de escoamento transversal com membrana de 100 kDa. Os efeitos da concentração de etanol e da vazão de adição de etanol ao extrato bruto no rendimento da purificação e do fator de purificação foram avaliados utilizando a técnica de planejamento experimental. A precipitação causou a ativação da enzima e aumentou o fator de purificação em até 2 vezes. Após precipitação com 55 % de etanol adicionado ao extrato a uma vazão de 10 mL/min, seguido por ultrafiltração com membrana de 100 kDa, foi possível se obter um fator de purificação da inulinase de 5,5 vezes.

Palavras-chave: inulinase, purificação, membranas, ultrafiltração, precipitação.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Master in Food Engineering

PURIFICATION OF INULINASE FROM *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 PRODUCED BY SOLID STATE FERMENTATION USING PRECIPITATION AND ULTRAFILTRATION

Simone Golunski

July/2010

Supervisors: Helen Treichel

Marco Di Luccio

The present study investigated the isolation and purification of inulinase (EC 3.2.1.7), produced by solid state fermentation of sugarcane bagasse by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. The enzyme extract was treated by precipitation and ultrafiltration. The performance of ultrafiltration was assessed by a dead-end and a cross flow system. Commercial membranes with molecular weight cut-off 30 kDa and 100 kDa were tested. The results showed that a purification factor of 2.82-fold was obtained using a tangential flow module and 30 kDa membrane. The increase in the ionic strength caused an increase in the purification factor, which increased by 1.83-1.90-fold when the concentration of 4.5 mol.L⁻¹ of NaCl was used in the dead-end module with the 100 kDa membrane. The effect of ethanol concentration and rate of addition of ethanol to the crude enzyme extract were evaluated by experimental design technique. The precipitation caused the activation of the enzyme and purified the inulinase by 2-fold. After precipitation with ethanol 55% added at a rate of 10 mL/min, followed by ultrafiltration with 100 kDa membrane, it was possible to obtain a 5.5-fold purification factor.

Keywords: inulinase, purification, membranes, ultrafiltration, precipitation.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XIV
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 INULINASES.....	5
2.1.2 Produção de inulinase.....	6
2.2 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	11
2.2.1 Precipitação e purificação de proteínas.....	13
2.2.2 Purificação de inulinases	14
2.3 TECNOLOGIA DE MEMBRANAS.....	16
2.3.1 Processo de separação com membranas (PSM).....	17
2.3.2 Composição das membranas.....	21
2.3.3 Características das membranas.....	22
2.3.4 Filtração transversal (dead-end) versus tangencial.....	24
2.3.5 Fenômenos envolvidos no processo.....	25
2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 PRODUÇÃO DE INULINASES.....	28
3.3 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL.....	30

<u>3.4 PRÉ-CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO POR PRECIPITAÇÃO</u>	<u>30</u>
<u>3.4.1 Precipitação com Sulfato de Amônio ((NH₄)₂SO₄)</u>	<u>30</u>
<u>3.4.2 Precipitação com etanol</u>	<u>31</u>
<u>3.5 MEMBRANAS</u>	<u>32</u>
<u>3.6 ADSORÇÃO DA ENZIMA PELA MEMBRANA</u>	<u>33</u>
<u>3.7 ULTRAFILTRAÇÃO</u>	<u>33</u>
<u>3.7.1 Ultrafiltração em célula de escoamento transversal</u>	<u>33</u>
<u>3.7.2 Efeito da força iônica na ultrafiltração</u>	<u>34</u>
<u>3.7.3 Ultrafiltração em sistema tangencial</u>	<u>35</u>
<u>3.8 AVALIAÇÃO DAS ESTRATÉGIAS DE PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS</u>	<u>36</u>
<u>3.9 LIMPEZA DAS MEMBRANAS</u>	<u>37</u>
<u>3.10 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)</u>	<u>37</u>
<u>3.10.1 Preparo das amostras</u>	<u>37</u>
<u>3.10.2 Preparo do gel de resolução 15 %</u>	<u>38</u>
<u>3.10.3 Preparo do gel de empilhamento 12 %</u>	<u>38</u>
<u>3.10.4 Aplicação das amostras</u>	<u>38</u>
<u>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	<u>40</u>
<u>4.1 PRODUÇÃO DE INULINASE</u>	<u>40</u>
<u>4.2 PRÉ-CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO POR PRECIPITAÇÃO</u>	<u>41</u>
<u>4.2.1 Precipitação com sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄</u>	<u>41</u>
<u>4.2.2 Precipitação com etanol</u>	<u>42</u>
<u>4.3 ADSORÇÃO DA ENZIMA PELA MEMBRANA</u>	<u>46</u>
<u>4.4 PURIFICAÇÃO ENZIMÁTICA</u>	<u>47</u>

<u>4.4.1 Ultrafiltração em célula de escoamento transversal.....</u>	<u>47</u>
<u>4.4.3 Efeito da força iônica na ultrafiltração.....</u>	<u>50</u>
<u>.....</u>	<u>50</u>
<u>4.4.4 Ultrafiltração em sistema tangencial.....</u>	<u>51</u>
<u>4.4.6 Precipitação com etanol seguida de ultrafiltração em sistema tangencial .</u>	<u>53</u>
<u>5. CONCLUSÕES.....</u>	<u>56</u>
<u>6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</u>	<u>57</u>
<u>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</u>	<u>58</u>

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS (ADAPTADO DE MULDER (1997)).....18**
- FIGURA 2. ESQUEMA DE MODO DE OPERAÇÃO DE FILTRAÇÃO FRONTAL (DEAD-END) (A) E TANGENCIAL (B). ADAPTADO DE: HABERT ET AL.,(2006).....25**
- FIGURA 3. COMPORTAMENTO DO FLUXO COMO UMA FUNÇÃO DO TEMPO (HABERT ET AL., 2006).....25**
- FIGURA 4. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO BIORREATOR DE LEITO FIXO EMPREGADO NESTE ESTUDO: A- COMPRESSOR; B- UMIDIFICADOR; C – CONTROLE DE VAZÃO, TEMPERATURA E UMIDADE; D – SENSORES DE TEMPERATURA; E – MEDIDOR DE CO₂, TEMPERATURA E UMIDADE.....29**
- FIGURA 5. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA CÉLULA DE UF.....34**
- FIGURA 6. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O RENDIMENTO DA PURIFICAÇÃO DE INULINASE (A) E CURVA DE CONTORNO(B).45**
- FIGURA 7. GRÁFICO DE PARETO PARA OS EFEITOS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS SOBRE O FATOR DE PURIFICAÇÃO.....46**
- FIGURA 8. SDS-PAGE DAS DIFERENTES FRAÇÕES PROTÉICAS OBTIDAS POR PERMEAÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO EM CÉLULA DE ESCOAMENTO TRANSVERSAL. DA ESQUERDA PARA A DIREITA: LINHA 1: MARCADOR DE MASSA MOLECULAR (DE CIMA PARA BAIXO) 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15 E 10 KDA. LINHA 2:**

EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO (KLUYVEROMYCES MARXIANUS). LINHA 3: EXTRATO ENZIMÁTICO COMERCIAL (ASPERGILLUS NIGER). LINHA 4: RETIDO EM MEMBRANA DE 30 KDA. LINHA 5: RETIDO EM MEMBRANA DE 50 KDA. LINHA 6: RETIDO EM MEMBRANA 60 KDA. LINHA 7: RETIDO EM MEMBRANA DE 100 KDA.....49

FIGURA 9. SDS-PAGE DAS DIFERENTES FRAÇÕES PROTÉICAS OBTIDAS POR PERMEAÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO EM SISTEMA TANGENCIAL. DA ESQUERDA PARA A DIREITA: LINHA 1: MARCADOR DE MASSA MOLECULAR (DE CIMA PARA BAIXO) 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15 E 10 KDA. LINHA 2: EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO (KLUYVEROMYCES MARXIANUS). LINHA 3: EXTRATO ENZIMÁTICO COMERCIAL (ASPERGILLUS NIGER). LINHA 4: RETIDO EM MEMBRANA DE 30 KDA. LINHA 5: RETIDO EM MEMBRANA DE 50 KDA. LINHA 6: RETIDO EM MEMBRANA 60 KDA. LINHA 7: RETIDO EM MEMBRANA DE 100 KDA.....53

FIGURA 10. SDS-PAGE DAS DIFERENTES FRAÇÕES DO EXTRATO ENZIMÁTICO: LINHA 1: MARCADOR DE MASSA MOLECULAR (DE CIMA PARA BAIXO) 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15 E 10 KDA . LINHA 2: EXTRATO BRUTO. LINHA 3: EXTRATO ENZIMÁTICO, APÓS PRECIPITAÇÃO COM ETANOL 55 %/10 ML / MIN. LINHA 4: EXTRATO ENZIMÁTICO APÓS PRECIPITAÇÃO COM ETANOL 55 %/10 ML / MIN SEGUIDO POR ULTRAFILTRAÇÃO EM MEMBRANA DE 100 KDA. LINHA 5: EXTRATO ENZIMÁTICO APÓS ULTRAFILTRAÇÃO COM MEMBRANA DE 100 KDA.....55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. RESUMO DE PUBLICAÇÕES REFERENTES À PRODUÇÃO DE INULINASE.....	7
TABELA 2. EXEMPLO DE APLICAÇÕES DOS PSM.....	20
TABELA 3. VARIÁVEIS E NÍVEIS ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2², PARA OTIMIZAÇÃO DA RECUPERAÇÃO ENZIMÁTICA.....	32
TABELA 4. PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DAS DIFERENTES MEMBRANAS UTILIZADAS.....	32
TABELA 5. PRODUÇÃO DE INULINASE POR FES EM BIORREATOR DE LEITO FIXO EM TERMOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM CADA UMA DAS ZONAS DENTRO DO BIORREATOR.....	40
TABELA 6. ATIVIDADE ENZIMÁTICA, PROTEÍNA TOTAL E ATIVIDADE ESPECÍFICA DA INULINASE APÓS PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO NA SATURAÇÃO DE 65 E 20 %.....	41
TABELA 7. MATRIZ DO DCCR 22 (VALORES REAIS E CODIFICADOS) E RESPECTIVAS RESPOSTAS EM TERMOS DE ATIVIDADE ESPECÍFICA, RENDIMENTO DA ATIVIDADE DE INULINASE E FATOR DE PURIFICAÇÃO.	43
TABELA 8. ANOVA PARA O RENDIMENTO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA COMO RESPOSTA PARA O DCCR.....	44
TABELA 9. GRAU DE ADSORÇÃO DA ENZIMA PELAS MEMBRAS DE 30 E 50 KDA.....	47

TABELA 10. RESULTADOS DA ULTRAFILTRAÇÃO DO EXTRATO DE INULINASE EM CÉLULA DE ESCOAMENTO TRANSVERSAL.....	48
TABELA 11. EFEITO DA FORÇA IÔNICA SOBRE A ULTRAFILTRAÇÃO DO EXTRATO DE INULINASE EM CÉLULA DE ESCOAMENTO TRANSVERSAL COM MEMBRANA DE 100 KDA.....	50
TABELA 12. RESULTADOS DE ULTRAFILTRAÇÃO DO EXTRATO DE INULINASE EM SISTEMA TANGENCIAL.....	51
TABELA 13. RESULTADOS DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS ULTRAFILTRADOS EM SISTEMA TANGENCIAL APÓS PRECIPITAÇÃO COM ETANOL.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AMM = Água de Maceração de Milho
- ANOVA = Análise de varância
- ART = Açúcares Redutores Totais
- ASB = Albumina de soro bovino
- AXOS = Arabinoxilooligosacarídeos
- DNS = Ácido 3,5 dinitrosalicílico
- FBA = Fermentação em Batelada Alimentada
- FBS= Fermentação em Batelada Simples

FES = Fermentação em Estado Sólido

FOS = Fruto-oligossacarídeos

FP = Fator de Purificação

kDa = Quilo Dalton

MWCO = *Molecular Weight Cut-Off* (Massa Molecular de Corte)

PSM = Processo de Separação com Membranas

SDS = Dodecil Sulfato de Sódio

TEMED = Tetrametiletilenodiamina

TCA = Ácido Tricloroacético

UF = Ultrafiltração

1. INTRODUÇÃO

Um problema típico de qualquer indústria de transformação seja ela de alimentos, química, ou farmacêutica está na recuperação e purificação dos produtos de interesse. Processos que permitam obter o máximo rendimento com o menor custo são extremamente desejáveis e inúmeras pesquisas têm sido realizadas nas mais diversas áreas de aplicação com este intuito.

A inulinase é uma enzima importante na produção de frutose pela hidrólise enzimática da inulina e principalmente para a obtenção de fruto-oligossacarídeos (FOS). Sua maior aplicação está relacionada à produção de xarope com alto teor de frutose (ETALLIBI e BARATTI, 2001; SANGEETHA *et al.*, 2005).

Frutose e FOS estão emergindo rapidamente como ingredientes importantes na indústria de alimentos e farmacêutica. A frutose é considerada um adoçante alternativo seguro para substituição da sacarose, por demonstrar efeitos benéficos em pacientes diabéticos, aumentando a absorção de ferro em crianças e possui uma maior capacidade adoçante. Os FOS têm propriedades nutricionais e funcionais para uso em dietas de baixas calorias, a estimulação da *Bifidus* e como fonte de fibra dietética na preparação de alimentos (GILL, *et al.*, 2006). Ambos, frutose e FOS, podem ser produzidos por inulinase via hidrólise enzimática da inulina, sendo este último um polímero de frutose encontrado em plantas como a alcachofra de Jerusalém, chicória e dália (VANDAMME e DERYCKE *et al.*, 1983; ZANGH *et al.*, 2004; TREICHEL *et al.*, 2009).

Na produção de enzimas através de processos biotecnológicos, o extrato bruto obtido é composto por uma mistura aquosa de células, produtos extra e intracelulares e ainda substratos e componentes não convertidos. Após a fermentação, dependendo da sua aplicação, são necessárias operações de purificação que devem ser incluídas no custo final do produto. Quanto mais alta a pureza necessária à uma dada proteína, mais custoso é o processo de purificação, que pode representar até 80 % dos custos finais de produção (GHOSH *et al.*, 2003; GALAEV e MATTIASSON, 2001; MORAES *et al.*, 2009).

A eficácia e a economia do processo de purificação frequentemente determinam o destino do produto no mercado. Por exemplo, enzimas utilizadas em detergentes, em síntese orgânica, na indústria têxtil, de couro, polpa e papel, e alimentos, usualmente

não requerem elevados graus de pureza. Por outro lado, proteínas terapêuticas requerem alto nível de pureza (MONDAL *et al.*, 2006). Para minimizar estes custos, a otimização de metodologias rápidas e eficazes para o processo de purificação são de grande importância no desenvolvimento de processos (ISHIHARA e YAMAMOTO, 2005; MORAES e KALIL, 2009).

A técnica mais usada para purificação de proteínas é a cromatografia, a qual é bastante específica, podendo se obter frações bem puras. No entanto, este é um processo difícil de ser escalonado, com baixo rendimento e alto custo. No caso de proteínas para fins não terapêuticos, os altos custos de separação justificam a busca por processos eficientes e mais econômicos. Mesmo no caso das proteínas terapêuticas, existe uma busca na redução de custos, especialmente daqueles produtos que são produzidos em larga escala, como anticorpos monoclonais (PRZYBYCIEN *et al.*, 2004).

Um grande número de processos bem estabelecidos encontram-se disponíveis para as operações de separação em biotecnologia e processamento de alimentos. Destilação, extração líquido-líquido, adsorção, precipitação, filtração são processos comumente encontrados nestes segmentos industriais. Algumas desvantagens dos processos clássicos, como alta demanda energética, alto custo com adsorventes, geração de resíduos e altos custos, impulsionam a busca de alternativas mais eficientes e/ou econômicas (STAUDE, 2000), razão das inúmeras pesquisas envolvendo os processos de separação com membranas nas últimas décadas (LI *et al.*, 2009; TUNG *et al.*, 2007).

Os processos de precipitação com sais e solventes são bastante utilizados em operações de concentração e pré-purificação de proteínas. Muitas técnicas de precipitação envolvem o uso de sulfato de amônio como agente precipitante. No entanto, não existem protocolos que sejam universais e os agentes de precipitação e condições de precipitação devem ser obtidos experimentalmente para cada sistema. Ainda, a elevação da força iônica do meio com a adição de altas concentrações salinas pode provocar a perda de atividade enzimática. Solventes orgânicos também podem ser usados na precipitação de proteínas mas, assim como os sais, podem causar a perda de atividade da enzima, e a adequação deve ser verificada experimentalmente. Poucos estudos sistemáticos sobre o uso de sais e solventes no isolamento e pré-purificação de proteínas podem ser encontrados na literatura (ZHANG *et al.*, 2004; CORTEZ e PESSOA Jr *et al.*, 1999).

Os processos de separação por membranas (PSM) são considerados como uma alternativa mais econômica para a concentração e purificação de proteínas e podem ser ajustados para se conseguir alta produtividade e pureza ao mesmo tempo. São processos físicos de separação baseados na diferença de tamanho ou afinidade entre as substâncias a serem separadas e a membrana. O processo de ultrafiltração é o que mais tem sido testado para a purificação de proteínas (OHTA *et al.*, 2002).

A ultrafiltração (UF) é uma técnica de bioseparação eficiente e facilmente escalonável que apresenta um grande potencial para uso em processos de *downstream* em compostos como proteínas. Embora a concentração de proteínas seja uma operação rotineira e bem sucedida em bioprocessos, o fracionamento ou purificação de proteínas ainda é um desafio tecnológico e necessita de maior esforço de pesquisa, sendo sua eficiência fortemente dependente de parâmetros operacionais como pH, concentração salina, fluxo de permeado, natureza da membrana e hidrodinâmica do sistema (SAXENA *et al.*, 2009).

Atualmente se sabe que a separação baseada apenas no tamanho da molécula não é efetiva em casos onde as proteínas a serem separadas possuem massas molares muito próximas. No entanto, muitos estudos mostram que a manipulação das interações soluto-soluto e soluto-membrana permite a separação de proteínas de massa molar semelhante, utilizando processos de alto desempenho, ainda baseados em separação com membranas (PRZYBYCIEN *et al.*, 2004). As principais razões para o uso de membranas em diferentes processos incluem as suas vantagens clássicas, como a possibilidade de separar moléculas de maneira customizada e barata, qualidade consistente dos produtos, sendo necessárias mínimas intervenções, minimização de danos causados por temperatura, possibilidades de reciclo e pouca geração de efluentes, consumo de energia moderado, baixa perda de carga, minimização de tensões de cisalhamento, ausência de solventes e mudanças de fase (SKELTON, 2000; CUPERUS, 1998; FANE e RADOVICH, 1990).

