

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

**SIMONE MARIA GOLUNSKI**

**ESTRATÉGIAS DE PURIFICAÇÃO DE INULINASE DE**  
*Kluyveromyces marxianus* NRRL Y – 7571

**ERECHIM, RS – BRASIL**

**SETEMBRO 2014**

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

**ESTRATÉGIAS DE PURIFICAÇÃO DE INULINASE DE**  
*Kluyveromyces marxianus* NRRL Y – 7571

**SIMONE MARIA GOLUNSKI**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Doutor 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**

**SETEMBRO 2014**

**ESTRATÉGIAS DE PURIFICAÇÃO DE INULINASE DE *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y – 7571**

Simone Maria Golunski

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

Comissão Julgadora:

---

Helen Treichel, D. Sc.  
(Orientadora)

---

Luciane Colla, D. Sc.  
UPF

---

Marco Di Luccio, D. Sc.  
(Orientador)

---

Gean Vargas, D. Sc.  
UFFS-Campus de Erechim

---

Rogério Marcos Dallago, D. Sc.  
(orientador)

---

Marcelo Luis Mignoni, D. Sc.  
URI-Campus de Erechim

---

Clarisse Steffens, D. Sc.  
URI-Campus de Erechim

Erechim, 26 de setembro de 2014.

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

*“Para conquistar coisas importantes,  
devemos não apenas agir mas também sonhar,  
não apenas planejar mas também acreditar”.*

*(Anatode France)*

***Dedicatória***

*Aos meus pais, Laurindo e Lídia,  
que por uma vida de dedicação, amor  
e trabalho sempre possibilitaram a seus filhos a  
oportunidade de realizar sonhos e conquistas.*

## AGRADECIMENTOS

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

Inicio meus agradecimentos por meus pais, que sempre primaram pela minha educação. Obrigado Sr. Laurindo e Sra. Lídia por, além de me oferecerem a oportunidade de estudar, sempre estarem ao meu lado.

À Prof<sup>a</sup> Helen. Um grande exemplo de profissional e de ser humano, com um caráter e honestidade raros. Obrigado pela formação profissional e pessoal, pela oportunidade concedida e principalmente, pela paciência, dedicação e apoio. Obrigado sempre!

Aos meus orientadores Rogério e Marco por todos os ensinamentos, mas principalmente pela amizade, confiança, apoio e compreensão em todas as vezes que em suas salas fui em busca de uma palavra de incentivo. Obrigado por acreditarem em mim e me induzirem a pensar criticamente.

Ao Pablo, pelo apoio, por suportar todo o meu mau humor quando os resultados não eram os esperados, e pelos dias em que dizia: “não vai, fica comigo!”

Aos meus irmãos Cátia e Roberto, pela disponibilidade em me ajudar e torcerem por mim.

Dizem que os amigos são pra sempre quando vivem como irmãos. Naiane, Sandy, Rosicler, Márcia, Jonaína, Naira, Letícia e Marcell como é bom poder contar com vocês. Obrigado por compartilharem bons momentos, dar forças, estarem sempre ao meu lado nas horas boas e nas difíceis, e principalmente, por toda diversão que só vocês me proporcionam.

À CAPES pela concessão da bolsa 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 Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de Alimentos.

**ESTRATÉGIAS DE PURIFICAÇÃO DE INULINASE DE *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y – 7571**

Simone Golunski

Setembro/2014

Orientadores: Helen Treichel

Marco Di Luccio

Rogério Marcos Dallago

A presente tese investigou diferentes estratégias para 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. Foram avaliados diferentes métodos de concentração e purificação da enzima, baseados em técnicas de mudança de força iônica do meio, precipitação com solventes orgânicos, sistemas aquosos bifásicos (SAB), membrana de afinidade e o uso de nanopartículas magnéticas. O desempenho da precipitação com solventes orgânicos foi estudado utilizando a técnica de planejamento experimental. Foram avaliados os efeitos da concentração dos álcoois n-propílico e iso-propílico e suas vazões de adição ao extrato bruto. Como resposta acompanhou-se o rendimento da atividade enzimática e o fator de purificação. A precipitação proporcionou a ativação da enzima, aumentando a atividade específica (U/mg de proteína) em até 2 vezes. A mudança de força iônica do extrato bruto pela adição de sais (NaCl/CaCl<sub>2</sub>), acoplada à precipitação, influenciou positivamente o fator de purificação, aumentando a atividade específica de 2,4 - 4,8 vezes, quando uma concentração de 0,5 mol/L de NaCl foi adicionada ao extrato bruto, seguida de precipitação em uma concentração de 50 % de n-propílico, adicionado a uma vazão de 19,9 mL/min. Dois sistemas aquosos bifásicos foram estudados, realizando-se uma varredura para seleção da massa molar de polietilenoglicol (PEG) (1500, 4000, 6000, 8000 e 10000) e fosfato

de potássio (pH 6,0 e 7,0) e citrato de sódio (pH 5,0), com posterior utilização da metodologia de superfície de resposta como ferramenta para identificar a composição do sistema (concentração do polímero e do fosfato de potássio/citrato de sódio) capaz de maximizar o particionamento e purificação da enzima. O processo de purificação utilizando SAB/fosfato de potássio (25 % de PEG 4000 e 10 % de tampão pH 7,0) levou a valores de purificação e recuperação de 3,4 vezes e 140,6 %, respectivamente. A execução de um planejamento de experimentos variando a concentração de PEG 4000 (15,1 % a 34,8 %) e tampão fosfato de potássio pH 7 (5,8 % a 14,2 %) permitiu a obtenção de um fator de purificação de até 3,8 vezes e um rendimento de 96,2 %. Este resultado foi obtido utilizando 18 % de PEG 4000 e 7 % de tampão fosfato de potássio. Uma combinação de estratégias de purificação foi realizada pela adição de uma concentração de 0,5 mol/L de NaCl ao extrato enzimático bruto seguido de precipitação com álcool n-propílico (concentração de 50 % e um vazão de 19,9 mL/min) e uma extração em sistema aquoso bifásico na condição otimizada anteriormente. Esta combinação possibilitou a obtenção de um fator de purificação de 5,4 vezes e um rendimento de 86,2 %. O processo de purificação utilizando SAB/citrato de sódio não foi eficiente, alcançando os melhores valores de purificação e rendimento de 2,0 vezes e 37,2 %, respectivamente, para o sistema composto por uma concentração de 40 % de PEG 1500 e 5,77 % de tampão citrato de sódio pH 5,0. Os estudos utilizando membranas de afinidade, formadas por membranas microporosas de polietersulfona acopladas com corantes azul reativo 4, apresentaram uma adsorção de proteína de 440,8 mg/g.

*Palavras-chave:* inulinase, purificação, precipitação, força iônica, sistema aquoso bifásico, membrana de afinidade, nanopartículas.

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

**STRATEGIES FOR PURIFICATION INULINASE *Kluyveromyces marxianus***

**NRRL Y - 7571**

Simone Golunski

September/2014

Advisors: Helen Treichel

Marco Di Luccio

Rogério Marcos Dallago

This thesis investigated different strategies for the isolation and purification of inulinase (EC 3.2.1.7) produced by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 by solid state fermentation of sugarcane bagasse. Different methods of concentration and purification of the enzyme, based on changing ionic strength of the medium, precipitation with organic solvents, aqueous two-phase systems (SAB), affinity membrane and the use of magnetic nanoparticles were evaluated. The performance precipitation with organic solvents was studied using the technique of experimental design. The effects of the concentration and flow rate of n-propyl and iso-propyl alcohols addition to the crude extract were evaluated. The yield of enzyme activity and the purification factor. were assessed as responses. Precipitation yielded the activation of the enzyme, increasing the specific activity up to 2 times. The change in ionic strength of the crude extract by the addition of salts (NaCl/CaCl<sub>2</sub>), coupled with precipitation positively influenced the purification factor, increasing from 2.4 to 4.8 times when a concentration of 0.5 mol/L NaCl was added to the crude extract, followed by precipitation in a concentration of 50% n-propyl alcohol, added at a flow rate of 19.9 mL/min. Two aqueous two-phase systems were studied by performing a scanning for selection of the molecular weight of polyethylene glycol (PEG) (1500, 4000, 6000, 8000 and 10000) and potassium phosphate (pH 6.0 and 7.0) and sodium citrate (pH 5.0) compositions, with subsequent use of response surface methodology as a tool to identify the composition of the system

(polymer concentration and potassium phosphate/sodium citrate) able to maximize the partitioning and purification of the enzyme by assessing the concentration the polymer and the potassium phosphate / sodium citrate. The purification process using SAB / potassium phosphate (25% PEG 4000 and 10% pH 7.0 buffer) reached purification and recovery times of 3.4 and 140.6%, respectively. The execution of a design of experiments varying the concentration of PEG 4000 (15.1% to 34.8%) and potassium phosphate buffer pH 7 (5.8% to 14.2%) yielded a purification factor up to 3.8 times and an enzyme recovery of 96.2%. This result was obtained using 18% PEG 4000 and 7% of potassium phosphate buffer. A combination of strategies Purification was accomplished by adding a concentration of 0.5 mol/L NaCl followed by crude enzyme extract by precipitation with n-propyl alcohol (50% concentration and flow rate of 19.9 mL/min) and an extraction in an aqueous two-phase system in the previously optimized conditions. This combination allowed to obtain a purification factor of 5.4 times and an enzyme recovery of 86.2%. The purification process using SAB / sodium citrate was not effective, achieving the best of purification and yield values of 2.0 times and 37.2%, respectively, of the system consists of a concentration of 40% PEG 1500 and 5,77% sodium citrate buffer pH 5.0. The affinity studies using microporous membranes formed by polyethersulfone coupled with Reactive Blue 4 dye showed a protein adsorption of 440.8 mg/g.

*Keywords:* enzyme, purification, precipitation, ionic strength, aqueous two-phase system, affinity membrane, nanoparticles.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	XIV
LISTA DE FIGURAS.....	XVI
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 OBJETIVOS.....	4
<b>1.1.1 Objetivo geral.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>4</b>
1.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	5
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>8</b>
2.1 ENZIMAS .....	8
2.2 A ENZIMA INULINASE E SUA IMPORTÂNCIA TECNOLÓGICA.....	8
2.3 RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS.....	10
2.4 RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE INULINASE .....	11
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	15
<b>3. PRODUÇÃO DE INULINASE .....</b>	<b>19</b>
3.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	19
<b>3.1.1 Levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1.2 Produção de inulinase .....</b>	<b>20</b>
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
<b>3.2.1 Produção de inulinases .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2.2 Atividade enzimática .....</b>	<b>25</b>
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	26
3.4 CONCLUSÕES PARCIAIS.....	27
<b>4. PURIFICAÇÃO DE INULINASE POR PRECIPITAÇÃO.....</b>	<b>30</b>
4.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	30
<b>4.1.1 Precipitação por solventes.....</b>	<b>30</b>
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
<b>4.2.1 Pré-concentração do extrato enzimático por precipitação .....</b>	<b>32</b>

4.2.2 Precipitação com sais com posterior precipitação com solventes .....	33
4.2.3 Atividade enzimática .....	34
4.2.4 Determinação de proteína total .....	34
4.2.5 Avaliação das estratégias de purificação de enzimas .....	34
4.2.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	35
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	37
4.3.1 Pré-concentração do extrato enzimático por precipitação com solventes .	37
4.3.2 Mudança da força iônica do meio seguida por precipitação com álcoois...	43
4.4 CONCLUSÕES PARCIAIS .....	47
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	48
<b>5. PURIFICAÇÃO DE INULINASE POR SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO .....</b>	<b>50</b>
5.1 REFERENCIAL TEÓRICO .....	50
5.1.1 Sistema aquoso bifásico (SAB) .....	50
5.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	54
5.2.1 Massa molar do polietilenoglicol (PEG) .....	54
5.2.2 Determinação da curva binodal .....	54
5.2.3 Preparação do sistema aquoso bifásico .....	55
5.2.4 <i>Screening</i> de diferentes condições de PEG/fosfato de potássio no sistema aquoso bifásico para a purificação da inulinase .....	56
5.2.5 Estratégia para a maximização da purificação por sistema aquoso bifásico/fosfato de potássio.....	56
5.2.6 Estratégia para a maximização da purificação por sistema aquoso bifásico/citrato de sódio.....	59
5.2.7 Purificação da enzima inulinase em sistema aquoso bifásico - álcool/sal...	59
5.2.8 Avaliação das estratégias de purificação de enzimas .....	60
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	61
5.3.1 <i>Screening</i> de diferentes condições de PEG/fosfato de potássio no sistema aquoso bifásico para a purificação da inulinase .....	61
5.3.2 Otimização da purificação de inulinase por SAB/fosfato de potássio .....	66
5.3.3 <i>Screening</i> de diferentes condições de PEG/citrato de sódio no sistema aquoso bifásico para a purificação da inulinase .....	70
5.3.4 Estratégia para a maximização da purificação por SAB/citrato de sódio .	71