A literatura apresenta uma escassez de estudos que visem a utilização dos PSM na concentração e purificação de inulinases. A purificação de proteínas por UF, no entanto, ainda é um desafio e necessita de maior esforço de pesquisa, para se obter membranas mais seletivas e otimizar os parâmetros físico-químicos relacionados à interação entre proteínas, que afetam diretamente o fluxo e a seletividade, como o pH e

a concentração de sais. Existe pouco conhecimento do papel de cada soluto que esteja envolvido na separação. A maior parte dos estudos publicados em bioseparações trata de misturas protéicas conhecidas e se baseia em resultados empíricos, dificultando a sua extrapolação para outros sistemas. Nas aplicações reais ou industriais, as soluções de proteínas a serem separadas são muito mais complexas, como no caso da produção de enzimas por fermentação submersa ou em estado sólido, sendo então necessário realizar a avaliação detalhada de cada sistema.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar sistematicamente o isolamento e purificação de inulinases de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 produzidas por fermentação em estado sólido através de estratégias de concentração e fracionamento utilizando processos de precipitação e ultrafiltração.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma revisão bibliográfica sobre as inulinasas, incluindo definição, aplicações, produção e purificação destas enzimas, bem como estudos sobre a concentração e purificação de enzimas utilizando processos de precipitação e ultrafiltração.

2.1 INULINASES

As enzimas são biocatalisadores com propriedades que as tornam altamente requisitadas. Além de serem versáteis, elas catalisam uma série de transformações de modo seletivo, rápido e em condições brandas de reação, o que as difere dos catalisadores convencionais. Outra vantagem na utilização de enzimas é a facilidade em se regular a atividade enzimática, pois para isso basta modificar a natureza do meio de reação, alterar pH ou adicionar suplementos. Além disso, toda enzima catalisa as transformações moleculares sem ocorrência de reações paralelas, comuns em sínteses químicas, devido à sua especificidade (PATEL, 2002; PIZARRO e PARK, 2003).

Inulinasas são 2,1- β -D-frutano-furohidrolases (EC 3.2.1.7), as quais hidrolisam a inulina, um polímero formado por moléculas de frutose com ligações β -2,1, liberando moléculas de frutose (ETTALIBI e BARATTI *et al.*, 2001). A inulinase encontra aplicação na produção de xaropes com alta concentração de frutose e na produção de fruto-oligossacarídeos (FOS), os quais têm assumido grande importância como ingredientes funcionais, devido às suas características de estimular a microflora intestinal, a absorção de minerais, além de melhorar a vida de prateleira e qualidade nutricional dos alimentos (SANGEETHA *et al.*, 2005). Estes oligossacarídeos, portanto, são hoje amplamente utilizados para substituir os açúcares em muitas aplicações em alimentos como em produtos de confeitaria, chocolate e produtos lácteos (GILL *et al.*, 2006).

As inulinasas microbianas são classificadas em exo-inulinasas e endo-inulinasas, de acordo com seu modo de ação. As exo-inulinasas (2,1 β -D-frutano-frutohidrolase; EC 3.2.1.80) são específicas para a hidrólise de inulina e quebram as ligações entre as unidades de frutose que estão localizadas longe das extremidades da rede de polímero,

para a produção de oligossacarídeos. As endo-inulinases (β -D-frutano-frutanohidrolase; EC 3.2.1.7) agem de forma aleatória sobre o acoplamento interno na molécula de inulina, liberando inulo-triose, inulo-tetraose e inulo-pentaose como produtos principais (ETTALIBI e BARATTI, 2001; OHTA *et al.*, 2002; JING *et al.*, 2003; CHI *et al.*, 2009).

A maior aplicação de inulinases está relacionada à produção de xarope com alto teor de frutose. A indústria utiliza-se de grande quantidade de polissacarídeos naturais e novas fontes têm sido procuradas com o intuito de suprir a demanda. A utilização das inulinases apresenta-se como uma alternativa para sua obtenção (CONTIERO, 2004).

O xarope de frutose tem efeitos benéficos em pacientes diabéticos, aumenta a absorção de ferro em crianças, tem elevada capacidade adoçante para poder ser usado na dieta de pessoas obesas, estimula a absorção de cálcio em mulheres pós-menopáusicas, estimula o crescimento de bifidobactérias no intestino grosso e delgado e evita câncer do cólon (ROCHA *et al.*, 2006). A frutose também é amplamente usada em muitos alimentos, medicamentos e bebidas, em substituição à sacarose (GILL *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2009).

2.1.2 Produção de inulinase

As inulinases podem ser obtidas de tubérculos e raízes de plantas que contém inulina, ou através de micro-organismos como bactérias, fungos e leveduras. Dentre as leveduras, aquelas pertencentes ao gênero *Kluyveromyces* têm despertado grande interesse industrial (SCHNEIDER, 1998).

Dentre esses micro-organismos, as leveduras têm sido muito estudadas para a produção de inulinase, pois oferecem vantagens sobre os fungos no processo de fermentação por sua natureza unicelular, facilitando as operações de separação. Os micro-organismos do gênero *Kluyveromyces* têm sido muito utilizados na produção de inulinase por pertencerem ao grupo GRAS (*Generally Recognized as Safe*) e serem aceitos pelo FDA (*Food and Drug Administration*), além de serem retratados como bons produtores de inulinase. Esta designação significa que há poucas restrições na aplicação deste micro-organismo e grande potencial no setor de biotecnologia (LANE e MORRISSEY, 2010). Estes micro-organismos crescem rapidamente atingindo alta

concentração celular em um curto período de tempo, produzindo grandes quantidades da enzima inulinase (HENSING *et al.*, 1994). Nos trabalhos apresentados na Tabela 1 as maiores produções foram alcançadas com este micro-organismo.

Tabela 1. Resumo de publicações referentes à produção de inulinase.

Micro-organismos	Substratos	Formas de Cultivo	Produção	Referências
Bactérias				
<i>Bacillus</i> sp. 11	Inulina, peptona e extrato de levedura	FS	0,4 U/mL	UZUNOVA <i>et al.</i> (2002)
Fungos				
<i>Aspergillus ficuum</i> JNSP5-06	Inulina, extrato de levedura	FS	11 U/mL	JING <i>et al.</i> (2003)
<i>Streptomyces</i> sp. GNDU 1	Inulina, frutose, glicose, sacarose, extrato de levedura, uréia, paptona	FS	0,552 U/mL	GILL <i>et al.</i> (2003)
<i>Streptomyces</i> sp.	Chicória, dália, alho, bagaço de banana, cebola, grãos de trigo e arroz, inulina pura	FS	524 U/L	SHARMA <i>et al.</i> (2006)
<i>Aspergillus niger</i> 20 Osm	Sacarose, extrato de levedura, NaNO ₃	FS	22,1 U/mL	SKOWRONEK <i>et al.</i> (2006)
Leveduras				
<i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 16045	Sacarose, peptona, extrato de levedura	FS	127 U/mL	KALIL <i>et al.</i> (2001)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 16045	Sacarose, extrato de levedura, peptona, K ₂ HPO ₄	FS	176 U/mL	SILVA-SANTISTEBAN <i>et al.</i> (2005)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	Melaço de cana, AMM, extrato de levedura	FS	1300 U/mL	TREICHEL (2004)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	Bagaço de cana, AMM	FES	392 U/g	MAZUTTI <i>et al.</i> (2006)

Tabela 1.
continuação...

<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	Melaço de cana, AMM, extrato de levedura	FS	974 U/mL	MENDES (2006)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> YS-1	Inulina, extrato de carne, CaCl ₂ e SDS-PAGE	FS	55,4 U/mL	SINGH <i>et al.</i> (2007)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	AMM e melaço de cana de açúcar	FS	1317 ± 65 U/mL	TREICHEL <i>et al.</i> (2009)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	AMM e melaço de cana de açúcar	FES	463 U/gds	MAZUTTI <i>et al.</i> (2010)

Atualmente, as inulinasas comerciais são obtidas empregando inulina como substrato, a qual é uma matéria prima de alto valor agregado. Os trabalhos apresentados na Tabela 1 mostram uma forte tendência da substituição da inulina e outros substratos por substratos agroindustriais, visando uma diminuição nos custos de produção da enzima. Dentre os substratos industriais destacam-se os resíduos gerados pelas indústrias de processamento de cana de açúcar e milho, onde o Brasil é conhecido como um dos maiores produtores do mundo.

Durante o processamento do milho e da cana de açúcar são geradas quantidades expressivas de resíduos como bagaço de cana, melaço e água de maceração de milho (AMM), os quais apresentam bom potencial para a aplicação em bioprocessos, incluindo a produção de inulinase (GARCIA, 2002).

Na literatura é possível encontrar vários estudos referentes à produção de inulinase, como é o caso de Kalil *et al.* (2001) que utilizaram a técnica de planejamento fatorial e análise de superfície de resposta para otimizar o meio de cultura para produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus*. Ao invés de inulina, a sacarose foi usada como fonte de carbono. De acordo com os resultados obtidos, as condições ótimas para produção da enzima foram: 14 g/L de sacarose, 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona, 1 g/L de K₂HPO₄ e pH inicial de 3,5. A atividade enzimática nas condições de cultura foi de 127 U/mL, o que representa uma atividade 29 vezes maior do que nas condições anteriormente estudadas por Santos (1998).

Silva-Santisteban e Maugeri (2005) usaram planejamento fatorial e análise de superfície de resposta e otimizaram a produção de inulinase com sacarose como fonte de carbono, obtendo uma atividade de 176 U/mL.

Bender *et al.* (2006) usaram bagaço de cana para a produção de inulinase usando o micro-organismo *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. Foram investigados os efeitos da temperatura de fermentação, umidade inicial do bagaço, concentração de melaço de cana e concentração de água de maceração de milho (AMM), através do uso da metodologia de planejamento de experimentos. A máxima atividade encontrada foi de 445 U/g em 72 horas de fermentação com 23,4 % de AMM (p/p – base seca), 40 °C e umidade inicial de 65 % (base seca). A adição de melaço de cana apresentou efeito negativo para o processo, diminuindo a atividade final. Os autores associam essa queda na atividade à presença de compostos inibidores no melaço de cana, uma vez que esse não foi pré-tratado antes do seu uso na fermentação. Mazutti *et al.* (2006) otimizaram a concentração de AMM e a temperatura do processo de produção de inulinase. Na condição otimizada foi atingida uma atividade de 392 U/gds a 36 °C e verificou-se que a concentração de AMM não apresentou influência na atividade enzimática na faixa entre 13 e 27,1 % em 96 horas de fermentação.

É importante ressaltar que os trabalhos publicados por Bender *et al.* (2006), Mazutti *et al.* (2006) e Treichel *et al.* (2009) usaram resíduos das indústrias de cana de açúcar e milho obtendo as maiores produções de inulinase, quando comparado com os trabalhos de Silva-Santisteban e Maugeri (2005) e Kalil *et al.* (2001) empregando substratos sintéticos. Estes trabalhos demonstraram que a produção de inulinase é economicamente atrativa, devido à alta produção de enzima e o baixo custo e grande disponibilidade desses substratos.

Mazutti *et al.* (2007) avaliaram os efeitos dos parâmetros de processo sobre a produção de inulinase pelo micro-organismo *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 usando bagaço de cana como substrato. Foram investigados os efeitos de tamanho de partícula, densidade de inóculo, concentração de AMM e concentração de farelo de soja. Todos os experimentos foram realizados a 36 °C e 65 % de umidade. A máxima atividade obtida foi de 250 U/gds em meio contendo 20 % de AMM e 5 % de farelo de soja. O uso de farelo de soja reduziu o tempo máximo de fermentação de 96 para 24 horas, o que permitiu um aumento de 2 vezes na produtividade do processo quando

comparado com o trabalho anterior, mesmo com a atividade atingindo valores menores (MAZUTTI *et al.*, 2007).

Xiong *et al.* (2007) otimizaram a concentração da suplementação do farelo de trigo para a produção de inulinase por FES usando uma linhagem nova de *Kluyveromyces* S120. Na condição otimizada, contendo 12,7 % de inulina, 10,8 % de AMM e 1,6 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, foi obtido 410 U/gds de atividade enzimática. Todos os experimentos foram realizados a 30 °C por 72 horas, onde a umidade inicial dos substratos foi corrigida para 80 %. Ayyachamy *et al.* (2007) avaliaram o efeito de diversas fontes de carbono na produção de inulinase por FES usando a bactéria *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli*. Os melhores resultados foram obtidos com o emprego de alho, onde a máxima produção de enzima foi 117 U/gds após 72 horas de fermentação.

Guo *et al.* (2009) investigaram a produção de inulinase por FES usando a levedura *Pichia guilliermondii*, a qual foi isolada de uma alga. A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para a otimização do meio de cultura e das condições operacionais. Após a otimização foi possível obter uma atividade enzimática de 455,9 U/gds após 24 horas de fermentação. As condições operacionais foram definidas como sendo: 60,5 % de umidade inicial dos substratos, 2,5 % de volume de inóculo, 0,42 a razão farelo de trigo/farelo de arroz, 30 °C de temperatura e pH 6,5.

Sheng *et al.* (2009) otimizaram a produção de inulinase por FES usando a levedura *Cryptococcus aureus*, a qual também foi isolada de uma alga. Após o processo de otimização, onde foi empregada a metodologia de planejamento de experimentos e análise de superfície de resposta, foi possível a obtenção de uma atividade enzimática de 420,9 U/gds após 120 horas de fermentação. As condições operacionais foram definidas como sendo: 60,5% de umidade inicial dos substratos, 2,5 % de volume de inóculo, 0,42 a razão farelo de trigo/farelo de arroz, 29 °C de temperatura e pH 5,5.

Treichel *et al.* (2009) otimizaram a produção de inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y- 7571, em fermentação submersa, em meios industriais pré-tratados através da realização de três planejamentos fatoriais completos sequenciais. Verificou-se que a máxima atividade obtida foi de 1294 U/mL, nas concentrações de 150 g/L de melaço, 50 g/L de água de maceração de milho e 6 g/L de extrato de levedura em 72 horas de fermentação.

Mazutti *et al.* (2010) estudaram o crescimento celular e a produção de inulinase por FES com a levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em biorreator de leito fixo. Para isto, foram realizados sete ensaios experimentais para verificar a influência da temperatura e a vazão volumétrica de entrada de ar na dinâmica do processo. Os resultados mostraram que as variáveis afetaram o desempenho do processo significativamente. A melhor condição para produção da enzima foi em temperatura e vazão volumétrica de ar de entrada de 30 °C e 3 m³.h⁻¹, respectivamente, alcançando uma atividade de 463 U/gds. Os resultados obtidos pelos autores mostram que o biorreator de leito fixo é tecnicamente viável para a produção de inulinase.

Astolfi (2010) estudou a produção de inulinase por FES usando estratégias de fermentação batelada simples (FBS) e fermentação batelada alimentada (FBA) em biorreator de leito fixo. Foram realizados estudos preliminares para a produção de inulinase por FBS e FBA em pequena escala e após definido a viabilidade da produção da enzima, foi realizado a produção de inulinase em biorreator de leito fixo. A máxima produção de inulinase foi obtida após 24 horas por FBA com entrada de ar úmido (586±62,6 U/gds), cuja atividade corresponde a uma produtividade obtida de 24,4 U.gds⁻¹.h⁻¹.

2.2 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A separação e purificação de bioprodutos como proteínas, polissacarídeos, vitaminas, antibióticos, aminoácidos, entre outros, constitui uma etapa importante durante o *downstream* nas indústrias de bioprocessamento devido à alta gama de aplicações para estes compostos. Tendo em vista que a grande maioria dos bioprodutos são altamente sensíveis às alterações nas condições operacionais e no meio em que se encontram, as operações de separação e purificação de bioprodutos, neste caso principalmente de proteínas, tornam-se complexas e, assim, requerem muita atenção para que permitam a manutenção da integridade conformacional e funcional das proteínas (SARKAR *et al.*, 2009; LIN *et al.*, 2008; TUNG *et al.*, 2007).

Os aspectos da produção de proteínas devem levar em consideração a aplicação final destas, sendo que quanto mais alta a pureza necessária a uma dada proteína, mais custoso é o processo de purificação. Muitas proteínas precisam ser purificadas antes do

seu uso e essa necessidade de purificação é, em geral, devido a: (i) requerimento de alta pureza; (ii) enriquecimento por concentração; (iii) remoção de impurezas específicas; (iv) prevenção de catálises que não sejam as desejadas (no caso de enzimas); (v) redução da desnaturação; e (vi) melhoria na estabilidade da proteína.

A eficácia e a economia do processo de purificação frequentemente determinam o destino do produto no mercado. Por exemplo, enzimas utilizadas em detergentes, em síntese orgânica, na indústria têxtil, de couro, polpa e papel, e alimentos, usualmente não requerem elevados graus de pureza. Por outro lado, proteínas terapêuticas requerem alto nível de pureza (MONDAL *et al.*, 2006).

As técnicas convencionais de separação como a precipitação, cristalização e centrifugação podem não apresentar boa seletividade na separação. Já as separações de alta resolução como eletroforese, precipitação, eletrodialise, operações de afinidade e cromatografia apresentam seletividades muito altas, o que permite a obtenção de proteínas altamente purificadas, motivo pelo qual são técnicas bastante empregadas em laboratórios de pesquisa. No entanto, estas técnicas possuem alto custo de instalação, manutenção e operação devido à complexa instrumentação requerida, apresentam difícil *scale up* e baixos rendimentos, o que torna seu emprego limitado para produções em larga escala. (HUANG *et al.*, 2009; IBÁÑEZ *et al.*, 2007; SARKAR *et al.*, 2009; YUNOS e FIELD, 2008).

O desenvolvimento de processos de separação que combinem alta seletividade e custo efetivo é uma atrativa e promissora área para pesquisa, uma vez que os custos com separação de proteínas é responsável por aproximadamente 80 % do custo de separação do material total e o mercado de separação de proteínas é estimado em 5 bilhões de dólares até 2011 (LI *et al.*, 2009; TUNG *et al.*, 2007).

Neste contexto, as tecnologias baseadas em membranas, como a ultrafiltração podem ser processos potencialmente atrativos para separação e purificação de proteínas devido este possuir baixo custo, requerer espaço físico compacto, operar em condições amenas (baixa temperatura e pressão, sem troca de fase ou aditivos químicos), as quais minimizam a desnaturação, desativação ou degradação de produtos altamente lábeis, apresentar alta recuperação de produto e ser de fácil *scale up*. O segmento de filtração com membranas para separação de proteínas no mercado americano foi avaliado em US\$ 358 milhões em 2006 com um crescimento estimado de 10,8 % podendo alcançar

US\$ 898 milhões em 2011. (LI *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2007; GHOSH, 2003; YUNOS e FIELD, 2008).

2.2.1 Precipitação e purificação de proteínas

Técnicas de precipitação são normalmente aplicadas como um primeiro passo nos processos de *downstream*. A precipitação pode atuar tanto na concentração como na purificação da molécula-alvo, mas na verdade, a concentração é atingida de forma mais eficaz. Por isso, esta técnica é frequentemente usada nos estágios iniciais das operações de *downstream*, reduzindo o número de estágios posteriores (GLATZ *et al.*, 1990; CORTEZ e PESSOA Jr., 1999). No entanto, em muitos casos, como no caso de enzimas extracelulares, a precipitação é uma forma eficaz de atingir certo grau de purificação (GILL *et al.*, 2006; CUI *et al.*, 2007).