<b>5.3.5 Sistema aquoso bifásico com álcool e sal para purificação de inulinase ....</b>	<b>74</b>
5.4 CONCLUSÕES PARCIAIS.....	76
5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	77
<b>6. MEMBRANAS DE AFINIDADE .....</b>	<b>80</b>
6.1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	80
<b>6.1.1 Membranas de afinidade .....</b>	<b>80</b>
<b>6.1.2 Tipos de membranas empregadas.....</b>	<b>80</b>
<b>6.1.3 Corantes utilizados em membranas de afinidade.....</b>	<b>81</b>
6.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	83
<b>6.2.1 Ligantes de afinidade e agentes facilitadores .....</b>	<b>83</b>
<b>6.2.2 Preparo da membrana com quitosana .....</b>	<b>83</b>
<b>6.2.3 Reação de acoplamento do corante à membrana de quitosana .....</b>	<b>83</b>
<b>6.2.4 Equilíbrio de adsorção de proteínas .....</b>	<b>84</b>
<b>6.2.5 Estudo da otimização do uso de corante e quitosana .....</b>	<b>85</b>
<b>6.2.6 Dessorção.....</b>	<b>85</b>
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	86
<b>6.3.1 Acoplamento dos corantes reativos a membrana de quitosana .....</b>	<b>86</b>
<b>6.3.2 Testes preliminares para adsorção de membranas de quitosana com corante .....</b>	<b>87</b>
<b>6.3.3 Dessorção.....</b>	<b>93</b>
6.4 CONCLUSÕES PARCIAIS.....	94
<b>7. NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS FUNCIONALIZADAS NA PURIFICAÇÃO DE INULINASE.....</b>	<b>96</b>
7.1 REFERENCIALTEÓRICO.....	96
<b>7.1.1 Partículas Magnéticas .....</b>	<b>96</b>
<b>7.1.2 Nanopartículas Magnéticas .....</b>	<b>96</b>
7.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	99
<b>7.2.1 Síntese das partículas magnéticas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.....</b>	<b>99</b>
<b>7.2.2 Funcionalização das nanopartículas magnéticas.....</b>	<b>99</b>
<b>7.2.3 Capacidade de ligação das nanopartículas magnéticas .....</b>	<b>99</b>
<b>7.2.4 Atividade enzimática .....</b>	<b>100</b>

7.2.5 Determinação de proteína total .....	100
7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	100
7.3.1 Partículas magnéticas .....	100
7.3.2 Testes de adsorção da enzima inulinase utilizando nanopartículas magnéticas Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....	102
7.4 CONCLUSÕES PARCIAIS .....	103
7.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	104
8. CONCLUSÕES.....	106
9. SUGETÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	107
10. ANEXOS .....	106

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Produção de inulinase por FES em biorreator de leito fixo em termos de atividade enzimática em cada uma das zonas dentro do biorreator.....	26
<b>Tabela 2.</b> Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo $2^2$ , para otimização da recuperação enzimática. ....	33
<b>Tabela 3.</b> Matriz do DCCR $2^2$ (valores reais e codificados) e respectivas respostas em termos de atividade específica, rendimento da atividade de inulinase e fator de purificação para precipitação com os álcoois n-propílico e iso-propílico. ....	39
<b>Tabela 4.</b> Modelos propostos para o fator de purificação e rendimento da enzima inulinase em função da concentração e da vazão dos álcoois n-propílico e iso-propílico.....	40
<b>Tabela 5.</b> Análise de variância para avaliação da significância estatística dos modelos propostos para a precipitação com álcoois da enzima inulinase. ....	41
<b>Tabela 6.</b> Efeito da mudança de força iônica sobre o extrato enzimático seguido de precipitação com solventes orgânicos. ....	44
<b>Tabela 7.</b> Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo $2^2$ , para otimização das condições de purificação enzimática com PEG 4000 e fosfato de potássio pH 7,0. ....	57
<b>Tabela 8.</b> Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo $2^2$ , para otimização das condições de purificação enzimática com PEG 1500 e citrato de sódio pH 5,0.....	59
<b>Tabela 9.</b> Purificação de inulinase por sistemas aquosos bifásicos baseados em PEG 1500 pH 6 e 7. ....	62
<b>Tabela 10.</b> Purificação de inulinase por sistemas aquosos bifásicos baseados em PEG 4000 pH 6 e 7. ....	62
<b>Tabela 11.</b> Purificação de inulinase por sistemas aquosos bifásicos baseados em PEG 6000 e pH 6 e 7.....	63
<b>Tabela 12.</b> Purificação de inulinase por sistemas aquosos bifásicos baseados em PEG 8000 e pH 6 e 7.....	63
<b>Tabela 13.</b> Purificação de inulinase por sistemas aquosos bifásicos baseados em PEG 10000 e pH 6 e 7.....	64

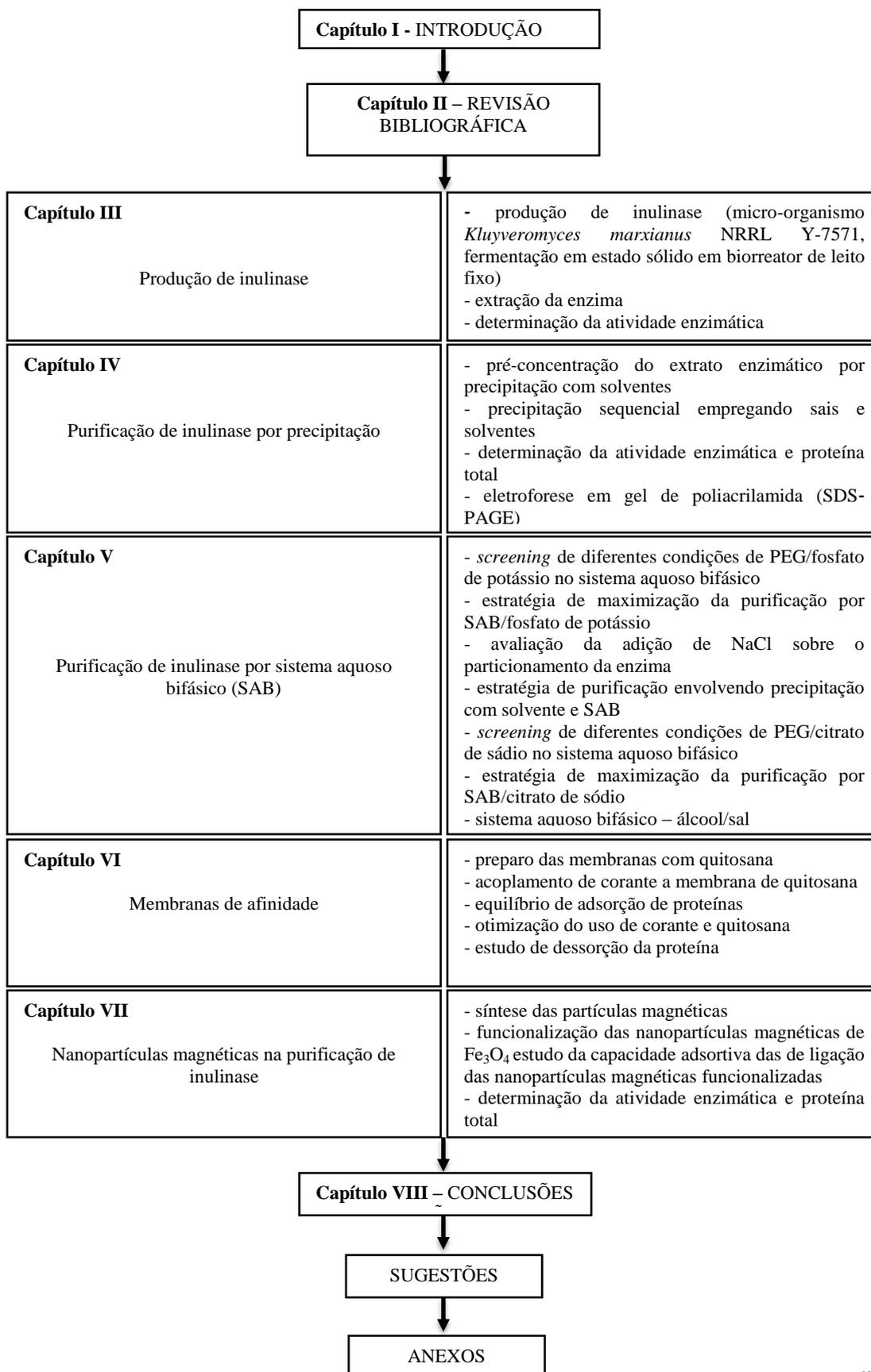
<b>Tabela 14.</b> Matriz do planejamento experimental com as variáveis concentração de PEG e de fosfato de potássio e as respostas em termos de fator de purificação (FP), recuperação enzimática (RP), coeficiente de partição ( $K_{partição}$ ) e razão de volume do sistema (razão volume).....	67
<b>Tabela 15.</b> Efeito da concentração de sal na purificação da inulinase de <i>K. marxianus</i> . .....	69
<b>Tabela 16.</b> Resultados obtidos com sistemas baseados em PEG 1500, 4000, 6000 e 8000 em pH 5. ....	70
<b>Tabela 17.</b> Matriz do planejamento experimental com as variáveis concentração de PEG e de citrato de sódio e as respostas em termos de fator de purificação (FP), recuperação enzimática (RP), coeficiente de partição ( $K_{partição}$ ) e razão de volume do sistema (Razão volume.).....	72
<b>Tabela 18.</b> Fator de purificação (FP) e recuperação (R %) da enzima inulinase na fase de topo para o sistema aquoso bifásico sal e álcool. ....	75
<b>Tabela 19.</b> Variáveis e níveis estudados no planejamento experimental $2^2$ , para otimização da adsorção de proteína.....	85
<b>Tabela 20.</b> Testes preliminares de adsorção nas membranas de quitosana com corante. .....	88
<b>Tabela 21.</b> Matriz dos planejamentos experimentais $2^2$ (valores reais e codificados) com a adsorção de ASB em mg/g para as membranas de acetato celulose 0,8 $\mu\text{m}$ e poliétersulfona 0,22 $\mu\text{m}$ utilizando corante azul reativo 4 e vermelho reativo 120. .....	89
<b>Tabela 22.</b> Modelos propostos para a adsorção de proteínas em diferentes concentrações de corante e quitosana.....	90
<b>Tabela 23.</b> Análise de variância para a avaliação da significância estatística dos modelos propostos para a adsorção de proteínas (mg/g) das membranas. ....	91
<b>Tabela 24.</b> Dessorção do experimento 4 do planejamento de experimentos da membrana de poliétersulfona 0,22 $\mu\text{m}$ acoplada com 2 % de quitosana e 1 % do corante azul reativo 4.....	93
<b>Tabela 25.</b> Testes de adsorção da enzima inulinase utilizando nanopartícula magnética $\text{Fe}_3\text{O}_4$ por 24 horas.....	102