A técnica de precipitação de proteínas com sais é considerada uma ferramenta importante para concentração de proteínas. O processo de concentração promove a separação das proteínas da maioria dos demais compostos do meio, facilitando os processos subsequentes (MARTINS, 2001). A concentração pela adição de sais, como sulfato de amônio, baseia-se no aumento da força iônica, de tal forma que as moléculas protéicas se agregam e precipitam (BORZANI *et al.*, 2001).

Agentes precipitantes industriais de baixo custo, como o etanol, são amplamente produzidos no Brasil e no mundo. O etanol representa o equilíbrio ideal entre o efeito sobre a solubilidade e caráter hidrofílico adequado para reduzir a desnaturação. A precipitação em etanol é uma técnica promissora que pode ser aplicada a diferentes proteínas (CORTEZ e PESSOA Jr., 1999; CUI *et al.*, 2007).

Cortez e Pessoa Jr (1999) realizaram a separação de xilanase e β -xilosidase por precipitação com etanol nas concentrações de 20, 40, 60 e 80 % em diferentes valores de pH (4.6, 5.9, 6.3 e 7.0), a fim de comparar o comportamento de β -xilosidase com o comportamento de xilanase total presentes no meio. A análise de eletroforese demonstrou que as enzimas podem ser seletivamente separadas pela precipitação com etanol de acordo com seus pesos moleculares. Os resultados obtidos neste trabalho (74 % de β -xilosidase e 80 % de recuperação de xilanase total) revelaram que a precipitação com etanol é uma técnica apropriada para a purificação de enzimas produzidas por

Penicillium janthinellum a partir do bagaço de cana. Esta técnica não afetou as características cinéticas da enzima e forneceu uma solução com baixa força iônica, que é desejável para etapas posteriores de purificação.

Swennen *et al.* (2005) estudaram a utilização de ultrafiltração e precipitação com etanol para o isolamento de arabinoxilooligosacarídeos (AXOS) com diferentes estruturas. O fracionamento por precipitação ou ultrafiltração com membranas de diferentes pesos moleculares renderam tanto no grau de polimerização como no grau de substituição. Os autores concluíram que a precipitação com etanol foi eficaz para o isolamento de AXOS com diferentes estruturas a partir de hidrolisado arabinoxilano.

Cui *et al.* (2007) relataram a purificação e caracterização de transglutaminase pela precipitação com etanol seguida por sucessivas etapas de cromatografia em CM-celulose e colunas Sephadex G-75. O resultado deste estudo revelou um rendimento de 85 % e um fator de purificação (FP) de 2 vezes para a precipitação com etanol e um rendimento de 21,1 % e um FP de 30 vezes para as sucessivas etapas cromatográficas, tornando esta enzima interessante para aplicação na indústria de alimentos.

2.2.2 Purificação de inulinases

Na produção de inulinases através de processos biotecnológicos, após a fermentação são necessárias operações de purificação que devem ser incluídas no custo final do produto. Para minimizar estes custos é importante a escolha de métodos de separação e purificação adequados de modo a se obter um bioproduto comercialmente viável.

Dados da literatura revelam que grande parte das purificações realizadas com a enzima inulinase é procedida através de técnicas cromatográficas, como é o caso de Santos (1998) que purificou a enzima inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus* através de precipitação em etanol 70 %, re-suspensão do precipitado em tampão 0,05 M e pH 5,2, e posterior passagem da amostra em coluna de troca aniônica “Q-Sepharose Fast Flow”. A eluição da enzima foi feita com gradiente salino em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,5. Ao final, o fator de purificação foi de 9,2 vezes com uma recuperação de 52 % da enzima.

Makino *et al.* (2005) estudaram a otimização da purificação de inulinase produzida por *K. marxianus* NRRL Y-7571 em meio sintético. Avaliaram a adsorção da resina aniônica Streamline DEAE, onde a isoterma permitiu a determinação da capacidade máxima de adsorção, que foi de cerca de 1428 U/mL, e a constante de dissociação, que foi cerca de 2 U/mL com coeficiente de correlação de 0,96, utilizando tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 6,0. Para o tampão tris-HCl 0,02 M pH 7,5 foram utilizados os mesmos parâmetros, onde foi encontrado 5.000 U/mL para capacidade máxima de adsorção e 0,05 U/mL para um coeficiente de correlação de 0,99. Esses resultados demonstram que o tampão tris-HCl forneceu uma capacidade de adsorção de cerca de 3,5 vezes maior do que as fornecidas pelo tampão fosfato. Purificações realizadas em leito fixo com a finalidade de determinar as condições de eluição com NaCl 0,4 M, mostraram uma recuperação de 79 % da enzima adicionada ao tampão fosfato de sódio 0,02 M pH 6,0, com um fator de purificação de 11,4. No caso do tampão tris-HCl eluídas com NaCl 0,3 M a recuperação foi de 19 % com um fator de purificação de 2,6.

Assim como Santos (1998) e Makino *et al.* (2005) utilizaram mais de uma etapa de purificação, Otha *et al.* (2002) relataram a purificação de inulinase extracelular de *Rhizopus* sp. através de três etapas de purificação. Primeiramente utilizaram ultrafiltração (massa molecular de corte 20.000) seguida posteriormente da técnica cromatográfica DEAE-Cellulofine A-500 e Sephacryl S-200 HR obtendo um fator de purificação de 12 vezes e um rendimento de 0,57 %.

Muitos estudos abordam a precipitação com sulfato de amônio como uma primeira etapa de concentração e purificação da enzima, seguida de cromatografia, como é o caso de Zhang *et al.* (2004) que avaliaram a purificação de inulinase recombinante de *Pichia pastoris* através da precipitação por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ seguida por cromatografia de troca iônica (coluna SP), obtendo um rendimento de 11 % com um fator de purificação de 4,8 vezes. Posteriormente realizaram eletroforese encontrando uma massa molecular de 83 kDa. Gill *et al.* (2006) também utilizaram a precipitação em sulfato de amônio seguida de sucessivas cromatografias em DEAE-Sephacel, Octyl-Sepharose (HIC), Sephacryl S-200, cromatografia de afinidade em colunas ConA-CL Agarose e Sephacryl S-100 para purificar uma exo-inulinase do extrato extracelular de *Aspergillus fumigatus* obtendo uma purificação de 74 vezes com um rendimento de

atividade de 3,2 % a partir do caldo de cultura inicial. Sharna *et al.* (2007) avaliaram a purificação de exo-inulinase de *Streptomyces* sp. a partir do caldo de cultura por precipitação com sulfato de amônio, seguida por sucessivas cromatografias DEAE-Sephacel e colunas ConA-CL Agarose. A enzima foi purificada 18 vezes, com um rendimento de atividade de 4,8 % a partir do caldo de cultura inicial.

Kalil *et al.* (2005) estudaram a purificação da inulinase diretamente do caldo bruto obtida pela fermentação de meio sintético por *Kluyveromyces marxianus var. bulgarius* ATCC 16045, em coluna de leito expandido utilizando a resina STREAMLINE SP obtendo uma recuperação de 74 % e um fator de purificação de 10,4 vezes.

Chen *et al.* (2009) investigaram a purificação de três exo-inulinasas e duas endo-inulinasas a partir do caldo de cultura *Aspergillus ficuum* JNSP5-06 por precipitação em sulfato de amônio, coluna cromatográfica DEAE cellulose, coluna cromatográfica Sepharose CL-6B e eletroforese. As massas moleculares de Exo I, Exo II, Exo III, Endo I e Endo II foram determinados em 70 kDa, 40 kDa, 46 kDa, 34 kDa e 31 kDa respectivamente.

Treichel *et al.* (2009) avaliaram a purificação da enzima inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 através de coluna Streamline 25 com adsorvente Streamline DEAE obtendo um fator de purificação de 7,06 e um rendimento de 91 %. Um fator de purificação de 2,53 vezes e um rendimento de 46,2 % na purificação de inulinase recombinante de *Pichia guilliermondii* através de cromatografia em coluna Ni Sepharose 6 Fast Flow foi encontrada por Zhang *et al.* (2009). Arrizon *et al.* (2010) realizaram a purificação de fructanase produzida por *Kluyveromyces marxianus* através de ultrafiltração com membrana de 100 kDa seguida de coluna Mono Q Sepharose anionic, obtendo uma recuperação de 51 % e um fator de purificação de 12,3 vezes.

2.3 TECNOLOGIA DE MEMBRANAS

Durante as últimas três décadas, as membranas atraíram a atenção de químicos, engenheiros químicos, de alimentos e biotecnólogos, devido a seu princípio de separação único, ou seja, o transporte seletivo e eficiente separação comparada com outras unidades de operação. Membranas têm sido tradicionalmente utilizadas para

espécies de separação de diferentes tamanhos tais como proteínas, caldos de fermentação e separação de componentes de baixa massa molecular (SAXENA *et al.*, 2009).

Uma membrana pode ser definida como uma interface, usualmente heterogênea que age como uma barreira restringindo total ou parcialmente o transporte de espécies moleculares e iônicas, presentes em soluções líquidas ou vapores (SAXENA *et al.*, 2009).

A primeira vantagem para a indústria de alimentos apareceu quando membranas de osmose inversa foram desenvolvidas para a purificação de água, processo conhecido como dessalinização. Após esta aplicação, membranas foram introduzidas em diversos processos convencionais, como por exemplo, concentração pela ultrafiltração ao invés da evaporação. Membranas permitem o desenvolvimento de processos e produtos inteiramente novos. Entre os principais benefícios do uso de membranas na indústria de alimentos, pode-se citar: separação de moléculas e micro-organismos, ausência de dano térmico aos produtos e baixo consumo de energia (HABERT, 2006, SAXENA *et al.*, 2009).

Durante as duas últimas décadas, novos módulos de membranas e sistemas têm sido desenvolvidos especialmente para satisfazer os requisitos da indústria de biotecnologia (SAXENA *et al.*, 2009).

2.3.1 Processo de separação com membranas (PSM)

O que distingue o processo de separação por membranas de outras técnicas de separação é a utilização de uma outra fase, a membrana. Esta fase, sólida, líquida ou gasosa, introduz uma interface entre o volume das duas fases envolvidas na separação e pode originar vantagens de eficiência e seletividade (Mulder (1997)). Um esquema de separação por membranas é apresentado na Figura 1.

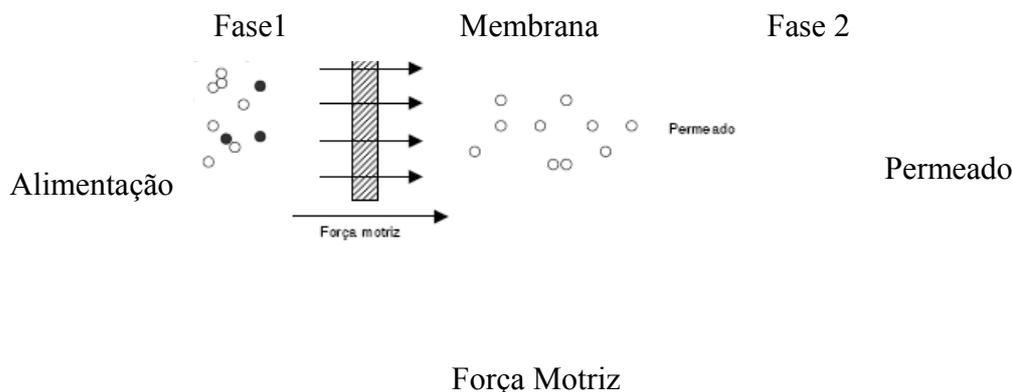


Figura 1. Representação esquemática do processo de separação por membranas (Adaptado de Mulder (1997)).

O uso desta tecnologia para separar, clarificar, purificar e concentrar representa uma das ferramentas mais poderosas da agroindústria da atualidade, e vem sendo muito estudada com o objetivo principal de reduzir os custos de produção (TASSELI *et al.*, 2007).

O meio filtrante ou barreira seletiva (membrana) são utilizadas nos PSM sob a ação de uma força motriz, os quais podem promover a separação de determinados componentes de uma solução ou suspensão. O líquido que permeia através da membrana é denominado de permeado e a fração retida é denominada de concentrado (MULDER, 1997, SCHNEIDER, 2001).

Além da possibilidade de separação de substâncias termolábeis, os PSM apresentam ainda uma série de vantagens que os permite competirem com as técnicas clássicas de separação. Habert *et al.* (2006) apresentam algumas vantagens do processamento utilizando a separação por membranas:

- *Economia de Energia:* Os processos de separação por membranas, em sua grande maioria, promovem a separação sem que ocorra mudança de fase. Neste sentido são processos energeticamente favoráveis.

- *Seletividade*: A seletividade é outra característica importante dos processos de separação com membranas. Em algumas aplicações estes processos se apresentam como a única alternativa técnica de separação.
- *Separação de Compostos Termolábeis*: Normalmente, os processos de separação por membranas são operados à temperatura ambiente, podendo ser aplicados no fracionamento de misturas envolvendo substâncias termossensíveis. Por este motivo eles têm sido amplamente empregados na indústria farmacêutica e de alimentos e, mais recentemente, como uma alternativa na purificação de produtos ou recuperação de células em biotecnologia.
- *Simplicidade de Operação e Escalonamento*: Ao contrário da maioria dos processos de separação, os PSM apresentam, ainda, a vantagem de serem extremamente simples do ponto de vista operacional e em termos de escalonamento (*scale up*).

Os PSM têm sido utilizados nos mais diferentes setores de atividade. Na Tabela 2 são apresentados exemplos dessas aplicações.

A principal vantagem da utilização dos processos de separação com membranas na indústria de alimentos se deve ao fato da separação não requerer a utilização de calor, mudanças de fase ou pH. Assim, separações envolvendo proteínas ou outros compostos termolábeis, como vitaminas são favorecidas, uma vez que se podem preservar nutrientes e constituintes de aroma e sabor, importantes para a qualidade do produto final. No processamento de sucos, por exemplo, a osmose inversa pode ser utilizada para a concentração do suco em lugar da evaporação convencional, eliminando o sabor de “cozido” presente em muitos dos sucos processados industrialmente (MULDER, 2000; HABERT *et al.*, 2006).

Os PSM são considerados como uma alternativa mais econômica e que podem ser ajustados para se conseguir alta produtividade e pureza ao mesmo tempo. O processo de UF é o que mais tem sido testado para a purificação de proteínas.

Tabela 2. Exemplo de aplicações dos PSM

Área	Aplicações
Química	Quebra o azeótropo bezeno/hexano; Recuperação de H ₂ -Síntese da Amônia; Fracionamento CO ₂ /CH ₄ .
Biotecnologia e Farmacêutica	Separação de substâncias termolábeis; Desidratação de etanol; Purificação de enzimas; Fracionamento de proteínas; Esterilização de meios de fermentação; Bioreatores a membrana.
Alimentícia e Bebidas	Concentração de leite; Concentração de soro de queijo; Concentração de suco de fruta; Clarificação e desalcoólização de vinhos e cervejas.
Tratamento de águas	Dessalinização de águas; Eliminação de traços de orgânicos; Tratamento de esgotos municipais; Desmineralização de H ₂ O para caldeiras; Água ultrapura para indústria eletrônica.
Tratamento de Dejetos Industriais	Separação água-óleo; Recuperação de íons metálicos-Couro; Recuperação de proteínas-Laticínio; Tratamento águas-Papel e Celulose.
Medicina	Rim artificial-Hemodiálise; Pulmão artificial-Oxigenadores; Ar enriquecido com oxigênio; Esterelização de soluções injetáveis.

Fonte: Habert *et al.*, (2006).

As membranas de UF possuem diâmetro de poro variando de 1 a 100 nm, o que exige diferenças de pressão através da membrana variando de 2 a 10 bar para que sejam obtidos fluxos permeados suficientemente elevados para que o processo seja industrialmente viável (LIU *et al.*, 2007; SAXENA *et al.*, 2009; HABERT *et al.*, 2006).

Soluções contendo solutos numa ampla faixa de massa molar (10^3 - 10^6 Da) podem ser tratadas pelo processo de ultrafiltração (HABERT *et al.*, 2006). Em biotecnologia, este processo é amplamente utilizado para separações de misturas protéicas onde a relação de massa molar das proteínas é, em geral, menor que 7-10. No entanto, através da otimização das condições operacionais e físico-químicas da UF é possível obter boas separações de proteínas similares (FEINS e SIRKAR, 2004; VAN REIS e ZYDNEY, 2001).

A habilidade de retenção das membranas de UF é definida com base em sua Massa Molecular de Corte (MWCO). Embora esta seja uma escolha arbitrária quando outras condições são consideradas, como a concentração de alimentação, pressão transmembrana, pH, entre outras, o MWCO tem sido adotado pela maioria da comunidade que utiliza UF, uma vez que este fornece um bom ponto de partida (GHOSH, 2003; SAXENA *et al.*, 2009).

Desde o desenvolvimento das membranas de UF nos anos 1960, milhares de membranas diferentes são comercializadas. A maioria das membranas é composta por duas ou mais camadas, sendo uma camada superficial com aproximadamente 10 μm que confere seletividade à membrana, enquanto que as demais de natureza microporosa conferem suporte mecânico, sendo que o tamanho de poro aumenta progressivamente. Sabe-se que as propriedades de separação de membranas porosas também dependem de outras propriedades físicas incluindo porosidade e distribuição do tamanho dos poros (FIELD *et al.*, 2009; GHOSH, 2003).

As membranas de UF têm sido tradicionalmente confeccionadas a partir de uma variedade de polímeros sintéticos como polietersulfona, polisulfona, acetato de celulose e celulose regenerada, por serem quimicamente inertes e termicamente estáveis. Entretanto, estas membranas poliméricas são susceptíveis à degradação química, por soluções de limpeza fortemente ácidas ou alcalinas levando a uma redução significativa na vida útil da membrana. Ainda, algumas membranas poliméricas têm estabilidade mecânica limitada levando a uma redução na permeabilidade a altas pressões (VAN REIS E ZYDNEY, 2001; SAXENA *et al.*, 2009).

Embora a UF tenha sido extensivamente investigada, a purificação de proteínas por UF, no entanto, ainda é um desafio e necessita de maior esforço de pesquisa, para se obter membranas mais seletivas e otimizar os parâmetros físico-químicos relacionados à interação entre proteínas, que afetam diretamente o fluxo e a seletividade, como o pH e a concentração de sais. Existe pouco conhecimento do papel de cada soluto que esteja envolvido na separação. A maior parte dos estudos publicados em bioseparações trata de misturas protéicas conhecidas e se baseia em resultados empíricos, dificultando a sua extrapolação para outros sistemas.