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** 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 CO<sub>2</sub>, temperatura e umidade. .... 25
- Figura 2.** Superfícies de resposta e curvas de contorno para avaliação do comportamento da precipitação da enzima inulinase em álcool n-propílico e iso-propílico, sendo (a) superfície de resposta para o rendimento com precipitação por n-propílico, (b) curva de contorno para o rendimento com precipitação por n-propílico, (c) superfície de resposta para o FP com precipitação por n-propílico, (d) curva de contorno para o FP com precipitação por n-propílico, (e) superfície de resposta para o rendimento com precipitação por iso-propílico, (f) curva de contorno para o rendimento com precipitação por iso-propílico, (g) superfície de resposta para o FP com precipitação por iso-propílico, (h) curva de contorno para o FP com precipitação por iso-propílico..... 42
- Figura 3.** SDS–PAGE das diferentes frações protéicas obtidas por purificação do extrato enzimático. Da esquerda para a direita: Linha 1: marcador de massa molar (de cima para baixo) 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15 e 10 kDa. Linha 2: extrato enzimático bruto. Linha 3: extrato enzimático após mudança de força iônica do meio por NaCl 0,5 mol/L e precipitação com n-propílico 50 % / 19,9 mL/min. Linha 4: extrato enzimático após mudança de força iônica do meio por NaCl 0,05 mol/L e precipitação com iso-propílico 50 % / 19,9 mL/min. Linha 5: extrato enzimático após mudança de força iônica do meio por NaCl 0,5 mol/L e precipitação com etanol 55 % / 19,9 mL/min..... 45
- Figura 4.** SDS–PAGE das diferentes frações protéicas obtidas por purificação do extrato enzimático. Da esquerda para a direita: Linha 1: marcador de massa molar (de cima para baixo) 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15 e 10 kDa. Linha 2: extrato enzimático bruto. Linha 3: extrato enzimático após mudança de força iônica do meio por CaCl<sub>2</sub> 0,1 mol/L e precipitação com n-propílico 50 % / 19,9mL/min. Linha 4: extrato enzimático após mudança de força iônica do meio por CaCl<sub>2</sub> 0,1 mol/L e precipitação com iso-propílico 50 % / 19,9mL/min. Linha 5: extrato enzimático após mudança de força iônica do meio por CaCl<sub>2</sub> 0,5 mol/L e precipitação com etanol 55 % / 19.9 mL/min..... 46

<b>Figura 5.</b> Diagrama de fase esquemático de um sistema aquoso bifásico.....	51
<b>Figura 6.</b> Esquema da purificação da inulinase pelo sistema aquoso bifásico. ....	56
<b>Figura 7.</b> Gráfico de Pareto dos efeitos para o fator de purificação. ....	68
<b>Figura 8.</b> Gráfico de Pareto para os efeitos das variáveis estudadas sobre o fator de purificação. ....	73
<b>Figura 9.</b> Gráfico de Pareto para os efeitos das variáveis estudadas sobre o rendimento. ....	74
<b>Figura 10.</b> Reação de acoplamento do corante azul reativo 4 (a) com a membrana de quitosana (b). ....	86
<b>Figura 11.</b> Reação de acoplamento do corante vermelho reativo 120 (a) com a membrana de quitosana (b).....	87
<b>Figura 12.</b> Superfícies de resposta e curvas de contorno para avaliação do comportamento da adsorção de proteína em diferentes membranas e concentrações de quitosana e corantes, sendo (a) e (b) ACa, (c) e (d) ACv, (e) e (f) PESa, (g) e (h) PESv. ....	92
<b>Figura 13.</b> Esquema de separação magnética de afinidade da proteína. Fonte: CAO <i>et al.</i> , 2012. ....	98
<b>Figura 14.</b> Difratoograma de raios X das partículas das magnéticas sintetizadas.....	101
<b>Figura 15.</b> Teste de magnetização da partícula de ferro sintetizada. ....	101

## FLUXOGRAMA DO TRABALHO REALIZADO



## **CAPÍTULO I**

---

### **INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

A aplicação de enzimas em processos biotecnológicos e industriais é bastante ampla e diversificada, abrangendo diversas áreas. Um problema típico de qualquer indústria de transformação seja ela de alimentos, química, ou farmacêutica está na recuperação e purificação dos produtos envolvidos. Neste contexto, processos que permitam a recuperação e purificação de enzimas de forma eficiente e com baixos custos são extremamente desejáveis e representam uma área de pesquisa de grande interesse (RUIZ-RUIZ *et al.*, 2012).

A inulinase é uma enzima importante empregada em vários processos, como na produção de frutose pela hidrólise enzimática da inulina, na obtenção de fruto-oligossacarídeos (FOS) e na síntese de oligossacarídeos a partir da sacarose. Sua principal aplicação está relacionada à produção de xarope com alto teor de frutose (ETALLIBI e BARATTI, 2001; SANGEETHA *et al.*, 2005; RISSO *et al.*, 2010). A frutose também é amplamente utilizada, em substituição à sacarose, em muitos alimentos, medicamentos e bebidas (GILL *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2009). Os FOS 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).

Na produção de enzimas por processos biotecnológicos, como é o caso da inulinase, 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 da enzima, que devem ser incluídas no custo final do produto. Quanto mais alta a pureza necessária a uma dada proteína, mais custoso é o processo de purificação, o qual pode representar até 80 % dos custos finais de produção (GHOSH *et al.*, 2003; GALAEV e MATTIASSON, 2001; MORAES *et al.*, 2009).

A maior parte dos estudos publicados envolvendo purificação de inulinase utilizam processos cromatográficos (ZHANG *et al.*, 2004; SHARMA *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2009). No entanto, este processo é difícil de ser escalonado e possui um alto custo. Para minimizar estes custos, a otimização de metodologias rápidas e eficazes

para o processo de purificação são de grande importância (ISHIHARA e YAMAMOTO, 2005; MORAES e KALIL, 2009).

Em relação às técnicas que podem ser aplicadas na purificação de enzimas, de modo a maximizar a pureza sem acarretar maiores prejuízos no rendimento, destacam-se a precipitação com sais e solventes orgânicos, o emprego de sistema aquoso bifásico (SAB), membranas de afinidade e o uso de nanopartículas magnéticas.

Os processos de precipitação com sais, como o sulfato de amônio, e solventes são bastante utilizados em operações de concentração e pré-purificação de proteínas. No entanto, a elevação da força iônica do meio com a adição de altas concentrações salinas e o emprego de solventes orgânicos podem provocar a perda de atividade enzimática e suas adequações devem ser verificadas experimentalmente. Poucos estudos sistemáticos sobre o uso de sais e solventes no isolamento e pré-purificação de proteínas são encontrados na literatura até o presente momento (ZHANG *et al.*, 2004; CORTEZ e PESSOA Jr, 1999).

Quando pequenas quantidades de sal são adicionadas à uma solução contendo proteína, ocorre a redução da interação proteína-proteína, aumentando sua solubilidade no meio aquoso. Porém, em condições de elevada força iônica, as moléculas de água interagem mais fortemente com os íons provenientes da dissociação do sal, promovendo a desidratação das proteínas. Durante esse processo, a interação proteína-proteína se torna mais forte, diminuindo a solubilidade destas em meio aquoso, com consequente precipitação (CESAR, 2005; LIMA *et al.*, 2008; LEMES, 2011).

O princípio da precipitação com solventes orgânicos está vinculado às baixas constantes dielétricas (em comparação com a água) destes solventes, as quais proporcionam um aumento na atração entre as moléculas de proteínas, conduzindo a formação de agregados, que ao atingirem proporções macroscópicas, precipitam (CORTEZ e PESSOA Jr, 1999).

Os SAB são formados pela adição de dois polímeros solúveis em água ou um polímero solúvel em água e um componente de baixa massa molar, como sais inorgânicos (OLIVEIRA *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2007), que dependendo da composição podem dar origem a duas fases. Os SAB tem sido amplamente explorados para purificação de proteínas devido à alta concentração de água em ambas as fases, simulando o ambiente natural dos materiais biológicos, minimizando assim a chance de

que suas propriedades sejam alteradas no processo de transferência entre as fases, garantindo a manutenção das características biológicas das moléculas, evitando desnaturações (DEL-VAL e OTERO, 2003; PESSOA e KILIKIAN, 2005; SILVA e LOH, 2006; CARDOSO, 2007).

Para a purificação, o produto alvo deve estar localizado em uma fase distinta dos contaminantes. A partição do material biológico ocorre quando dois polímeros ou um polímero e um sal, são misturados em água acima de certas concentrações, ocorrendo a formação de duas fases imiscíveis, uma rica em polímero e a outra enriquecida no outro polímero ou sal (SHANG *et al.*, 2004).

Neste processo de purificação, a partição depende principalmente das propriedades físico-químicas das proteínas, tais como ponto isoelétrico e superfície de hidrofobicidade, e outras variáveis do meio, como massa molar do polímero, pH, tipo e a concentração do sal adicionado. Conhecendo e controlando estes fatores é possível maximizar a separação e recuperação de uma proteína (TUBIO *et al.*, 2004).

As membranas de afinidade foram desenvolvidas principalmente para superar os problemas de especificidade encontrados na utilização das membranas de ultrafiltração e microfiltração na purificação de proteínas (KLEIN, 2000). Segundo Zeng e Ruckenstein (1996), a característica mais importante das membranas de afinidade é o alto fluxo e baixa perda de carga, em comparação com baixa vazão e a alta perda de carga em colunas cromatográficas, o que a torna uma técnica interessante a ser avaliada na purificação de enzimas.

Uma estratégia recente e promissora na área de purificação de enzimas é a utilização de nanopartículas (NETTO *et al.*, 2012). A economia de tempo, fácil escalonamento e automotização, e a utilização direta para remover compostos alvo a partir de amostras brutas são algumas de suas vantagens. As nanopartículas magnéticas utilizadas na purificação de proteínas são muitas vezes imobilizadas com ligantes (por exemplo: de afinidade ou de pseudo-afinidade e grupos de troca iônica), de comprovada afinidade pela proteína alvo (FRANZREB *et al.*, 2006; CAO *et al.*, 2012).

De acordo com o exposto, e considerando a carência de estudos relacionados à precipitação com sais e solventes orgânicos, SAB, membranas de afinidade e o uso de nanopartículas na purificação da enzima inulinase, este trabalho propõe avaliar os parâmetros do processo de purificação e estabelecer a melhor sequência a ser utilizada

na purificação e recuperação da enzima inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, de modo a maximizar o rendimento e o fator de purificação.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Objetivou-se o estudo de diferentes estratégias de purificação da enzima inulinase produzida por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 por fermentação em estado sólido.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Estudar diferentes métodos de concentração e pré-purificação da enzima inulinase utilizando precipitação com sais e solventes orgânicos;
- Avaliar a purificação da inulinase utilizando diferentes sistemas aquosos bifásicos;
- Otimizar a purificação da enzima com o sistema aquoso bifásico pela técnica de planejamento experimental e análise de superfície de resposta;
- Avaliar o emprego de membranas de afinidade incorporadas com corantes na purificação de inulinase;
- Estudar o uso de nanopartículas magnéticas na concentração e purificação da enzima inulinase;
- Associar estratégias de *design* do processo *downstream*, combinando técnicas estudadas para obter a enzima com a máxima pureza e rendimento.