2.3.2 Composição das membranas

Uma grande variedade de materiais pode ser usada no preparo de uma membrana. As membranas baseadas em ésteres de celulose apresentam limites referentes à temperatura (50 °C) e ao pH (3 a 8), baixa resistência ao crescimento microbiano e baixa durabilidade. Membranas mais resistentes podem ser preparadas com polímeros como poliamidas, poliimidas, polisulfonas, poliarilsulfonas, polifluoreto de vinilideno, nylon e policarbonato, entre outros. Estes materiais são mais resistentes que os ésteres de celulose, porém alguns são menos resistentes ao cloro. O uso de membranas inorgânicas tem crescido nos últimos anos. Estas são formadas por óxidos de silício, alumínio, zircônio ou titânio, sendo possível a formação de estruturas microporosas bem variadas, bem como um controle adequado de distribuição de tamanho de poros nas membranas. As membranas inorgânicas suportam altas pressões, soluções com pH entre 0 e 14 e temperaturas superiores a 40 °C. No entanto, estas apresentam baixa plasticidade apresentando grande fragilidade (MULDER, 2000; DI LUCCIO, 1997; JULIANO, 2000).

As membranas sintéticas comerciais, em sua grande maioria, são preparadas a partir de materiais poliméricos com características químicas e físicas variadas. Alguns dos principais materiais poliméricos utilizados no preparo de membranas são: acetato de celulose, polisulfona, polietersulfona, poliacrilonitrila, polieteramida e policarbonato (HABERT, 2006).

De um modo geral, as propriedades mais desejáveis para as membranas são a permeabilidade, seletividade, resistência mecânica, estabilidade térmica e resistência química. Em alguns casos, a escolha do material que compõe a membrana afeta os fluxos e rejeição, devido à adsorção de solutos presentes na alimentação, como por exemplo, proteínas que podem ser adsorvidas em membranas preparadas com materiais hidrofóbicos (MULDER, 2000).

2.3.3 Características das membranas

Algumas características das membranas microporosas são determinantes para se obter a separação desejada como a porosidade, espessura, distribuição de diâmetro de poro e a permeabilidade. Estas características dependem do material e da técnica empregada no preparo da membrana (MULDER, 2000; DI LUCCIO, 1997).

A porosidade consiste na relação entre a parte sólida e os poros da membrana. A porosidade pode ser relativa apenas à parte superficial, ou ainda se referir a toda a membrana, sendo calculada a partir da razão densidade da membrana/densidade do polímero. Quanto maior a porosidade da subcamada, menor será a resistência ao fluxo de solvente através da membrana. Uma maior porosidade superficial não implica necessariamente em redução da rejeição de um determinado soluto, uma vez que o aumento na porosidade pode ser devido ao maior número de poros e não a um aumento em seus diâmetros médios (MULDER, 2000; HABERT *et al.*, 2006)

A resistência das subcamadas pode depender da sua porosidade e de sua espessura. Para membranas com as mesmas características morfológicas, quanto maior a espessura da subcamada, maior a resistência ao fluxo de solvente. As membranas industriais usualmente são depositadas sobre um suporte macroporoso para aumentar a sua resistência mecânica. Esta nova camada acrescenta uma nova resistência às subcamadas, que pode contribuir para a resistência global da membrana (MULDER, 2000; JULIANO, 2000).

A determinação do diâmetro dos poros de uma membrana é fundamental para a sua caracterização. O valor determinado representa a média dos diversos tamanhos desses poros. Esta determinação experimental pode ser feita por meio de Microscópio Eletrônico de Varredura, de porosimetria de mercúrio, de porosimetria de deslocamento de líquido e de uso de soluções de polímeros polidispersos (ZEMAN e ZYDNEY, 1996; RODRIGUES, 2002).

As medidas de permeabilidade permitem quantificar o fluxo de permeado nas condições de operação do processo, bem como avaliar a rejeição da membrana aos solutos de interesse. O fluxo permeado normalmente é expresso em L/m^2h ou kg/m^2h . A permeabilidade pode ser definida como o fluxo de permeado normalizado pela pressão transmembrana. As permeabilidades de água típicas de membranas de osmose inversa são menores que $50 L/m^2h.atm$, de 50 a $500 L/m^2h.atm$ para membranas de UF e acima de $500 L/m^2h$ para membranas de microfiltração. A permeabilidade à água é uma das determinações simples, uma vez que não é destrutiva, e é fundamental na caracterização de uma membrana, servindo como parâmetro de controle, indicando o grau de limpeza e da integridade (DI LUCCIO, 1997; MULDER, 2000).

2.3.4 Filtração transversal (*dead-end*) versus tangencial

A filtração transversal (*dead-end*) é usada na separação de partículas suspensas imiscíveis maiores que 10 μm . Estes processos utilizam o modo de operação frontal, ou seja, o fluido escoar perpendicularmente ao filtro. No caso de uma solução sendo processada em modo frontal, materiais em suspensão são retidos, acumulando-se na superfície do filtro. Trata-se de um processo essencialmente transiente, uma vez que a concentração de sólidos próximos ao filtro aumenta com o tempo. Isto gera um problema: à medida que o processo evolui, os sólidos retidos formam uma camada espessa ou “torta”, tornando o processo bastante lento (DZIEZAK, 1990).

As aplicações de filtração por membranas incluem a separação de solutos dissolvidos e de misturas gasosas. Uma de suas principais características é que, além da operação clássica frontal, podem ser operados em escoamento tangencial. Neste modo de operação, o fluido é escoado paralelamente à membrana enquanto o permeado é arrastado transversalmente à mesma. O escoamento tangencial promove arraste dos sólidos acumulados, minimizando os efeitos indesejáveis do acúmulo de partículas e possibilitando operação do sistema em regime estacionário. Ou seja, o fluxo de permeado pode manter-se constante com o tempo, porém a um valor menor do que o fluxo que o solvente puro teria nas mesmas condições de pressão, temperatura e velocidade de operação. A Figura 2 esquematiza o modo de operação da filtração convencional (fluxo perpendicular) e da filtração tangencial (*cross flow*).

Em processos de filtração tangencial, a parte da solução que não atravessa a membrana (retido ou concentrado) é geralmente recirculada com o objetivo de extrair a maior quantidade possível de permeado e/ou concentrar determinado(s) componente(s) do retido.

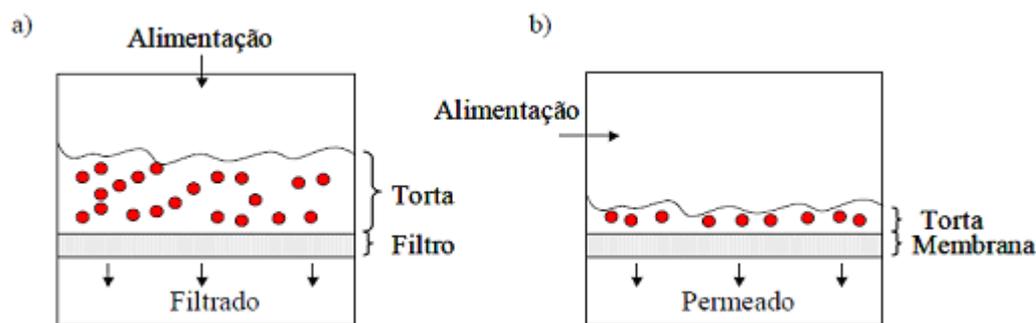


Figura 2. Esquema de modo de operação de filtração frontal (*dead-end*) (a) e tangencial (b). Adaptado de: HABERT *et al.*, (2006).

2.3.5 Fenômenos envolvidos no processo

Para se alcançar uma separação particular via um processo com membrana, o primeiro passo é desenvolver uma membrana apropriada. Entretanto, durante uma separação real em processos movidos pela pressão, o desempenho da membrana pode variar expressivamente com o tempo, sendo que frequentemente se observa um decréscimo do fluxo com o tempo, conforme esquematizado na Figura 3.

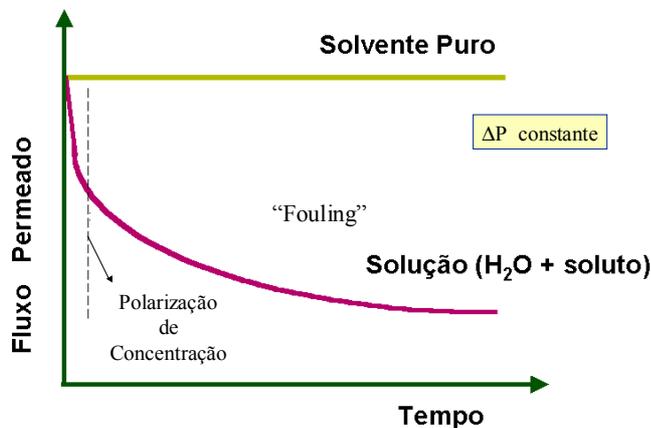


Figura 3. Comportamento do fluxo como uma função do tempo (HABERT *et al.*, 2006).

O declínio do fluxo pode ser causado por diversos fatores, como o fenômeno da polarização de concentração, adsorção de solutos, formação da camada gel e entupimento dos poros. Todos esses fatores induzem à resistências adicionais ao transporte através da membrana. A extensão desse fenômeno é fortemente dependente do tipo de processo com membrana e da solução de alimentação empregada. A escolha

do material é baseada em muitos casos na prevenção do *fouling* e na facilidade de limpeza da membrana durante o uso (MULDER, 2000).

Fouling é um fenômeno no qual a membrana adsorve ou interage de alguma maneira com o soluto da corrente de alimentação, resultando numa diminuição do fluxo e/ou aumento da rejeição de soluto pela membrana. Ao contrário da camada gel polarizada o *fouling* geralmente não é reversível nem dependente do tempo. Como resultado da interação entre a membrana e diversos solutos presentes na solução, ou até mesmo entre solutos adsorvidos na membrana e solutos presentes na corrente de alimentação, o *fouling* pode ser resultado de três fatores principais, ou da interação entre eles: as propriedades do material constituinte da membrana, as propriedades do soluto e os parâmetros operacionais (CHERYAN, 1998; BASSO, 2007).

Costa *et al.* (2006), estudando os mecanismos de *fouling* em ultrafiltração por matéria orgânica natural, observaram que, nos estágios iniciais de filtração, as membranas de ultrafiltração mais permeáveis tiveram uma diminuição no fluxo um pouco mais rápida do que membranas de menor porosidade, quando operando sob o mesmo fluxo inicial de permeado. No caso das duas membranas de acetato celulose, uma de 10 nm e outra de 2 nm de diâmetro de poro, observou-se que o *fouling* foi o mecanismo dominante em relação ao bloqueio dos poros da membrana, no início do processo de UF. No caso de ultrafiltrações mais longas, há uma transição no mecanismo de bloqueio de poro de *fouling* para a formação de uma torta bloqueando os poros da membrana. Esta transição ocorre primeiramente na membrana mais permeável, indicando que a matéria orgânica natural coloidal bloqueia primeiramente os poros da membrana de maior porosidade.

A polarização de concentração consiste em um fenômeno reversível, causado pelo aumento da concentração de solutos rejeitados pela membrana na região próxima à superfície desta. Após certo tempo condições de estado estacionário serão estabelecidas e o acúmulo de soluto ou partículas na superfície da membrana podem afetar o fluxo de permeado de formas distintas. Primeiramente, o soluto acumulado pode gerar um fluxo osmótico contra o gradiente de pressão, reduzindo o fluxo de permeado. Este efeito é mais pronunciado quando se processam solutos de baixa massa molecular, embora algumas proteínas sejam capazes de aumentar o fluxo osmótico em virtude das altas concentrações atingidas na superfície da membrana. A camada de soluto pode ainda

atingir uma concentração tão elevada que promove a formação de uma camada gel, criando uma nova resistência ao transporte. O acúmulo de soluto, transportado até a superfície por convecção mássica, leva à formação de um gradiente de concentração na superfície da membrana, contrário ao gradiente de pressão. O gradiente de concentração provoca o movimento difusivo dos solutos da superfície da membrana para o seio do fluido, aumentando a resistência ao transporte na direção do permeado. Quanto maior a camada de polarização, menor será o fluxo. Nos processos de UF e microfiltração, esse fenômeno é mais acentuado devido aos altos fluxos de solvente. (MULDER, 2000; ZEMAN e ZIDNEY, 1996).

2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base no que foi apresentado neste capítulo, pode-se observar que a purificação de inulinase por processos de separação com membranas (PSM) é uma aplicação com potencial interesse na indústria de alimentos. O isolamento e purificação de proteínas de produtos de biorreatores e outras correntes de processo é uma tarefa reconhecidamente desafiadora em termos técnicos e econômicos. Estudos sobre a utilização de ultrafiltração para a purificação de inulinases de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, não são ainda disponíveis na literatura.

A presente revisão demonstrou o grande potencial de aplicação da precipitação e dos PSM especificamente da UF para a concentração de proteínas, remoção de compostos de baixa massa molar de soluções protéicas, além do fracionamento destas soluções.

Os altos custos do uso de cromatografia utilizada na purificação de proteínas justificam a busca por processos mais eficientes e econômicos, no caso precipitação e PSM. No entanto, estudos aprofundados sobre aplicações dos PSM na purificação de inulinase não foram encontrados na literatura, motivando a proposta do presente trabalho.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentadas as descrições dos materiais utilizados, aparato experimental e os procedimentos adotados para obtenção dos dados experimentais.

3.1 PRODUÇÃO DE INULINASES

O micro-organismo utilizado foi a levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, a qual foi previamente reportada como produtora de inulinase e é pertencente ao grupo GRAS (*Generally Recognized as Safe*) (MAZUTTI *et al.*, 2007). O micro-organismo foi mantido a 4 °C em caldo YM contendo: 3 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 3 g.L⁻¹ de extrato de malte, 5 g.L⁻¹ de peptona, 10 g.L⁻¹ de glicose e 20 g.L⁻¹ de ágar. O meio para o pré-inóculo contém: 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g.L⁻¹ sacarose, 5 g.L⁻¹ de K₂HPO₄, 1,5 g.L⁻¹ de NH₄Cl, 1,15 g.L⁻¹ de KCl e 0,65 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O. Cada tubo de caldo YM foi transferido para um erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio, o qual foi incubado a 30 °C, 150 rpm por 24 horas (MAZUTTI *et al.*, 2007).

O meio sólido usado como substrato em FES para a produção de inulinase foi composto por bagaço de cana suplementado com 15 % (p/p) de melaço de cana pré-tratado, 30 % (p/p) de água de maceração de milho (AMM) e 20 % (p/p) de farelo de soja, cuja composição foi definida em trabalhos anteriores, onde o processo foi conduzido em micro-escala (MAZUTTI *et al.*, 2006; 2007). O bagaço de cana, adquirido numa destilaria artesanal localizada no Município de Marcelino Ramos - RS, foi seco sob temperatura ambiente e triturado mecanicamente, de maneira a uniformizar o tamanho de partículas. A água de maceração de milho (AMM) foi adquirida na Corn Products Internacional – Mogi Guaçu (SP); o melaço de cana foi adquirido na Refinaria Éster – Campinas (SP) e o farelo de soja foi adquirido na empresa Olfar – Erechim (RS). A umidade inicial dos substratos foi corrigida para 65 % conforme otimizada em trabalho anterior (MAZUTTI *et al.*, 2006). O melaço de cana foi pré-tratado preparando-se uma solução 200 g.L⁻¹ em ácido sulfúrico pH 5,0. Esta solução permaneceu em repouso por 24 horas. Após esse período, o pH final foi ajustado para 4,0 com ácido sulfúrico. A solução resultante foi centrifugada a 15000 x g por 15 minutos a 4 °C (SGUAREZI *et al.*, 2008).

As fermentações foram realizadas num biorreator de leito fixo com capacidade útil de 3 kg de bagaço de cana seco. A unidade experimental consiste basicamente de um cilindro metálico (34 cm de diâmetro e 50 cm de altura) conectado a uma linha de ar saturado com água. O umidificador de ar, o qual fornece ar com umidade relativa em torno de 95 %, consiste de um cilindro de PVC disposto horizontalmente antes da entrada do ar no biorreator. Ar seco, fornecido por um compressor de ar, foi bombeado diretamente dentro do umidificador usando um difusor, onde o ar permanecia em contato com a água por um tempo suficiente para que fosse obtido ar úmido nas condições de processo. O ar próximo da saturação, na temperatura de operação, entra na base do biorreator, percorrendo todo o leito, até sua saída no topo. A Figura 4 apresenta um diagrama esquemático do biorreator de leito fixo utilizado no desenvolvimento deste trabalho.

O biorreator foi carregado com 2 kg de bagaço de cana devidamente suplementado. A umidade dos substratos foi corrigida para 65 % (Base seca - p/p) e autoclavado a 121 °C por 15 minutos. As fermentações iniciaram com um volume de inóculo correspondente 14 g de massa inicial de células (MAZUTTI *et al.*, 2010). Todos os experimentos foram conduzidos por 24 horas.

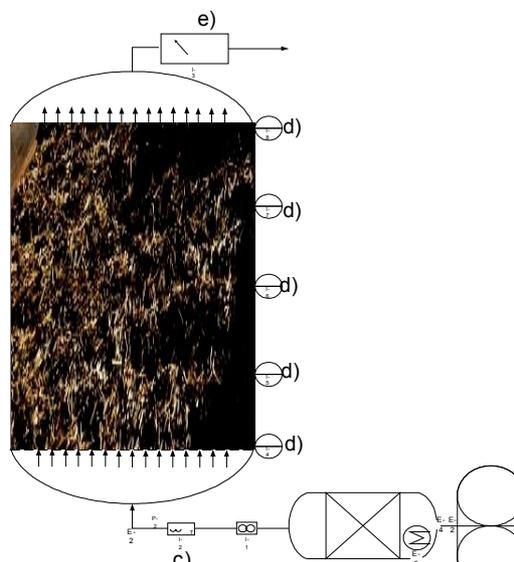


Figura 4. Diagrama esquemático do biorreator de leito fixo empregado neste estudo: a- compressor; b- umidificador; c – controle de vazão, temperatura e umidade; d – sensores de temperatura; e – medidor de CO₂, temperatura e umidade.

Após as fermentações em biorreator de leito fixo, a atividade de inulinase foi determinada em três diferentes alturas do biorreator, com coleta de amostras a 0-10 cm, 10-30 cm e 30-40 cm.

A inulinase foi extraída do meio através da adição de 100 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,8, seguindo com a incubação a 50 °C, 150 rpm por 30 minutos (BENDER *et al.*, 2008). A atividade enzimática foi determinada no sobrenadante, após a filtração dos sólidos conforme item 3.2.

3.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática foi determinada realizando diluição na proporção de 1:10, 1 mL de extrato enzimático pra 9 mL de água de água destilada. Foi adicionado 0,5 mL desta solução diluída em 4,5 mL de uma solução 2 % (p/v) de sacarose em tampão acetato de sódio (0,1 M pH 4,8) a 50 °C (MAZUTTI *et al.*, 2006). A liberação de açúcares redutores totais (ART) foi medida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959). Para cada amostra, foi realizado um branco para corrigir a liberação de açúcares devido à hidrólise não enzimática. Uma unidade de inulinase corresponde à quantidade de enzima que libera 1 µmol de ART por minuto nas condições do ensaio. Os resultados foram expressos em termos de unidades de inulinase por grama de sólidos seco (U/gss).