## 1.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAO, M.; LI, Z.; WANG, J.; GE, W.; YUE, T.; LI, R.; COLVIN, V. L.; YU, W. W. **Food related applications of magnetic iron oxide nanoparticles: Enzyme immobilization, protein purification, and food analysis.** Trends in Food Science & Technology, p. 1-10, 2012.
- CARDOSO, M.V.C. **Efeito do centro metálico nas interações intramoleculares dos complexos [M(CN)5NO]x- com o poli(óxido de etileno) em sistema aquoso bifásico.** Dissertação (Mestrado em Agroquímica), Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 2007.
- CESAR, A.C.W. **Análise de viabilidade econômica de um processo de extração e purificação da bromelina do abacaxi.** Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2005.
- 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.
- CORTEZ E.V.; PESSOA A. JR. **Xylanase and  $\beta$ -xylosidase separation by fractional precipitation.** Process Biochemistry, v. 35, p. 277-283, 1999.
- DEL-VAL, M.I.; OTERO, C. **Biphasic aqueous media containing polyethylene glycol for the enzymatic synthesis of oligosaccharides from lactose.** Enzyme and Microbial Technology, v. 33, p. 118-126, 2003.
- 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.
- FRANZREB, M., SIEMANN-HERZBERG, M., HOBLEY, T. J., & THOMAS, O. R. T. **Protein purification using magnetic adsorbent particles.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 70, p. 505-516, 2006.
- 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.
- 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.; 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.
- 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.
- KLEIN, E. **Affinity membranes: a 10-year review.** Journal of Membrane Science, v. 179, p. 1-27, 2000.

- LEMES, A.C. **Purificação de  $\beta$ -galactosidase: design do processo.** Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, 2011.
- LIMA, M.R.; SILVA, V.P.A.; FURTADO, R.F.; ALVES, C.R.; GUEDES, M.I.F.; DUTRA, R.A.F. **Purificação de ricina a partir de saturação com sulfato de amônio.** 3º Congresso Brasileiro de Mamona, 2008.
- MORAES, C. C.; KALIL, S. J., **Strategy for a protein purification design using C-phycoyanin extract,** *Bioresource Technology*, v. 100, p. 5312–5317, 2009.
- NETTO, C. G.C.M.; TOMA, H. E.; ANDRADE, L. H. **Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, doi:10.1016/j.molcatb.2012.08.010, 2012.
- OLIVEIRA, R. M.; COIMBRA, J. S. D. R.; FRANCISCO, K. R.; MINIM, L. A.; DA SILVA, L. H. M.; PEREIRA, J. A. M. **Liquid-Liquid Equilibrium of Aqueous Two-Phase Systems Containing Poly(ethylene) Glycol 4000 and Zinc Sulfate at Different Temperatures.** *Journal of Chemical & Engineering*, v. 53, p. 919–922, 2008.
- PESSOA, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos,** São Paulo, SP: Editora Manole, 2005.
- RISSO F.V.A., MAZUTTI M.A., TREICHEL H., COSTA F., MAUGERI F., RODRIGUES M.I. **Synthesis of fructooligosaccharides from sucrose in aqueous & aqueous-organic systems using free inulinase from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045.** *Industrial Biotechnology*, v. 6, p. 288-294, 2010.
- RUIZ-RUIZ, F.; BENAVIDES, J.; AGUILAR, O.; RITO-PALOMARES, M. **Aqueous two-phase affinity partitioning systems: Current applications and trends.** *Journal of Chromatography A*, v. 1244, p. 1–13, 2012.
- 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, J.A.; AMARAL, M.C.O.; ARAÚJO, T.A.S.; FERNANDES, K. G. C.; CHAVES, A.C.; MORAIS, M. M. C. **Isolation of a lipase-producing *Trichosporon spp* and enzyme extraction by two-phase aqueous system.** *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 62-64, 2007.
- SHANG, Q.K.; LI, W.; JIA, Q.; LI, D.Q. **Partitioning behavior of amino acids in aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and phosphate buffer.** *Fluid Phase Equilibria*, v. 219, p.195-203, 2004.
- SHARMA, A. 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.
- SILVA, L.H.M; LOH, W. **Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas.** *Química Nova*, v. 29, p. 1345-1351, 2006.
- TUBIO, G.; NERLI, B.; PICÓ, G. **Relationship between the protein surface hydrophobicity and its partitioning behaviour in aqueous two-phase systems of polyethyleneglycol-dextran.** *Journal Chromatography B*, v. 799, p. 293-301, 2004.

ZENG, X.; RUCKENSTEIN, E., **Supported chitosan-dye affinity membranes and their protein adsorption.** *Journal of Membrane Science*, v. 117, p. 271-278, 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.

## **CAPÍTULO II**

---

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma revisão sobre inulinase, enzima de interesse deste trabalho, incluindo definição, aplicações e purificação desta enzima.

### 2.1 ENZIMAS

Enzimas são uma classe de moléculas que catalisam uma grande variedade de reações com alta eficiência catalítica e especificidade sob condições moderadas (pH, temperatura, solventes, força iônica), com isso resultam em menores problemas ambientais e toxicológicos quando comparadas com catalisadores químicos (SANTOS, 2007).

O uso prático de enzimas tem sido realizado em vários processos industriais, e está sendo expandido em novos campos, como na síntese química, em produtos farmacêuticos, alimentos, biossensores e células de biocombustível (KIM *et al.*, 2006; FENG e JI, 2011).

Para a produção comercial de uma enzima, fatores como micro-organismos de alto rendimento, matérias-primas baratas e viabilidade de ampliação devem ser considerados (SINGH *et al.*, 2006).

Cerca de 4.200 enzimas estão listadas no *Enzyme Nomenclature Database*. Destas apenas cerca de 50-100 são usadas em escala industrial. A princípio, cada organismo é uma fonte potencial de enzimas, mas para aplicações industriais, tanto a estabilidade quanto os rendimentos devem ser adequados. Após ser descoberta uma nova enzima, esta precisa ser caracterizada em níveis bioquímicos e moleculares. Para este fim, a enzima precisa ser purificada de todos os constituintes celulares a ela associados, tais como outras proteínas, sais e inibidores produzidos durante o período de produção (LINKE e BERGER, 2011).