3.3 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL

A concentração de proteína total foi determinada pelo método de Bradford *et al.* (1976), usando albumina de soro bovino (ASB) como padrão.

3.4 PRÉ-CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO POR PRECIPITAÇÃO

3.4.1 Precipitação com Sulfato de Amônio ((NH₄)₂SO₄)

No intuito de pré-concentrar a enzima, o extrato enzimático foi centrifugado a 5000 rpm por 20 minutos a 5 °C em centrífuga refrigerada. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi utilizado para a recuperação da enzima.

Todas as operações foram realizadas a 5 °C. O ensaio de precipitação foi realizado com a adição de 100 mL de extrato enzimático bruto em béquer de 500 mL, ao qual foi acrescentado sulfato de amônio (Vetec) na saturação de 20 e 65 %. O béquer contendo a referida mistura foi mantido a 5 °C em banho de gelo, com agitação constante, controlando-se o pH em 7,0 com adição de NaOH 20 %. O extrato enzimático acrescido do sal foi transferido para tubos de centrífuga e mantido a (-10 °C) durante 5 h. Transcorrido este tempo, este foi centrifugado (4 °C; 8000 rpm, por 30 minutos), possibilitando a separação da fração protéica. O sobrenadante foi descartado e parte do precipitado foi ressuspensa com quantidade mínima de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 e parte foi ressuspensa com tampão acetato 100 mM pH 4,8. Parte do precipitado ressuspensa com tampão acetato foi dialisado com 2500 mL de tampão acetato 100 mM pH 4,8 por uma noite (SHU *et al.*, 2006, MENONCIN *et al.*, 2008, GILL *et al.*, 2006).

3.4.2 Precipitação com etanol

O extrato enzimático foi centrifugado a 5000 rpm por 20 minutos a 5 °C em centrífuga refrigerada. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi utilizado para a recuperação da enzima.

Inicialmente determinou-se a atividade enzimática do sobrenadante para o cálculo do rendimento. Uma solução aquosa de etanol refrigerada foi adicionada gota a gota, em uma alíquota do extrato bruto a uma taxa de alimentação determinada, utilizando uma bomba peristáltica (Masterflex). A solução do extrato enzimático foi mantida a 5 °C durante todo o processo sob agitação constante. Após a adição de etanol, o precipitado resultante foi centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos a 5° C. O precipitado foi coletado e dissolvido em tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,8 (RISSO *et al.*, 2009). A atividade enzimática e a proteína total foram determinadas em todas as frações conforme procedimento descrito nos itens 3.4 e 3.5. Os efeitos da concentração de etanol e taxa de alimentação (vazão) foram analisados pela técnica de planejamento de experimentos e análise de superfície de resposta utilizando um delineamento composto central rotacional 2² (DCCR), totalizando 11 experimentos.

A técnica de planejamento de experimentos é uma ferramenta estatística que permite determinar as variáveis que exercem maior influência no desempenho de um determinado processo, assim como avaliar possíveis inter-relações entre variáveis de um processo. Além disso, essa ferramenta também permite otimizar o sistema em estudo, com o objetivo de maximizar ou minimizar uma resposta. A principal vantagem da utilização desta ferramenta é a redução do número de experimentos e a consequente redução de custos (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

As faixas de concentração e vazão estudadas estão apresentadas na Tabela 3. Os níveis foram definidos com base em trabalho anteriores do grupo de pesquisa (RISSO *et al.*, 2009). Os resultados foram analisados utilizando o software Statistica 8.0 (Stat Soft Inc. Tulsa, OK, EUA).

Tabela 3. Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo 2², para otimização da recuperação enzimática.

Variáveis Independentes / Níveis	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Concentração de etanol (%)	10	23,1	55	86,9	100
Vazão (mL/min)	0,09	2,97	10	17	19,9

3.5 MEMBRANAS

Para a realização dos processos de separação foram utilizadas membranas planas poliméricas comerciais (Osmonics e Millipore) de diferentes materiais e Massas Moleculares de Corte (*MWCO*). A Tabela 4 mostra as principais características de todas as membranas utilizadas neste trabalho.

Tabela 4. Principais características das diferentes membranas utilizadas.

Classe	Fabricante	Polímero	MWCO ou Retenção
UF	GE-Osmonics	Poliétersulfona	30 kDa
UF	Millipore	Poliétersulfona	50 kDa
UF	GE - Osmonics	Poliétersulfona	60 kDa
UF	GE-Osmonics	Poliétersulfona	100 kDa

Antes de serem utilizadas, todas as membranas foram cortadas ao tamanho da

célula (escoamento transversal ou tangencial), embebidas em etanol por 30 minutos e imersas em água deionizada durante a noite.

3.6 ADSORÇÃO DA ENZIMA PELA MEMBRANA

Este teste foi realizado para verificar o grau de adsorção da enzima pelas membranas. Foram utilizados 2 cm² de membrana de 30 kDa (Osmonics) e 50 kDa (Millipore). Em erlenmeyers de 125 mL foi adicionado 10 mL do extrato enzimático e a membrana a ser testada. Os testes foram realizados em triplicata, sendo que cada erlenmeyer foi mantido a 25 °C sob agitação constante, durante 24 horas. Foram retiradas amostras a cada 8 horas, e o teor de proteína total foi quantificado antes e após cada experimento pelo método de Bradford, realizando-se um ensaio controle sem a adição da enzima.

3.7 ULTRAFILTRAÇÃO

Na purificação dos extratos enzimáticos foram estudadas diferentes estratégias de ultrafiltração sequencial. Nestas estratégias foram avaliadas diferentes membranas comerciais com corte variando de 30 kDa a 100 kDa (Millipore e Osmonics).

A escolha da membrana mais adequada foi realizada baseada em testes preliminares utilizando uma célula de escoamento transversal. A membrana escolhida deve ser aquela que permite o fracionamento da enzima das demais proteínas no extrato, o que foi quantificado por medidas da atividade enzimática e proteína total na alimentação, no retido e no permeado em cada teste.

Antes de iniciar os processos de purificação da enzima, o extrato enzimático foi centrifugado a 5000 rpm por 20 minutos a 5 °C em centrífuga refrigerada. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi utilizado para os testes de purificação.

3.7.1 Ultrafiltração em célula de escoamento transversal

As amostras de extrato enzimático bruto foram submetidas ao processo de ultrafiltração em célula de UF em escoamento transversal, confeccionada em

polipropileno e acrílico com capacidade de 200 mL. A polarização de concentração na superfície da membrana foi minimizada por um mecanismo de agitação composto por uma barra magnética suspensa a 2 mm acima da membrana, posicionada centralmente na célula. A célula foi pressurizada com nitrogênio gasoso comprimido, controlado por um regulador de pressão e monitorado por um indicador ligado a uma das entradas da célula.

Todos os ensaios experimentais foram realizados a uma pressão transmembrana de 1 bar e 5 °C, para evitar a perda de atividade enzimática. A célula de escoamento transversal acondiciona uma membrana de 47 mm de diâmetro. Um diagrama esquemático da célula é apresentado na Figura 5.

- -

Figura 5. Diagrama esquemático da célula de UF.

A atividade enzimática e proteína total foram analisadas em amostras da alimentação, retido e permeado, conforme procedimento descrito nos itens 3.2 e 3.3. Os volumes de cada fração também foram registrados para os cálculos de balanço de massa. Todos os ensaios foram realizados com um fator de concentração volumétrico de 2 vezes, utilizando 100 mL de extrato enzimático bruto em cada ensaio. Todos os ensaios experimentais foram realizados em triplicata.

As membranas testadas foram membranas de UF de poliétersulfona de massa molar de corte de 30 kDa, 50 kDa, 60 kDa e 100 kDa (Millipore e Osmonics).

3.7.2 Efeito da força iônica na ultrafiltração

O efeito da interação soluto-soluto e soluto-membrana foi avaliado por meio da modificação da força iônica do extrato enzimático. Esta modificação foi realizada pela adição de NaCl ao extrato enzimático bruto em diferentes concentrações: 0 %, 0,62 %, 2,5 % e 4,5 % (m/v).

As amostras de extrato enzimático com a força iônica modificada pela adição de diferentes concentrações de NaCl foram submetidas ao processo de UF em célula de escoamento transversal. Todos os ensaios experimentais foram realizados em a 1 bar e 5 °C.

A atividade enzimática e proteína total foram analisadas nas amostras da alimentação, retido e permeado conforme procedimento descrito nos itens 3.2 e 3.3. Os volumes de cada fração também foram registrados para os cálculos de balanço de massa. Os ensaios foram realizados com um fator de concentração volumétrico de 2 vezes. Todos os ensaios experimentais foram realizados em triplicata. A membrana testada foi a membrana de UF de poliétersulfona de massa molecular de corte de 100 kDa (Osmonics), por apresentar melhores resultados na UF com extrato enzimático bruto em escoamento transversal.

3.7.3 Ultrafiltração em sistema tangencial

O escoamento tangencial visa à redução da camada de polarização e, conseqüentemente, o acúmulo de material sobre a membrana, reduzindo a possibilidade de incrustações e o efeito de polarização de concentração.

As amostras de extrato enzimático bruto ou pré-purificado foram submetidas ao processo de UF em sistema experimental de fluxo tangencial, o qual consiste basicamente de um módulo plano de escoamento folha plana, equipado com uma bomba de engrenagem (Micropump, Cole Parmer, Vernon Hills, IL, EUA), fluxômetro rotâmetro (Salvi Casagrande, SP, Brasil) e válvula de contrapressão. Os extratos enzimáticos foram circulados no sistema com controle de temperatura (5 °C) sob banho de gelo, com pressão de um bar em uma vazão de 1 L/min.

A atividade enzimática e proteína total foram determinadas em amostras da alimentação, retido e permeado conforme descrito nos itens 3.2 e 3.3. Os volumes de cada fração também foram registrados para os cálculos de balanço de massa. Todos os

ensaios foram operados com um fator de concentração volumétrica de 4 vezes utilizando inicialmente 400 mL de extrato enzimático bruto ou pré-purificado por precipitação. Todos os ensaios experimentais foram realizados em triplicata.

As membranas testadas foram membranas de UF de poliétersulfona de massa molar de corte de 30 kDa, 50 kDa, 60 kDa e 100 kDa (Millipore e Osmonics).

3.8 AVALIAÇÃO DAS ESTRATÉGIAS DE PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS

Fator de Purificação (FP)

O fator de purificação FP foi calculado pela Equação 1.

$$FP = \frac{A_{esp\ saída}}{A_{esp\ entrada}} \quad (1)$$

Onde: $A_{esp\ saída}$ é a atividade específica de enzima no retido ou no precipitado resuspendido (U/mg); $A_{esp\ entrada}$ é a atividade específica de enzima na alimentação (U/mg) (extrato bruto antes da precipitação ou ultrafiltração).

Recuperação ou rendimento de enzima (RP)

A recuperação da enzima foi calculada pela Equação 2.

$$RP = \frac{[A_{saída} \times V_{saída}]}{[A_{extrato\ inicial} \times V_{inicial}]} \times 100 \quad (2)$$

Onde: $A_{saída}$ é a atividade enzimática no retido ou no precipitado resuspendido (U/mL); $A_{extrato\ inicial}$ é a atividade enzimática na alimentação (U/mL) (extrato bruto antes da precipitação ou ultrafiltração); $V_{inicial}$ é o volume inicial do extrato adicionado em mL;

Retenção (% R)

A retenção da membrana de UF foi calculada em termos de proteína e de atividade utilizando a Equação 3.

$$\%R = \left(1 - \frac{C_p}{C_a}\right) \times 100 \quad (3)$$

Onde: C_p é a concentração do componente no permeado e C_a é a concentração do componente na alimentação.

3.9 LIMPEZA DAS MEMBRANAS

A limpeza das membranas tem como objetivo a restauração do fluxo para o processo subsequente, bem como garantir uma maior vida útil da membrana. Os procedimentos a seguir foram realizados para a lavagem da membrana após seu uso:

1. Recirculação de solução de NaOH 0,1 M por 30 minutos;
2. Enxague com água destilada;
3. Recirculação de tampão fosfato de sódio pH 7 por 30 minutos;
4. Recirculação de solução de ácido fosfórico 0,01 %;
5. Enxague com água deionizada até a neutralização.

3.10 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

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

3.10.1 Preparo das amostras

Primeiramente foi adicionado 40 μ L de ácido tricloroacético (TCA) em 100 μ L das amostras a serem aplicadas no gel, contidas em tubos de centrífuga do tipo *ependorfs*. Esta solução foi armazenada em freezer durante uma noite. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 10000 g, 4 °C por 30 minutos, retirado o sobrenadante, tomando cuidado para que o *pellet* não fosse desfeito. Foi adicionado 100 μ L de uma solução aquosa gelada de acetona 90 %, a fim de lavar o *pellet* sem desfazê-lo, sendo este centrifugado como na etapa anterior. Novamente o sobrenadante foi removido e adicionado mais 100 μ L de acetona 90 % gelada e centrifugado nas mesmas condições, removendo novamente o sobrenadante. O precipitado foi ressuspensionado com

50 μL do tampão da amostra (β -mercaptoetanol). Em seguida, as amostras foram desnaturadas em banho-maria a 100 $^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos.

3.10.2 Preparo do gel de resolução 15 %

Em um béquer foram adicionados 4,925 mL de acrilamida / bis-acrilamida (30:0,8), 5 mL da solução tampão Tris-HCl 0,75 M pH 8,8, 75 μL da solução de persulfato de amônio 10 % e 5 μL de tetrametiletilenodiamina (TEMED). Todos estes componentes foram misturados e transferidos para a célula de eletroforese, deixando aproximadamente 2,5 cm da célula livre, o restante da célula foi completada com água destilada para formar uma linha reta sobre o gel, e deixado-o polimerizar por 40 minutos em temperatura ambiente, após a polimerização do gel a água foi retirada.

3.10.3 Preparo do gel de empilhamento 12 %

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

Depois da completa polimerização do gel de empilhamento (cerca de 30 minutos), o pente foi retirado.

3.10.4 Aplicação das amostras

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

A célula de eletroforese foi acomodada na cuba de eletroforese vertical e preenchida com tampão de corrida (contendo: 14 g de glicina, 1 g de dodecil sulfato de

sódio (SDS), 3 g de Tris base e 1000 mL de água destilada) de modo a cobrir os poços do gel de empilhamento. A cuba foi fechada e ligada a uma fonte de alimentação de energia com corrente constante de 30 A e uma voltagem de 250 V, num tempo de aproximadamente 1 hora para as amostras percorrerem o gel.

Após a corrida, o gel de empilhamento foi removido, e o gel de resolução foi corado com a solução corante *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,1 % durante uma noite. Posteriormente o gel foi descorado com aquecimento em água destilada em micro-ondas até a perfeita visualização das bandas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados dos testes realizados para a produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em FES, concentração e purificação desta enzima por métodos de precipitação e ultrafiltração.

4.1 PRODUÇÃO DE INULINASE

Após a FES em biorreator de leito fixo, a atividade de inulinase foi determinada em três diferentes alturas do biorreator. Em estudos prévios foi verificada diferença de atividade entre as zonas, devido a diferentes temperaturas e umidade entre as mesmas (MAZUTTI *et al.*, 2010). As amostras foram coletadas a 0-10 cm, 10-30 cm, e 30-40 cm e suas respectivas atividades estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Produção de inulinase por FES em biorreator de leito fixo em termos de atividade enzimática em cada uma das zonas dentro do biorreator.

Zonas do biorreator	Atividade U/gss
Superior (30-40 cm)	723,8
Intermediária (10-30 cm)	537,9
Inferior (0-10 cm)	186,3

A máxima produção da enzima inulinase foi obtida na zona superior do biorreator (723,8 U/gss). A produção da enzima aumentou conforme se aumenta a altura do biorreator, isto ocorre devido à existência de ar seco e baixa umidade nas zonas superiores do biorreator. Para a realização dos testes de purificação foi feita uma homogeneização do extrato enzimático de todas as zonas do biorreator.

De acordo com os dados apresentados, as atividades encontradas são comparáveis àquelas obtidas por Xiong *et al.* (2007) que alcançaram atividade máxima de 410 U/gds após 72 h de fermentação utilizando 12,7 % de inulina, 10,8 % de AMM e 1,6 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, e por Mazutti *et al.* (2010) que estudaram a produção de inulinase por FES em bagaço de cana em biorreator de leito fixo, e obtiveram uma atividade máxima de 436 U/gds após 24 horas de fermentação.

4.2 PRÉ-CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO POR PRECIPITAÇÃO

4.2.1 Precipitação com sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Neste estudo foi utilizada a faixa de concentração de 20 e 65 % de saturação com sulfato de amônio. Os resultados obtidos nestas concentrações estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Atividade enzimática, proteína total e atividade específica da inulinase após precipitação com sulfato de amônio na saturação de 65 e 20 %.

Experimentos com saturação 65 %	Atividade (U/mL)	Proteína total (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)
Teste 1 ^a	12,79	0,05	255,8
Teste 2 ^b	1,0	0,28	3,6
Teste 3 ^c	0,48	0,15	3,2
Teste 4 ^d	1,64	0,26	6,4
Teste 5 ^e	7,19	0,03	239,7
Experimentos com saturação 20 %	Atividade (U/mL)	Proteína total (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)
Teste 6 ^f	11,20	0,08	140,0
Teste 7 ^g	0,28	0,10	2,8
Teste 8 ^h	10,71	0,08	133,9

^a Teste 1: extrato enzimático bruto.

^b Teste 2: pH da solução ajustado em 7 e precipitado ressuspendido com tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7.

^c Teste 3: pH da solução ajustado em 7 e precipitado ressuspendido com tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,8.

^d Teste 4: pH da solução sem ajuste (próximo a 4,8) e precipitado ressuspendido com tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,8.

^e Teste 5: diálise por uma noite após precipitação da enzima.

^f Teste 6: extrato enzimático bruto.

^g Teste 7: pH da solução sem ajuste (próximo a 4,8) e precipitado ressuspendido com tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,8.

^h Teste 8: diálise por uma noite após precipitação da enzima.

Após as etapas de precipitação é esperado um aumento da atividade específica, mesmo que este seja pequeno. É interessante notar que houve um decréscimo nas atividades específicas em comparação com o extrato enzimático bruto, este fenômeno pode estar acontecendo pela alta saturação empregada no experimento fazendo com que a proteína se desnature, ocorrendo a perda da atividade.

Como a alta saturação (65 %) pode estar afetando a estabilidade enzimática, decidiu-se testar uma menor saturação de sulfato de amônio (20 %). Como os melhores resultados com sulfato de amônio foram obtidos pela ressuspensão do precipitado com tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,8 e diálise na concentração de 65 % de saturação, somente estes foram avaliados com a concentração de 20 % de saturação. A atividade específica do extrato enzimático bruto foi de 135,8 U/mg. Não houve aumento na atividade específica utilizando 20 % de saturação, sendo que esta, utilizando diálise ainda foi menor que 1 U/mg.

Gill *et al.* (2006) utilizaram precipitação com sulfato de amônio na concentração de 40-80 % de saturação, seguida por diálise na purificação de exo-inulinase de *Aspergillus fumigatus* obtendo um rendimento da atividade de 30 % com um fator de purificação de 5,40 vezes. Através do estudo realizado neste trabalho, é possível concluir que não ocorre recuperação e possível purificação através da precipitação com sulfato de amônio nas concentrações de 20 e 65 % de saturação da enzima inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571.

4.2.2 Precipitação com etanol

A precipitação com etanol foi avaliada utilizando-se um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 , cuja matriz e respectivos resultados estão apresentados na Tabela 7, que apresenta os valores reais e codificados para as variáveis independentes (concentração e vazão de etanol) e as respectivas respostas em termos de atividade específica, rendimento da enzima e o fator de purificação.

Tabela 7. Matriz do DCCR 2² (valores reais e codificados) e respectivas respostas em termos de atividade específica, rendimento da atividade de inulinase e fator de purificação.

Ensaio	Concentração (%)	Vazão (mL/min)	Atividade Específica (U/mg)	Rendimento Atividade (%)	Fator de Purificação (FP)
Enzima bruta	-	-	107,0	100	1,0
1	-1 (23,1)	-1 (2,97)	185,8	93,6	1,7
2	+1 (86,9)	-1 (2,97)	180,9	137,8	1,7
3	-1 (23,1)	+1 (17)	117,6	73,1	1,1
4	+1 (86,9)	+1 (17)	255,2	144,0	2,4
5	-1,41 (10)	0 (10)	115,5	81,1	1,1
6	+1,41 (100)	0 (10)	192,1	152,5	1,8
7	0 (55)	-1,41 (0,09)	85,8	161,8	0,8
8	0 (55)	+1,41 (19,9)	262,9	168,5	2,5
9	0 (55)	0 (10)	212,4	145,6	2,0
10	0 (55)	0 (10)	214,8	142,6	2,0
11	0 (55)	0 (10)	219,0	152,3	2,1

A atividade específica do extrato enzimático bruto foi de 107,0 U/mg. Geralmente é observado um aumento na atividade específica após a precipitação. As maiores atividades específicas foram encontradas no experimento 8 (262,9 U/mg), seguido pelo experimento 5 (255,2 U/mg) e no ponto central (215,4 U/mg). É interessante notar que na maioria dos casos, a recuperação da enzima foi superior a 100 %. Isto sugere que a precipitação remove os inibidores da enzima. A forte ativação da enzima pode ser devido ao alto teor de metais pesados e outros inibidores da enzima típica nos meios de fermentação (PORTO *et al.*, 2008). O maior rendimento médio encontrado foi de 168,5 % no experimento 8. Altos rendimentos também foram obtidos no experimento 7 e nos pontos centrais. O menor rendimento foi obtido nos experimentos 3 e 5, em concentrações mais baixas de etanol, o que sugere que baixas concentrações de etanol são incapazes de separar a enzima de possíveis inibidores presentes no extrato.

Exceto no experimento 7, os demais ensaios renderam FP superior a 1, mostrando que a precipitação pode levar a diferentes graus de purificação. Os maiores fatores de purificação foram obtidos nos experimentos 8, 4 e nos pontos centrais. É interessante notar que neste trabalho foi possível obter maiores fatores de purificação (>

1,5) do que aqueles comumente relatados na literatura para a etapa de precipitação na purificação de enzimas (CUI *et al.*, 2007).

A análise estatística dos dados experimentais permitiu a validação de um modelo empírico para o rendimento da enzima em função da concentração e da vazão de etanol. A Equação 4 apresenta o modelo codificado para a produção de enzima.

$$Y_{CALC} = 146,94 + 27,04 * C - 22,42 * C^2 - 0,62 * V + 1,92 * V^2 + 6,69 * C * V \quad (4)$$

Onde Y_{CALC} é o rendimento da enzima (%), C e V são a concentração e a vazão de etanol, respectivamente.

Os parâmetros da Equação 4 mostram que a concentração de etanol afeta de maneira positiva a recuperação da enzima, demonstrando que um aumento na concentração de etanol, pode ocasionar um aumento na precipitação da enzima. No entanto, convém salientar, que além de certo nível, elevadas concentrações de etanol podem causar perda da atividade da enzima devido à desnaturação. Um estudo sobre a produção de inulinase relatou o uso da concentração de etanol de 70 % como um procedimento adequado, mas não mostrou um estudo sistemático quanto a este aspecto (RISSO *et al.*, 2009). Este fato ressalta a importância desta etapa no presente trabalho.

Para validação do modelo matemático obtido, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 8. O modelo foi validado apresentando um coeficiente de correlação (R) de 0,91 e valor de F calculado maior do que o F tabelado, com 95 % de confiança.

As Figuras 6 (a) e (b) apresentam a superfície de resposta e curva de contorno geradas a partir do modelo validado para a recuperação da enzima. A análise desta, mostra que o rendimento da enzima é mais dependente da concentração de etanol do que a taxa de adição de etanol ao extrato bruto. O efeito de interação entre as duas variáveis independentes avaliadas também foi significativo e maior do que o efeito principal da vazão, mostrando que o processo é bastante complexo, uma vez que a taxa de adição de etanol para o sistema pode aumentar ou diminuir o rendimento da enzima dependendo da concentração do mesmo.

Tabela 8. ANOVA para o rendimento da atividade enzimática como resposta para o DCCR.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	Fcalculado
Regressão	9267,79	5	1853,56	5,16
Resíduo	1794,94	5	358,99	
Total	11062,73	10		

$F_{\text{tab } 5,5, 95\%} = 5,05$

$R = 0,91$

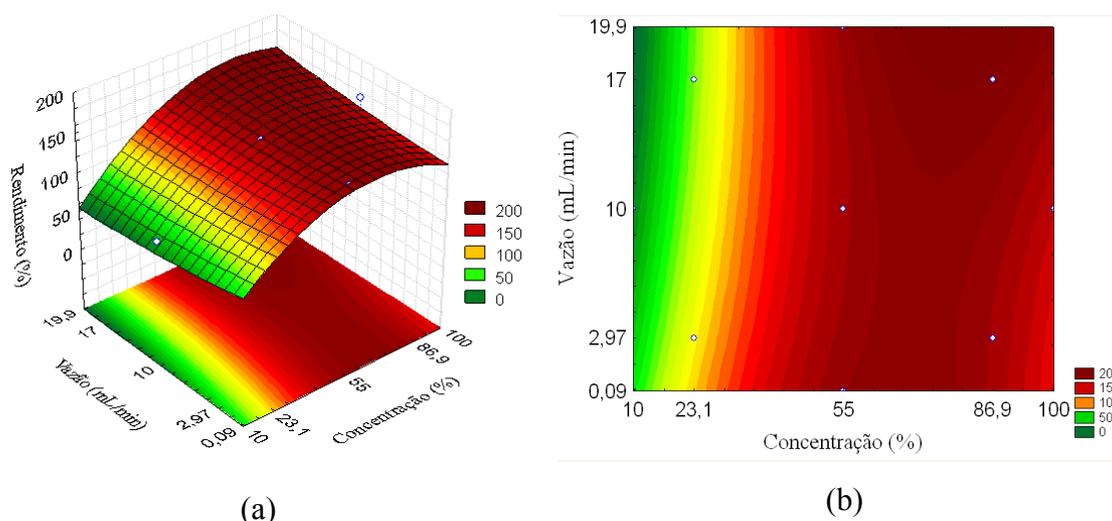


Figura 6. Superfície de resposta para o rendimento da purificação de inulinase (a) e curva de contorno(b).

No presente estudo, optou-se por escolher a concentração de etanol de 55 % e a vazão de 10 mL/min para continuidade do trabalho, uma vez que nesta condição, bons rendimentos da enzima (146,8 %) foram obtidos e do ponto de vista de custos de processo, o mesmo seria mais viável.

A Figura 7 apresenta o gráfico de Pareto com os efeitos estimados das variáveis independentes avaliadas na resposta fator de purificação.

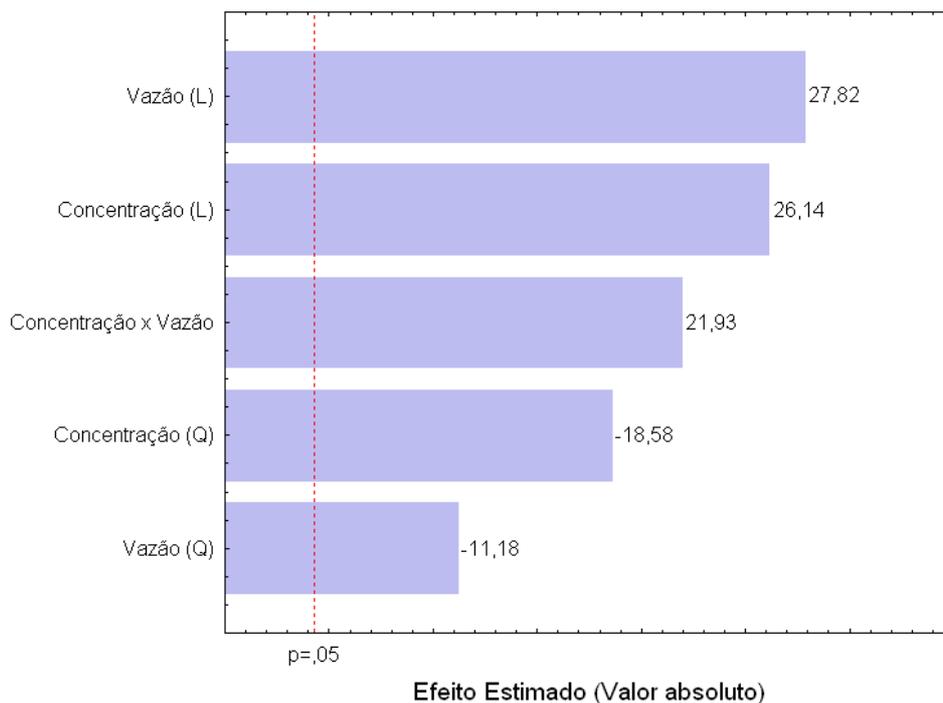


Figura 7. Gráfico de Pareto para os efeitos das variáveis estudadas sobre o fator de purificação.

Uma análise da Figura 7 permite verificar que tanto a vazão quanto a concentração de etanol apresentam efeitos positivos e de similar grandeza no fator de purificação ($p < 0,05$). Novamente, a interação entre as duas variáveis também apresentou um efeito positivo, o que aumenta a complexidade da análise de ambos os efeitos, ou seja, se uma variável tem seu nível aumentado, enquanto a outra é reduzida, o FP também pode diminuir. Os efeitos da vazão no fator de purificação podem estar diretamente relacionados com a taxa de precipitação da enzima. Se a vazão e concentração de etanol são muito baixas, a taxa de precipitação é baixa e a enzima talvez não precipite. Se o fluxo e a concentração de etanol são muito altos, alguns dos inibidores de proteínas podem ser arrastados com a enzima, o que pode diminuir o FP. Além disso, o excesso de álcool pode causar a desnaturação da enzima.

4.3 ADSORÇÃO DA ENZIMA PELA MEMBRANA

Visando verificar o grau de adsorção da enzima pelas membranas foram realizados os ensaios apresentados na Tabela 9. Os valores referem-se a médias de triplicatas e respectivos erros padrão. Os resultados foram submetidos a análise de

variância seguida de teste de Tukey com comparação realizada de 2 maneiras distintas: comparação entre os tempos na mesma membrana, e após verificação se havia diferença entre as membranas de uma forma global, foi realizada uma comparação tempo a tempo entre as duas membranas. Pode-se concluir que não houve diferença estatisticamente significativa entre os tempo de amostragem utilizando-se ambas as membranas. Comparando os tempos e as membranas utilizadas, foi observada diferença e assim, comparando-se por tempo entre as membranas, pode-se concluir que somente no tempo de 24 horas houve diferença, mostrando que a adsorção pode ser considerada desprezível.

Tabela 9. Grau de adsorção da enzima pelas membranas de 30 e 50 kDa.

Tempo (h)	Membranas (kDa)	
	30	50
0	0,11 ^{aA} ±0,01	0,11 ^{aA} ±0,01
8	0,11 ^{aA} ±0,02	0,12 ^{aA} ±0,01
16	0,11 ^{aA} ±0,01	0,12 ^{aA} ±0,01
24	0,09 ^{aA} ±0,01	0,14 ^{aB} ±0,01

*letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey na coluna e letras maiúsculas iguais não diferem entre si na linha (p<0,05).

4.4 PURIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

A concentração e purificação do extrato enzimático de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 foi realizada pelo processo de UF, visando a retenção das proteínas do extrato e eliminação de substâncias indesejáveis de baixa massa molar. Os extratos enzimáticos foram submetidos à concentração e ao fracionamento utilizando diferentes estratégias de UF detalhadas e discutidas a seguir.

4.4.1 Ultrafiltração em célula de escoamento transversal

Os resultados da concentração e fracionamento do extrato enzimático obtido por FES em célula de escoamento transversal são apresentados na Tabela 10. Os resultados são médias de triplicatas e o erro experimental foi sempre inferior a 5 %.

Tabela 10. Resultados da ultrafiltração do extrato de inulinase em célula de escoamento transversal.

Resultados / Membranas	30 kDa	50 kDa	60 kDa	100 kDa
Perda Volumétrica (mL)	2	3	2,67	1,67
Recuperação Total da Enzima %	103,94	102,46	97,34	143,54
Recuperação da Enzima no Retido %	102,54	100,06	96,31	140,14
Recuperação da Enzima no Permeado %	1,40	2,40	1,03	3,40
Fator de Purificação Baseado no Retido	1,46	1,56	1,48	1,83
Fator de Purificação Baseado no Permeado	0,12	0,11	0,06	0,11
Retenção da Atividade %	97,20	95,21	97,94	92,86
Retenção da Proteína %	76,34	56,05	65,24	41,32
Fator de Concentração Volumétrico	2,08	2,13	2,11	2,07
Fator de Concentração da At Enzimática	2,14	2,13	2,03	3,22
Fator de Concentração da Ptn Total	1,46	1,36	1,38	1,59
Recuperação da Proteína no Retido %	70,03	64,03	65,14	77,27
Recuperação da Proteína no Permeado %	11,83	21,98	17,38	29,34
Recuperação da Proteína Total %	81,86	86,01	82,52	106,61

Os resultados de recuperação da proteína foram sempre inferiores a 100 %, sugerindo que ocorre perda de proteínas na membrana, possivelmente devido à formação da camada de gel na superfície desta (GHOSH e CUI, 2000). No entanto, é interessante notar que os resultados de recuperação total da atividade foram superiores a 100 % para as membranas de 30 kDa, 50 kDa e 100 kDa. Esse comportamento sugere que os inibidores podem ter sido removidos no processo, o que levaria à ativação da enzima.

A retenção de proteína total seguiu a tendência esperada de diminuição de retenção com o aumento do MWCO, exceto para a membrana de 50 kDa, que apresentou uma retenção menor que a esperada. Uma vez que esta membrana foi obtida de um fornecedor diferente (Millipore) das membranas de 30 kDa, 60 kDa e 100 kDa (Osmonics), as retenções observadas podem variar dos valores nominais, devido a variações na produção da membrana e nos métodos de determinação do corte. A retenção da atividade foi alta (> 90 %) para todas as membranas, indicando que a enzima é uma proteína de alta massa molecular ou um agregado de proteínas. Além

disso, a camada de incrustação na superfície da membrana também pode atuar como uma membrana dinâmica, aumentando a retenção. Como resultado da maior retenção, o fator de purificação (FP) do permeado foram baixos, enquanto o FP calculado para o retido foram superiores a 1. O maior FP foi obtido com a membrana de 100 kDa, mostrando seu potencial para fracionar a inulinase de proteínas inativas.

O gel SDS-PAGE das frações apresentadas na Tabela 10 é mostrado na Figura 8. Uma pequena variação no perfil de proteína pode ser observada quando o extrato bruto (coluna 2), em comparação com os demais tratamentos, mesmo quando um maior fator de purificação foi obtido (FP = 1,83, coluna 7). A concentração global das proteínas do extrato foi observada quando as amostras passaram por UF, mesmo as proteínas de baixa massa molecular parecem estar concentradas. Isto pode ser devido à polarização de concentração e *fouling*, fenômeno que ocorre na superfície da membrana. As proteínas que são retidas pela membrana podem formar uma camada de gel na superfície da membrana, que atua como uma segunda membrana dinâmica, aumentando a retenção de proteína, como já observado por outros autores (GHOSH e CUI, 2000).

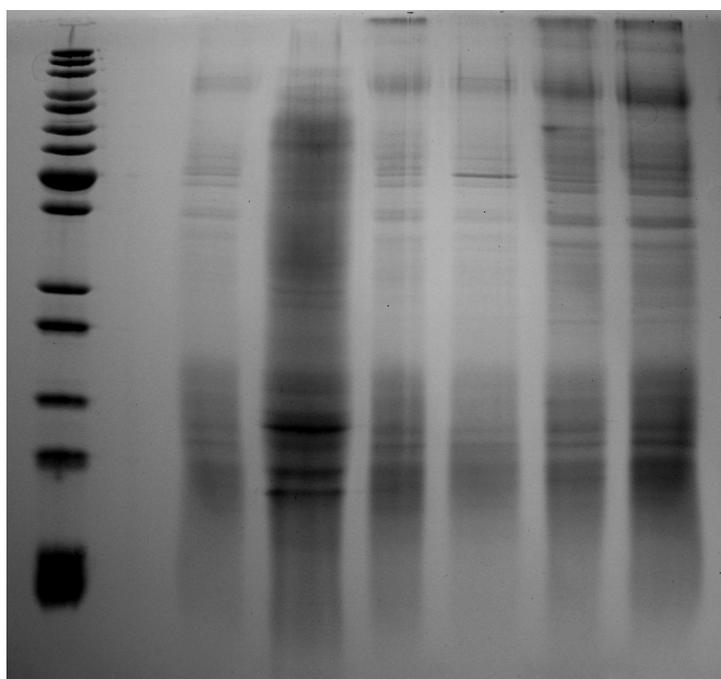


Figura 8. SDS-PAGE das diferentes frações protéicas obtidas por permeação de extrato enzimático em célula de escoamento transversal. Da esquerda para a direita: Linha 1: marcador de massa molecular (de cima para baixo) 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50,

40, 30, 25, 20, 15 e 10 kDa. Linha 2: extrato enzimático bruto (*Kluyveromyces marxianus*). Linha 3: extrato enzimático comercial (*Aspergillus niger*). Linha 4: retido em membrana de 30 kDa. Linha 5: retido em membrana de 50 kDa. Linha 6: retido em membrana 60 kDa. Linha 7: retido em membrana de 100 kDa.