### 2.2 A ENZIMA INULINASE E SUA IMPORTÂNCIA TECNOLÓGICA

A inulina é constituída por cadeias lineares de  $\beta$ -2,1-D-fructofuranose por moléculas terminadas com um resíduo de glicose por uma ligação de sacarose na extremidade redutora (CHI *et al.*, 2011). É uma polifructana, que é acumulada em raízes e tubérculos

de diversas plantas, tais como a alcachofra de Jerusalém, tubérculos de dália, raiz de chicória e yacon (SHENG *et al.*, 2007; YU *et al.*, 2009). Os materiais secos destes tubérculos contêm mais de 50 % de inulina (PANDEY *et al.*, 1999).

As inulinas são classificadas como hidrolases e são denominadas como sendo 2,1- $\beta$ -D-frutano-furohidrolases (EC 3.2.1.7) (CAZETTA *et al.*, 2005). Segundo Ettalibi e Baratti (2001) as inulinas hidrolisam a inulina, liberando moléculas de frutose, a qual é amplamente utilizada na indústria farmacêutica, em muitos alimentos e bebidas, substituindo a sacarose, e também pode ser convertida em etanol por fermentação.

A inulina e a inulinase podem ser utilizadas para: *i*) a produção de xaropes com alta concentração de frutose, contendo mais de 95 % de D-frutose, obtida por hidrólise exoenzimática, *ii*) a produção de xaropes de oligofrutose, obtidos por hidrólise endoenzimática e *iii*) na produção de etanol por fermentação (GONG *et al.*, 2007, CHEN *et al.*, 2007; YU *et al.*, 2009).

O xarope de frutose tem efeitos benéficos em pacientes diabéticos, aumenta a absorção de ferro em crianças, tem elevada capacidade adoçante, podendo ser usado na dieta de pessoas obesas, estimula a absorção de cálcio em mulheres pós-menopáusicas e estimula o crescimento de bifidobactérias no intestino grosso e delgado (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).

Outra aplicação da enzima inulinase é 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 são amplamente utilizados na substituição de açúcares em muitas aplicações alimentares, como em produtos de confeitaria, chocolate e produtos lácteos (GILL *et al.*, 2006).

As inulinas podem ser divididas em exo-inulinas e endo-inulinas. As exo-inulinas (2,1  $\beta$ -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, permitindo a produção de oligossacarídeos. As endo-inulinas ( $\beta$ -D-frutano-frutano-hidrolase; 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).

Nos últimos anos inulinases microbianas ganharam muita atenção por serem uma importante classe de enzimas industriais. Estas podem ser produzidas por muitos micro-organismos, incluindo as estirpes de *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Kluyveromyces* sp. (TRIVEDI *et al.*, 2012). 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, ou seja, elevado potencial de aplicação pelo setor de biotecnologia (LANE e MORRISSEY, 2010). A produção de inulinase por micro-organismos, além de reduzir custos de produção melhora a qualidade do xarope em comparação ao xarope com alto teor de frutose de milho, produzido a partir de amido (XIONG *et al.*, 2007).

### 2.3 RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS

O interesse crescente pelos processos de purificação de biomoléculas deve-se principalmente ao desenvolvimento da biotecnologia e à demanda das indústrias farmacêutica e química por produtos com alto grau de pureza. A indústria de alimentos também apresentou aumento no uso de biomoléculas, como enzimas e proteínas, principalmente em processos de fermentação, como cervejarias (ZUNIGA *et al.*, 2003).

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 ao meio em que se encontram, as operações de separação e purificação de bioprodutos, neste caso principalmente de proteínas, por serem complexas, requerem muita atenção para que permitam a manutenção da integridade conformacional e funcional das mesmas (SARKAR *et al.*, 2009; LIN *et al.*, 2008; TUNG *et al.*, 2007).

As proteínas são de interesse para as funções nutritivas e benéficas à saúde dos humanos. A separação e purificação de proteína possui uma grande demanda na área da biomedicina, biociências e alimentos. As técnicas mais utilizadas para a purificação de proteínas são a cromatografia preparativa, precipitação, ultrafiltração, centrifugação e diálise, as quais possuem algumas limitações, tais como: 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 (CAO *et al.*, 2012; HUANG *et al.*, 2009; IBÁÑEZ *et al.*, 2007).

Estratégias de purificação representam 80 % dos custos finais em bioprocessos (ROSA *et al.*, 2007; MAESTRO *et al.*, 2008). Além disso, a maioria das unidades de operação que compõem um processo de biotecnologia está focada na recuperação e purificação do produto de interesse. Neste contexto, o desenvolvimento de estratégias para otimização de processos eficientes e econômicos de *downstream* representam uma área de pesquisa de grande interesse (RUIZ-RUIZ *et al.*, 2012).

O grande desafio dos processos de purificação de proteínas é o exaustivo trabalho de desenvolvimento para adequar a melhor técnica ao processo, a transferência da metodologia para a escala de produção, garantindo que o produto final tenha todas as características estabelecidas anteriormente para seu posterior uso (HO *et al.*, 2000).

#### 2.4 RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE INULINASE

Na produção de inulinases por processos biotecnológicos 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 empregam em seus processos técnicas cromatográficas, como é o caso de Santos (1998) que purificou a enzima inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus* por precipitação em etanol 70 %, ressuspensão 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 realizada 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. A isoterma de adsorção permitiu a determinação da capacidade máxima de adsorção (1428 U/mL) e a constante de dissociação (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, utilizando os mesmos parâmetros, foi encontrado 5.000 U/mL para capacidade máxima de adsorção e 0,05 U/mL para a constante de dissociação, e um coeficiente de correlação de 0,99. Os resultados demonstram que o tampão tris-HCl proporcionou uma capacidade de adsorção cerca de 3,5 vezes superior à observada para 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 vezes. Para o tampão tris-HCl, empregando uma solução de NaCl 0,3 M como eluente, a recuperação foi de 19 %, com um fator de purificação de 2,6 vezes.

Assim como Santos (1998) e Makino *et al.* (2005), Otha *et al.* (2002) relataram a purificação de inulinase extracelular de *Rhizopus* sp. empregando mais de uma etapa de purificação. Empregando a ultrafiltração (massa molecular de corte 20.000) seguida de técnicas cromatográficas (DEAE-Cellulofine A-500 e Sephacryl S-200 HR), obtiveram um fator de purificação de 12 vezes e um rendimento de 0,57 %.

Nas técnicas cromatográficas é comum o emprego da precipitação com sulfato de amônio como uma primeira etapa de concentração e purificação da enzima. Zhang *et al.* (2004) avaliaram a purificação de inulinase recombinante de *Pichia pastoris* pela 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. Os ensaios de eletroforese indicaram uma massa molar de 83 kDa. Gill *et al.* (2006) também utilizaram a precipitação em sulfato de amônio seguida de sucessivas etapas cromatográficas 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* do caldo de

cultura inicial, obtendo uma purificação de 74 vezes, com um rendimento de atividade de 3,2 %. Sharma *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 %.

Kalil *et al.* (2005) estudaram a purificação da inulinase, obtida pela fermentação de meio sintético por *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgarius* ATCC 16045, diretamente do caldo bruto, mediante o emprego de coluna de leito expandido utilizando a resina STREAMLINE SP como meio adsorvente, 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 empregando uma 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 observado 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 separação cromatográfica em uma coluna Mono Q Sepharose anionic, obtendo uma recuperação de 51 % e um fator de purificação de 12,3 vezes.