4.4.3 Efeito da força iônica na ultrafiltração

O efeito da força iônica na permeabilidade foi avaliada pela adição de diferentes concentrações de NaCl no extrato bruto e os resultados estão apresentados na Tabela 11.

É interessante notar que o aumento da concentração de NaCl causou uma diminuição na recuperação total da atividade e também na recuperação de proteína total. Por outro lado, a manutenção da atividade e proteína total aumentou, assim como o FP. Outros autores também observaram um aumento na retenção de proteínas com o aumento na força iônica como a albumina de soro bovina (ASB), lisozima (LYS) e hemoglobina (BECHT *et al.*, 2008; TENG *et al.*, 2006; LIN *et al.*, 2008).

Tabela 11. Efeito da força iônica sobre a ultrafiltração do extrato de inulinase em célula de escoamento transversal com membrana de 100 kDa.

Resultados / Concentrações	Concentração de NaCl (mol/L)			
	0 %	0,62 %	2,5 %	4,5 %
Perda Volumétrica (mL)	1,67	2	5	1
Recuperação Total da Enzima %	143,54	101,39	85,33	89,43
Recuperação da Enzima no Retido %	140,14	97,95	83,36	87,66
Recuperação da Enzima no Permeado %	3,40	3,44	1,97	1,78
Fator de Purificação Baseado no Retido	1,83	1,48	2,41	2,90
Fator de Purificação Baseado no Permeado	0,11	0,23	0,25	0,22
Retenção da Atividade %	92,86	93,12	96,06	96,45
Retenção da Proteína %	41,32	70,21	84,21	83,78
Fator de Concentração Volumétrico	2,07	2,08	2,22	2,04
Fator de Concentração da At Enzimática	3,22	2,04	1,85	1,79
Fator de Concentração da Ptn Total	1,59	1,38	0,77	0,62
Recuperação da Proteína no Retido %	77,27	66,03	34,65	30,26
Recuperação da Proteína no Permeado %	29,34	14,90	7,90	8,11
Recuperação da Proteína Total %	106,61	80,92	42,55	38,38

Em misturas de proteínas, interações de soluto não dependem apenas da magnitude da carga superficial, mas também na espessura da dupla camada elétrica. A adição de NaCl reduz a espessura da dupla camada elétrica e, portanto, reduz a atração

eletrostática de algumas proteínas, reduzindo seu tamanho e aumentando a permeabilidade das membranas (BECHT *et al.*, 2008; LIN *et al.*, 2008). Neste caso, as proteínas não ativas podem ter sua permeabilidade aumentada pela adição de NaCl, o que levou a um maior fator de purificação.

4.4.4 Ultrafiltração em sistema tangencial

Os resultados da concentração e fracionamento do extrato enzimático obtido por FES em sistema tangencial são apresentados na Tabela 12. Os resultados são médias de triplicatas e o erro experimental foi sempre inferior a 5 %.

Tabela 12. Resultados de ultrafiltração do extrato de inulinase em sistema tangencial.

Resultados / Membranas	30 kDa	50 kDa	60 kDa	100 kDa
Perda Volumétrica (mL)	3,50	3,50	2	8,3
Recuperação Total da Enzima %	98,71	96,01	93,93	79,51
Recuperação da Enzima no Retido %	95,61	92,54	91,30	76,19
Recuperação da Enzima no Permeado %	3,11	3,48	2,62	3,32
Fator de Purificação Baseado no Retido	2,82	2,68	2,53	1,99
Fator de Purificação Baseado no Permeado	0,08	0,09	0,05	0,03
Retenção da Atividade %	95,87	95,37	96,50	95,18
Retenção da Proteína %	43,82	43,36	36,21	42,50
Fator de Concentração Volumétrico	4,21	4,15	4,08	3,65
Fator de Concentração da At Enzimática	4,03	3,84	3,73	2,78
Fator de Concentração da Ptn Total	1,43	1,43	1,41	1,39
Recuperação da Proteína no Retido %	33,99	34,51	36,07	38,32
Recuperação da Proteína no Permeado %	42,14	42,49	47,84	40,44
Recuperação da Proteína Total %	76,12	76,99	83,91	78,77

Novamente, a recuperação da atividade foi maior no retido que no permeado, indicando alta retenção da enzima, o que é confirmado pelos resultados da retenção de atividade. Os valores de recuperação da atividade no retido foram menores no sistema tangencial do que os obtidos na célula de escoamento transversal. Este fato pode ser devido à perda de atividade enzimática causada pela tensão de cisalhamento devido ao bombeamento do extrato enzimático, através do sistema. Outras investigações serão necessárias para elucidar este comportamento.

A recuperação global da proteína total (permeado + retido, média = 79 %) foi menor do que as recuperações obtidas na célula de escoamento transversal (média = 87 %). Embora estes resultados pareçam bastante promissores, este comportamento pode

ser explicado pelas diferentes incrustações entre os dois sistemas. Becht *et al.* (2008) mostraram que o sistema de fluxo tangencial pode apresentar baixa mistura de solutos em comparação com a mistura em células de escoamento transversal, o que aumenta a concentração de soluto junto à superfície da membrana, resultando em menor rejeição de soluto observada. Portanto, a polarização de concentração foi mais acentuada no sistema tangencial em comparação com o sistema de escoamento transversal, aumentando assim as perdas de proteína na superfície da membrana.

Como resultado, as retenções de proteína total observadas foram inferiores em módulo de sistema tangencial e maiores fatores de purificação foram obtidos. O comportamento do FP com o MWCO seguiu uma tendência inversa, quando comparado com a célula de escoamento transversal, ou seja, o maior FP foi obtido com a membrana de 30 kDa (2,82). Este resultado pode estar relacionado com a discussão anterior sobre a polarização da membrana, que diminuiu a retenção. Proteínas contaminantes podem ser mais permeáveis do que a enzima e, portanto, aumenta o FP, quando aumenta o MWCO, a permeação de inulinase também aumenta, causando a perda no desempenho da purificação.

O gel SDS-PAGE das frações apresentadas na Tabela 12 é mostrado na Figura 9. Foi observada uma pequena variação no perfil de proteína do extrato bruto (linha 2) em comparação com os demais tratamentos. Uma comparação com um extrato enzimático comercial foi realizada (linha 3 da Figura 9) e mostra que o extrato comercial não tem um elevado grau de pureza conforme o esperado.

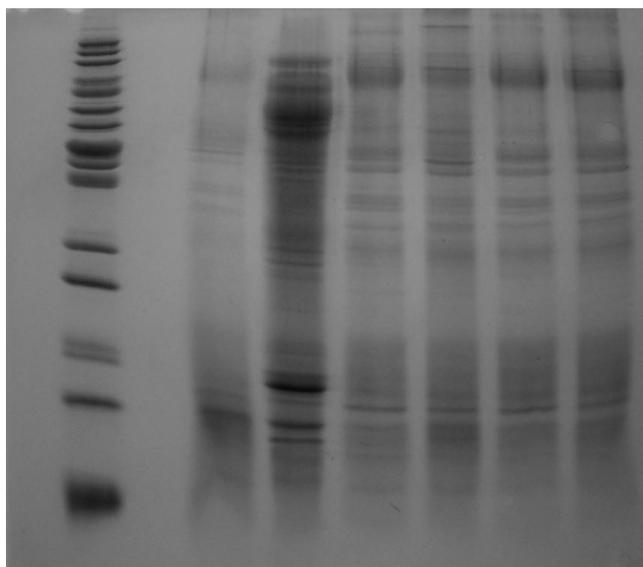


Figura 9. SDS-PAGE das diferentes frações protéicas obtidas por permeação de extrato enzimático em sistema tangencial. Da esquerda para a direita: Linha 1: marcador de massa molecular (de cima para baixo) 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15 e 10 kDa. Linha 2: extrato enzimático bruto (*Kluyveromyces marxianus*). Linha 3: extrato enzimático comercial (*Aspergillus niger*). Linha 4: retido em membrana de 30 kDa. Linha 5: retido em membrana de 50 kDa. Linha 6: retido em membrana 60 kDa. Linha 7: retido em membrana de 100 kDa.

4.4.6 Precipitação com etanol seguida de ultrafiltração em sistema tangencial

A Tabela 13 apresenta os resultados das frações enzimáticas obtidas após a UF dos extratos enzimáticos precipitados com etanol na concentração de 55 % e uma vazão de 10 mL/min.

Tabela 13. Resultados dos extratos enzimáticos ultrafiltrados em sistema tangencial após precipitação com etanol.

Resultados / Membranas	30 kDa	50 kDa	60 kDa	100 kDa
Perda Volumétrica (mL)	5	8	3	10,50
Recuperação Total da Enzima %	103,40	87,48	74,16	68,79
Recuperação da Enzima no Retido %	102,87	87,02	73,36	68,04
Recuperação da Enzima no Permeado %	0,53	0,46	0,80	0,75
Fator de Purificação Baseado no Retido	5,31	3,04	3,73	5,53
Fator de Purificação Baseado no Permeado	0,01	0,01	0,02	0,01
Retenção da Atividade %	99,30	99,38	98,93	99,01
Retenção da Proteína %	48,15	44,67	50	29,93
Fator de Concentração Volumétrico	4,21	4,35	4,12	4,49
Fator de Concentração da At Enzimática	4,33	3,78	3,03	3,02
Fator de Concentração da Ptn Total	1,27	1,71	1,56	1,31
Recuperação da Proteína no Retido %	30,12	39,33	37,94	29,36
Recuperação da Proteína no Permeado %	38,88	41,50	37,50	52,56
Recuperação da Proteína Total %	69,00	80,83	75,44	81,92

O extrato foi precipitado com as condições do ponto central do planejamento experimental (concentração de 55 % de etanol, em uma vazão de 10 mL/min), uma vez que poderia resultar em um bom rendimento e FP, como observado anteriormente.

A recuperação da enzima aumentou após a precipitação do etanol confirmando os resultados do planejamento experimental. Este fato pode ser atribuído à eliminação de possíveis inibidores que poderiam ter permanecido em solução, enquanto que a

enzima foi precipitada. A influência do etanol sobre as enzimas pode variar em função da natureza da proteína que é precipitada. No presente estudo, o etanol não diminuiu a atividade de inulinase, mas, por exemplo, Cui *et al.* (2007) demonstraram que o etanol poderia causar uma diminuição na estabilidade transglutaminase. O aumento no rendimento da enzima também foi observado por outros autores, que também correlacionaram este comportamento com a remoção de inibidores (PORTO *et al.*, 2008; CORTEZ *et al.*, 2004). Até agora, nenhum estudo prévio de precipitação com solvente mostrou resultados semelhantes.

Após a precipitação, a enzima pré-purificada foi concentrada e fracionada por UF em sistema tangencial, utilizando as membranas de 30 kDa, 50 kDa, 60 kDa e 100 kDa. A etapa de UF causou uma pequena queda no rendimento da enzima devido à perda de enzima na superfície da membrana, caracterizada pelo entupimento ou a formação do gel de proteínas. No entanto, um bom fator de purificação pode ser obtido (5,53 vezes) após a UF com membrana de 100 kDa. Possivelmente as proteínas contaminantes permeiam a membrana preferencialmente, enquanto que a enzima foi retida, aumentando a sua pureza.

Os fatores de purificação e os rendimentos encontrados no presente estudo são comparáveis e superiores aos relatados por outros autores. Ohta *et al.* (2002) relataram um FP de 4,6 e um rendimento de 72 % após a UF da inulinase de *Rhizopus* sp. Zhang *et al.* (2004) encontraram um FP de 4,8 e um rendimento de 11 %, mesmo após a precipitação de uma enzima recombinante com sulfato de amônio seguido de cromatografia de troca iônica. Outros autores relatam FP de apenas 2,53 e rendimento de 46 %, após a purificação de uma enzima recombinante por cromatografia de afinidade (Zhang *et al.* 2009). Sharma *et al.* (2007) encontraram um FP de 4,0 e rendimento de apenas 9,1 % após a purificação da inulinase de *Streptomyces* sp. por precipitação com sulfato de amônio, seguido por cromatografia de troca iônica. Essas comparações mostram que este estudo apresenta uma estratégia de purificação que é simples e mais eficaz do que algumas técnicas de cromatografia.

O gel SDS-PAGE das frações apresentados na Tabela 13 é mostrado na Figura 10. Uma pequena variação no perfil de proteína pode ser observada entre o extrato bruto (linha 2), e os extratos obtidos nos demais tratamentos, mesmo quando um maior fator de purificação foi obtido (FP = 5,53, linha 4). A banda na região de 100-120 kDa é

intensificada, sugerindo que esta pode se referir a inulinase. A concentração global das proteínas do extrato foi observada quando as amostras passaram por ultrafiltração, mesmo as proteínas de baixa massa molecular parecem estar concentradas. Isto pode ser devido à polarização de concentração e *fouling*, fenômeno que ocorre na superfície da membrana. As proteínas que são retidas pela membrana podem formar uma camada de gel na superfície desta, que atua como uma segunda membrana dinâmica, aumentando a retenção de proteína, como já observado por outros autores (GHOSH e CUI, 2000).

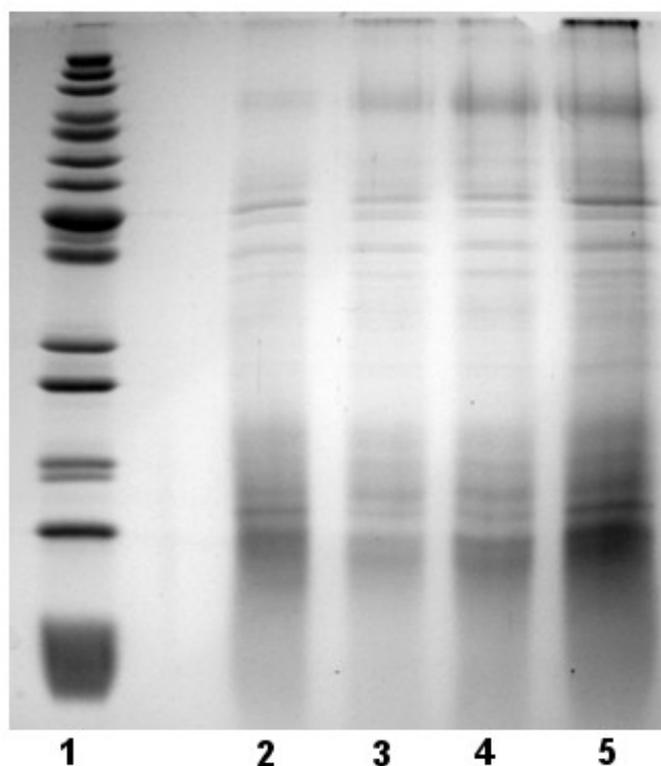


Figura 10. SDS-PAGE das diferentes frações do extrato enzimático: Linha 1: marcador de massa molecular (de cima para baixo) 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15 e 10 kDa . Linha 2: extrato bruto. Linha 3: extrato enzimático, após precipitação com etanol 55 %/10 mL / min. Linha 4: extrato enzimático após precipitação com etanol 55 %/10 mL / min seguido por ultrafiltração em membrana de 100 kDa. Linha 5: extrato enzimático após ultrafiltração com membrana de 100 kDa.

5. CONCLUSÕES

A purificação de inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 produzida por FES utilizando precipitação com sulfato de amônio, etanol e UF foi estudada neste trabalho. A ultrafiltração dos extratos enzimáticos foi avaliada empregando módulo de escoamento tangencial e módulo de escoamento transversal.

Além de não ser capaz de aumentar o fator de purificação da inulinase, a precipitação com sulfato de amônio forneceu baixos rendimentos de enzima, o que pode estar ligado à desativação enzimática pela alta força iônica do meio.

O uso de etanol como agente precipitante forneceu fatores de purificação de 2 a 2,5 vezes, dependendo da concentração de etanol e da taxa de adição deste ao extrato bruto.

Ainda, a precipitação com etanol causou ativação da enzima, possivelmente devido a remoção de inibidores. A melhor condição encontrada foi a concentração de 55 % de etanol em uma vazão de 10 mL/min.

A UF do extrato enzimático permitiu obter um fator de purificação de 1,83 vezes em módulo de escoamento transversal com membrana de 100 kDa e de 2,82 vezes em módulo de escoamento tangencial, utilizando uma membrana de 30 kDa. O aumento da força iônica influenciou positivamente o fator de purificação, que aumentou de 1,83 para 2,90 vezes quando foi utilizada uma concentração de 4,5 mol.L⁻¹ de NaCl em célula de escoamento transversal com uma membrana de 100 kDa.

Quando se utilizou uma estratégia de purificação baseada na precipitação com etanol (concentração de 55 % de etanol e vazão de 10 mL/min) seguida por ultrafiltração (sistema tangencial, temperatura de 5 °C, pressão = 1 bar e uma vazão de 1 L/min), os resultados mostraram que foi possível obter um FP de 5,53 vezes em relação ao extrato bruto, valor comparável a alguns trabalhos que utilizam técnicas cromatográficas. Desta forma, este estudo mostra que é possível se obter um grau razoável de purificação, com alto rendimento, utilizando processos simples e menos custosos que técnicas cromatográficas.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir das observações constatadas durante o desenvolvimento deste trabalho, podem-se sugerir os seguintes desdobramentos para estudos futuros nesta área:

- Avaliar com mais detalhes os fenômenos da polarização de concentração e incrustação (*fouling*).
- Testar diferentes membranas e geometrias, como fibras-ocas.
- Desenvolver estudos da utilização de membranas de afinidade para a purificação de inulinases.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASTOLFI, V., **Produção de inulinase por fermentação em estado sólido usando estratégias de fermentação batelada e batelada alimentada em biorreator de leite fixo.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Campus de Erechim, Erechim – RS, 2010.

ARRIZON, J.; MOREL, S.; GSCHAEDLER, A.; MONSAN, P., **Purification and substrate specificities of a fructanase from *Kluyveromyces marxianus* isolated from the fermentation process of Mezcal.** Bioresource Technology, 2010.

AYYACHAMY, M.; KHELAWAN, K.; PILLAY, D.; PERMAUL, K.; SINGH, S., **Production of inulinase by *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* using onion (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*) peels in solid state cultivation.** Letters in Applied Microbiology, v. 45, p.439-444, 2007.

BASSO, R.C., **Estudo do Processo de Limpeza de Membrana Cerâmica e Obtenção de Lecitina de Soja por Ultrafiltração Seguida de Diafiltração.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 2007.

BECHT, N.O.; MALIK, D.J.; TARLETON, E.S., **Evaluation and comparison of protein ultrafiltration test results: dead-end stirred cell compared with a cross-flow system.** Sep.Purif. Technol., v.62, p. 228–239, 2008.

BENDER, J. P.; MAZUTTI, M. A.; OLIVEIRA, D.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H., **Inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 using solid state fermentation.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 129-132, p. 951-958, 2006.

BENDER, J.P.; MAZUTTI, M.A.; LUCCIO, M. DI; TREICHEL, H., **Extraction of inulinase obtained by solid state fermentation of sugarcane bagasse by**

Kluyveromyces marxianus NRRL Y-7571, Appl. Biochem. Biotechnol., v.149, p.195–203, 2008.

BORZANI, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; SCHMIDELL, W., **Processos Fermentativos e Enzimáticos – Biotecnologia Industrial**, 1ª edição. Editora Edgard Blücher, v.3, p.377 -378, 2001.

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, v.72, p.248-254, 1976.

CHEN, H. Q.; CHEN, X. M.; LI, Y.; WANG, J.; JIN, Z. Y.; XU, X. M.; ZHAO, J. W.; CHEN, T. X.; XIE, Z. J., **Purification and characterization of exo- and endo-inulinase from *Aspergillus ficuum* JNSP5-06**. Food Chemistry, v. 115, p. 1206-1212, 2009.

CHEN, T.; NIE, H.; LI, S.; BRANFORD-WHITE, C.; SU, S.; ZHU L., **Comparison: Adsorption of papain using immobilized dye ligands on affinity membranes**. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v.72, p.25–31, 2009.

CHERYAN, M. **Ultrafiltration and Microfiltration Handbook**. Lancaster: Technomic Publ. Co., Illinois, 526p. 1998.

CHI, Z. M.; CHI, Z.; ZHANG, T.; LIU, G. L.; YUE, L., **Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases**. Applied Microbiology Biotechnology, v. 82, p. 211-220, 2009.

CONTIERO, J. **Inulinases**. In: SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. In: Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto: Legis Summa, p. 381-398, 2004.

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

- CORTEZ, E.V.; PESSOA JR., A.; FELIPE, M. DAS G.A.; ROBERTO, I.C.; VITOLO, M. **Liquid-liquid extraction of xylitol dehydrogenase from *Candida guilliermondii* homogenate by reversed micelles.** Journal of Chromatography B, v.807, p.55-60, 2004.
- COSTA, A. R.; PINHO, M. N.; ELIMELECH, M., **Mechanisms of colloidal natural organic matter fouling in ultrafiltration.** Journal of Membrane Science, v.281, p.716-725, 2006.
- CUI, L; DU, G; ZHANG, D; LIU, H; CHEN, J. **Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygroscopicus*.** Food Chemistry, v.105, p.612-618, 2007.
- CUPERUS, F.P., **Membrane processes in agro-food: State-of-the-art and new opportunities,** Separation and Purification Technology, v.14 , p. 233-239, 1998.
- DI LUCCIO, M., **Membranas microporosas planas e do tipo fibra-oca a partir de sistemas contendo policarbonato como polímero base.** Dissertação de Mestrado, PEQ/COPPE/UFRJ. Rio de Janeiro, 1997.
- DZIEZAK, J. D. **Membrane separation technology offers processors unlimited potential.** Food Technology, v. 44, n. 9, p. 108-113, 1990.
- ETTALIBI, M.; BARATTI, J. C., **Sucrose hydrolysis by thermostable immobilized inulinases from *Aspergillus ficuum*.** Enzyme and Microbial Technology, v. 28, n. 7, p. 596-601, 2001.

- FANE, A. G. e RADOVICH, J.M., **Membrane Systems**. In: ASENJO, J.A. (Ed.), Separation Processes in Biotechnology, Marcel Dekker, New York, p. 209-262, 1990.
- FEINS, M.; SIRKAR, K. K., **Highly Selective Membranes in Protein Ultrafiltration**. Published online 15 April 2004 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/bit.20069.
- FIELD, R. W.; YUNOS, K. F. MD; CUI, Z., **Separation of proteins using sandwich membranes**. Desalination, v.245, p.597–605, 2009.
- GALAEV, I.Y.; MATTIASSON, B.; **Protein purification by affinity ultrafiltration**, in: W.K.Wang (Ed.), Membrane Separations in Biotechnology, second ed. (revised and expanded), Marcel Dekker Inc., 2001.
- GARCIA, R., **Combustíveis e combustão industrial**. Editora Interciência, Rio de Janeiro, 2002.
- GHOSH, R.; CUI, Z.F. **Protein purification by ultrafiltration with pre-treated membrane**. Journal of Membrane Science, v.167, p.47–53, 2000.
- GHOSH, R., **Novel cascade ultrafiltration configuration for continuous, high-resolution protein–protein fractionation: a simulation study**. Journal of Membrane Science, v.226, p. 85–99, 2003.
- GILL, P. K.; SHARMA, A.D.; HARCHAND, R. K.; SINGH, P., **Effect of Media Supplements and Culture Conditions on Inulinase Production by an Actinomycete Strain**. Bioresource Technology, v. 87, p. 359-362, 2003.
- GILL, P. K.; MANHAS, R. K.; SINGH, P., **Purification and properties of a heat-stable exoinulinase isoform from *Aspergillus fumigatus***, Bioresource Technology, v. 97, p. 894–902, 2006.

- GLATZ CE. Precipitation. In: ASENJO JA, editor. **Separation Processes in Biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1990.
- GUO, N.; GONG, F.; CHI, Z.; SHENG, J.; LI, J., **Enhanced inulinase production in solid state fermentation by a mutant of the marine yeast *Pichia guilliermondii* using surface response methodology and inulin hydrolysis**. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 36, p. 499-507, 2009.
- HABERT, A. C., BORGES, C. P., NOBREGA, R. **Processo de Separação por Membranas**. Rio de Janeiro: E-papers, 2006.
- HENSING, M.; VROUWENVELDER, H.; HELLINGA, R.; BAARTMANS, R.; van DIJKEN, H., **Production of extracellular inulinase in high-cell-density fed-batch cultures of *Kluyveromyces marxianus***. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, v. 42, p. 516-521, 1994.
- HUANG, R.; KOSTANSKI, L.K.; FILIPE, C.D.M.; GHOSH, R., **Environment-responsive hydrogel-based ultrafiltration membranes for protein bioseparation**. Journal of Membrane Science, v.336, p.42–49, 2009.
- IBANEZ, R.; ALMECIJA, M.C.; GUADIX, A. **Dynamics of the ceramic ultrafiltration of model proteins with different isoelectric point: Comparison of beta-lactoglobulin and lysozyme**. Separation and Purification Technology, v. 57, p. 314-320, 2007.
- ISHIHARA, T.; YAMAMOTO, S.; **Optimization of monoclonal antibody purification by ion-exchange chromatography_Application of simple methods with linear gradient elution experimental data**. Journal of Chromatography A, v. 1069, p. 99–106, 2005.

- JING, W.; ZHENGYU, J.; BO, J.; AUGUSTINE, A., **Production and separation of exo- and endoinulinase from *Aspergillus ficuum***. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 5-11, 2003.
- JULIANO, L. N. **Preparação e Caracterização de Membranas para Clarificação de Suco de Frutas**. Dissertação Mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. Florianópolis, 85 p. 2000.
- KALIL, S. J.; SUZAN, R.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I., **Optimization of inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* using factorial design**. *Applied Biochemical and Biotechnology*, v. 94, p. 257-264, 2001.
- KALIL, S. J.; MAUGERI, F, RODRIGUES, M. I., **Ion exchange expanded bed chromatography for the purification of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus***. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 581–586, 2005.
- LANE, M. M.; MORRISSEY, J. P. ***Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow**. *Fungal Biology Reviews*. 2010.doi:10.1016/j.fbr.2010.01.001
- LI, Y.; SOH, S. C.; CHUNG, T.; CHAN, S.Y., **Exploration of Ionic Modification in Dual-Layer Hollow Fiber Membranes for Long-Term High-Performance Protein Separation**. DOI 10.1002/aic Published on behalf of the AIChE, Vol. 55, nº. 2 AIChE Journal, February 2009.
- LIN, S.; HUNG, C.; JUANG, R., **Effect of operating parameters on the separation of proteins in aqueous solutions by dead-end ultrafiltration**. *Desalination*, v.234, p. 116–125, 2008.

- LIU, J.; LU, J.; ZHAO, X.; LU, J.; CUI, Z., **Separation of glucose oxidase and catalase using ultrafiltration with 300-kDa polyethersulfone membranes.** Journal of Membrane Science, v.299, p.222–228, 2007.
- MAKINO, Y.; LIMA, P. S.; FILHO, C. F. M. AND RODRIGUES M. I., **Adsorption of the inulinase from *Kluyveromyces marxianus* nrri y-7571 on STREAMLINEÂ DEAE resin,** Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 22, n°. 04, p. 539 - 545, 2005.
- MARTINS, T. S.; **Produção e purificação de lipases de *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682).** Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro: 2001. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Rio de Janeiro.
- MAZUTTI, M.; BENDER, J. P.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H., **Optimization of inulinase production by solid state fermentation using sugar cane bagasse.** Enzyme and Microbial Technology, v. 39, n. 1, p. 56-59, 2006.
- MAZUTTI, M.; CENI G.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H., **Production of inulinase by solid-state fermentation: effect of process parameters on production and preliminary characterization of enzyme preparations.** Bioprocess and Biosystems Engineering, v. 30, p. 297-304, 2007.
- MAZUTTI, M. A.; ZABOT, G.; BONI, G.; SKOVRONSKI, A.; OLIVEIRA, D.; LUCCIO, M. DI.; RODRIGUES, M. I.; TREICHEL, H.; MAUGERI, F., **Optimization of inulinase production by solid-state fermentation in a packed-bed bioreactor.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v.85, p. 109-114, 2010.
- MENDES, G. L., **Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em processo batelada alimentada a partir de meios industriais pré-tratados.** Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de

Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, - SP, 2006.

MENONCIN, S., DOMÍNGUES, N.M., FREIRE, D.M.G., TONIAZZO, G., CANSIAN, R.L., OLIVEIRA, J.V., DI LUCCIO, M., OLIVEIRA, D., TREICHEL, H.; **Study of the extraction, concentration, and partial characterization of lipases obtained from *Penicillium verrucosum* using solid-state fermentation of soybean bran**, 2008: DOI 10.1007/s11947-008-0104-8.

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

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

MORAES, C. C.; MAZUTTI, M. A.; RODRIGUES, M. I.; MAUGERI, F.; KALIL, S. J., **Mathematical modeling and simulation of inulinase adsorption in expanded bed column**, Journal of Chromatography A, v.1216, p. 4395–4401, 2009.

MORAES, C. C.; KALIL, S. J., **Strategy for a protein purification design using C-phycoyanin extract**, Bioresource Technology, v.100, p.5312–5317, 2009.

MULDER, M. **Basic Principles of Membrane Technology**. 2nded. 564p. Kluwer Academic Publishers, 1997.

MULDER, M. **Basic Principles of Membrane Technology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, Second Edition, 2000.

OHTA, K.; SUETSUGU, N.; AND NAKAMUECA, T., **Purification and Properties of an Extracellular Inulinase from *Rhizopus* sp. Strain TN-96**, Journal of Bioscience and Bioengineering, v.94, p.78-80, 2002.

- PATEL R.N.; **Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals.** Enzyme and Microbial Technology, v.31, p. 804-826, 2002.
- PIZARRO A.V.L., PARK E.Y.; **Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth.** Process Biochemistry, v.38, p.1077-1082, 2003.
- PORTO, T.S.; MEDEIROS E SILVA, G.M.; PORTO, C.S.; CAVALCANTI, M.T.H.; NETO, B.B.; LIMA-FILHO, J.L.; CONVERTI, A; PORTO, A.L.F.; PESSOA JR., A. **Liquid-liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system.** Chemical Engineering and Processing, v.47, p.716-721, 2008.
- PRZYBYCIEN, T.M., PUJAR, N. S. e STEELE, L. M., **Alternative bioseparation operations: life beyond packed-bed chromatography.** Current Opinion in Biotechnology v.15, p.469-478, 2004.
- ROCHA, J. R.; CATANA, R.; FERREIRA, B. S.; CABRAL, J. M. S.; FERNANDES, P., **Design and characterization of an enzyme system for inulin hydrolysis.** Food Chemistry, v. 95, p. 77-82, 2006.
- RISSE F. V. A.; MAZUTTI M. A.; TREICHEL H.; COSTA F.; MAUGERI F.; RODRIGUES M. I., **Comparison Between Systems for Synthesis of Fructooligosaccharides from Sucrose Using Free Inulinase from Kluyveromyces marxianus NRRL Y-7571.** Food Bioprocess Technol, 2009, online first, DOI: 10.1007/s11947-009-0272-1.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A.F.; **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos.** 1ª Ed. Campinas – SP, 2005.

- RODRIGUES, R. B. **Aplicação dos Processos de Separação por Membranas para Produção de suco Clarificado e Concentrado de Camu Camu (*Myrciaria dubia*)**. Tese Doutorado em Tecnologia de Alimentos - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 146 p. 2002.
- SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G., **Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides**. Trends in Food Science & Technology, v. 16, n. 10, p. 442-457, 2005.
- SANTOS, A.M.P., **Produção de Oligossacarídeos por Inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus***. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 1998.
- SARKAR, B.; DASGUPTA, S.; DE, S., **Electric field enhanced fractionation of protein mixture using ultrafiltration**. Journal of Membrane Science, v.341, p.11–20, 2009.
- SAXENA, A.; TRIPATHI, B. P.; KUMAR, SHAHI, M.; V. K., **Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: An overview**. Advances in Colloid and Interface Science, v.145, p. 1–22, 2009.
- SCHNEIDER, A. L. S. **Estudo da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907**. Florianópolis, 1998. 137p. Tese (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina.
- SCHNEIDER, R.P., TSUTIYA, M.T. **Membranas filtrantes para tratamento de água, esgoto e água de reuso**. 1 ed. São Paulo, ABES, 2001.

- SHARMA, A. D.; KAINTH, S.; GILL, P. K., **Inulinase production using garlic (*Allium sativum*) powder as a potential substrate in *Streptomyces* sp.** Journal of Food Engineering, v. 77, p. 486-491, 2006.
- SHARMA, A. D.; GILL, P. K. **Purification and characterization of heat-stable exo-inulinase from *Streptomyces* sp.** Journal of Food Engineering, v. 79, p.1172–1178, 2007.
- SHENG, J; CHI, Z.; YAN, K.; WANG, X.; GONG, F.; Li, J., **Use of response surface methodology for optimizing process parameters for high inulinase production by the marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a in solid-state fermentation and hydrolysis of inulin.** Bioprocess and Biosystems Engineering, v. 32, p. 333-339, 2009.
- SHU, C.H., XU, C.J., LIN, G.C.; **Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*.** Process Biochemistry, v.41, p.734-738, 2006.
- SGUAREZI, C.; LONGO, C.; CENI, G.; BONI, G.; SILVA, M. F.; DI LUCCIO, M.; MAZUTTI, M. A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I.; TREICHEL, H., **Inulinase production by agroindustrial residues: acid pretreatment of substrates and optimization of production.** Food Bioprocess and Technology, v.2, p. 409-414, 2008.
- SILVA-SANTISTEBAN, B. O. Y.; MAUGERI, F., **Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*.** Enzyme Microbial Technology, v. 36, p. 717-724, 2005.
- SINGH, R. S.; SOOCH, B. S.; PURI, M., **Optimization of medium and process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* YS-1.** Bioresource Technology, v. 98, p. 2518-2525, 2007.

SKELTON, R., **Membrane filtration applications in food industry**, Filtration & Separation, April, p.28-30, 2000.

SKOWRONEK, M.; FIEDUREK, J., **Inulinase biosynthesis using immobilized mycelium of *Aspergillus niger***. Enzyme and Microbial Technology, v. 3338 (1-2), p. 162-167), 2006.

STAUDE, E., **What makes filtration with membranes so fascinating?** In: BÉLAFI-BAKÓ, K, GUBICZA, L. and MULDER, M. (eds.). Integration of membrane processes into bioconversions, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, p.19-40, 2000.

SWENNEN, K.; COURJAN, C. M.; BRUGGEN, B. P.; VANDERCASTELLE, C.; DELCOUR, J. A., Ultrafiltration and ethanol precipitation for isolation of arabinoxylooligosaccharides with different structures. Carbohydrate Polymers, v.62, p. 283–292, 2005.

TASSELLI, F.; CASSANO, A.; DRIOLI, E. **Ultrafiltration of kiwifruit juice using modified poly(ether ether ketone) hollow fibre membranes**. Separation and purification technology, v.57, p.94-102, 2007.

TENG, M.Y.; LIN, S.H.; WU, C.Y.; JUANG, R.S., **Factors affecting selective rejection of proteins within a binary mixture during cross-flow ultrafiltration**. J. Membr. Sci. v.281, p. 103-110, 2006.

TREICHEL, H., **Estudo da otimização da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em meios industriais pré-tratados, para viabilidade econômica da etapa de recuperação e purificação da enzima**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 2004.

TREICHEL, H.; MAZUTTI, M. A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I., **Technical viability of the production, partial purification and characterisation of inulinase using pretreated agroindustrial residues.** *Bioprocess Biosyst Eng*, 2009. DOI: 10.1007/s00449-008-0262-0.

TUNG, K.; HU, C.; LI, C.; CHUANG, C., **Investigating protein crossflow ultrafiltration mechanisms using interfacial phenomena.** *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, v.38, p.303–311, 2007.

UZUNOVA, K.; VASSILEVA, A.; IVANOVA, V.; SPASOVA, D.; TONKOVA, A., **Thermostable exo-inulinase production by semicontinuous cultivation of membrane-immobilized *Bacillus* sp. 11 cells.** *Process Biochemistry*, v.37, p.863-868, 2002.

VANDAMME, E.J.; DERYCKE, D.G., **Microbial inulinases: fermentation process, properties and application.** *Adv Appl Microbiol*, v. 29 p.139–176, 1983.

VAN REIS, V.; ZYDNEY, A., **Membrane separations in biotechnology.** *Current Opinion in Biotechnology*, v.12, p.208–211, 2001.

XIONG, C.; JINHUA, W.; DONGSHENG, L. **Optimization of solid-state medium for the production by *Kluyveromyces* S120 using response surface methodology.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 34, p. 179-184, 2007.

YUNOS, K.F. MD.; FIELD, R.W., **Rejection amplification in the ultrafiltration of binary protein mixtures using sandwich configurations.** *Chemical Engineering and Processing*, v.47, p.1053–1060, 2008.

ZEMAN, L. J.; ZYDNEY, A. L. **Microfiltration and Ultrafiltration: principles and applications.** Ed. Marcel Dekker, New York, 618p. 1996.

ZHANG, L.; ZHAO, C.; ZHU, D.; OHTA, Y.; and WANG, Y., **Purification and characterization of inulinase from *Aspergillus niger* AF10 expressed in *Pichia pastoris***, Protein Expression and Purification, v.35, p.272–275, 2004.

ZHANG, T.; GONG, F.; PENG, Y.; CHI, Z. **Optimization for high-level expression of the *Pichia guilliermondii* recombinant inulinase in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant inulinase**. Process Biochemistry, v.44, p.1335-1339, 2009.

ANEXOS