Golunski (2011) investigou o isolamento e purificação da enzima inulinase produzida por *Kluyveromices marxianus* em fermentação em estado sólido utilizando técnicas de precipitação com etanol e ultrafiltração. O desempenho da ultrafiltração foi avaliado por sistema de escoamento tangencial e transversal. 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 para 2,90 vezes quando a concentração de 4,5 mol/L de NaCl foi utilizada em uma célula de escoamento transversal, com membrana de 100 kDa. Os efeitos da concentração e da vazão de etanol ao extrato bruto sobre o rendimento e o fator de purificação foram avaliados utilizando a técnica de planejamento experimental. A precipitação proporcionou a ativação da enzima, aumentando o fator de purificação em até 2 vezes. Após precipitação com 55 % de etanol adicionado ao extrato a uma vazão de 10 mL/min, e posterior ultrafiltração com membrana de 100 kDa, foi possível obter um fator de purificação da inulinase de 5,5 vezes.

El-souod *et al.* (2014) avaliaram a purificação da inulinase extracelular de *Ulocladium atrum* utilizando precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose. Os autores obtiveram uma purificação de até 3,43 vezes sobre o extrato bruto com 24,2 % de recuperação.

## 2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- CAO, M.; LI, Z.; WANG, J.; GE, W.; YUE, T.; LI, R.; COLVIN, V. L.; YU, W. W. **Food related applications of magnetic iron oxide nanoparticles: Enzyme immobilization, protein purification, and food analysis.** Trends in Food Science & Technology, p. 1-10, 2012.
- CAZETTA, M.L.; MARTINS, P.M.M.; MONTI, R.; CONTIERO, J. **Yacon (*Polymnia sanchifolia*) extract as a substrate to produce inulinase by *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*.** Journal of Food Engineering, v. 66, p. 301–305, 2005.
- CHEN, X.; WANG, J.H.; LI, D.S. **Optimization of solid-state medium for the production of inulinase by *Kluyveromyces S120* using response surface methodology.** Biochemical Engineering Journal, v. 34, p. 179–184, 2007.
- 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.
- 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.
- CHI, Z.; ZHANG, T.; CAO, T.; LIU, X.; CUI, W.; ZHAO C. **Biotechnological potential of inulin for bioprocesses.** Bioresource Technology, v. 102, p. 4295–4303, 2011.
- EL-SOUOD, S. M. A.; MOHAMED, T. M.; ALI, E. M.M.; EL-BADRY, M. O.; EL-KEIY, M. M. **Partial purification of extracellular exo-inulinase from *Ulocladium atrum*.** Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, v. 12, p. 15–20, 2014.
- 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.
- FENG, W.; JI, P. **Enzymes immobilized on carbon nanotubes.** Biotechnology ADVANCES, v. 29, p. 889–895, 2011.
- 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.
- GONG, F.; SHENG, J.; CHI, Z.M.; LI, J. **Inulinase production by a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the crude inulinase.** Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, v. 34, p. 179–185, 2007.
- GOLUNSKI, S.M. **Purificação de inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 produzida por fermentação em estado sólido utilizando precipitação e ultrafiltração.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI – Campus de Erechim, Erechim, RS, 2011.

- HO, P.L.; KITAHARA, E.; OGAWA, D.M.O.; SILVA, A.R.B.P.; RAMOS, C.R.R.; NASCIMENTO, A.L.T.O. **A arte de purificar proteínas: uma nova tecnologia cromatográfica para uso biotecnológico.** Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento, v. 13, p. 24-26, 2000.
- 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.
- 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.
- 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.
- KIM, J.B.; GRATE, J.W.; WANG, P. **Nanostructures for enzyme stabilization.** Chemical Engineering Science, v. 61, p. 1017–1026, 2006.
- LANE, M. M.; MORRISSEY, J. P. ***Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister’s shadow.** Fungal Biology Reviews, Fungal biology reviews, v. 24, p. 17 – 26, 2010.
- 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.
- LINKE, D.; BERGER, R.G. **Foaming of proteins: New prospects for enzyme purification processes.** Journal of Biotechnology, v. 152, p. 125–131, 2011.
- MAESTRO, B.; VELASCO, I.; CASTILLEJO, I.; ARÉVALO-RODRÍGUEZ, M.; CEBOLLA, Á.; SANZA, J.;M. **Affinity partitioning of proteins tagged with choline-binding modules in aqueous two-phase systems.** Journal of Chromatography A, v. 1208, p. 189–196, 2008.
- MAKINO, Y.; LIMA, P. S.; FILHO, C. F. M. AND RODRIGUES M. I. **Adsorption of the inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 on STREAMLINE® DEAE resin,** Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 22, nº. 04, p. 539 - 545, 2005.
- 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.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, V.T.; KRIEGER, N.; JOSE, D. **Recent developments in microbial inulinases, its production, properties and industrial applications.** Appl. Biochem. Biotechnol. v. 81, p. 35–52, 1999.
- 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.
- ROSA, P.A.J.; AZEVEDO, A.M.; FERREIRA, I.F.; VRIES, J. DE; KORPORAAL, R.; VERHOEF, H.J.; VISSER, T.J.; AIRES-BARROS, M.R. **Affinity partitioning of**

- human antibodies in aqueous two-phase systems.** Journal of Chromatography A, v. 1162, p. 103–113, 2007.
- RUIZ-RUIZ, F.; BENAVIDES, J.; AGUILAR, O.; RITO-PALOMARES, M. **Aqueous two-phase affinity partitioning systems: Current applications and trends.** Journal of Chromatography A, v. 1244, p. 1–13, 2012.
- 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.
- SANTOS, J.A.; AMARAL, M.C.O.; ARAÚJO, T.A.S.; FERNANDES, K. G. C.; CHAVES, A.C.; MORAIS, M. M. C. **Isolation of a lipase-producing *Trichosporon spp* and enzyme extraction by two-phase aqueous system.** Brazillian Journal of Microbiology, v. 38, p. 62–64, 2007.
- 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.
- 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.M.; LI, J.; GAO, L.M.; GONG, F. **Inulinase production by the marine yeast *Cryptococcus aureus G7a* and inulin hydrolysis by the crude inulinase.** Process Biochemistry, v. 42, p. 805–811, 2007.
- SINGH, R.S.; DHALIWAL, R.; PURI, M. **Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus YS-1* using root extract of *Asparagus racemosus*.** Process Biochemistry, v. 41, p. 1703–1707, 2006.
- 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.
- TRIVEDI, S.; DIVECHA, J.; SHAH, A. **Optimization of inulinase production by a newly isolated *Aspergillus tubingensis* CR16 using low cost substrates.** Carbohydrate Polymers, 2012. DOI.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.068
- 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.
- XIONG, C.; JINHUA, W.; DONGSHENG, L. **Optimization of solid-state medium for the production of inulinase by *Kluyveromyces S120* using response surface methodology.** Biochemical Engineering Journal, v. 34, p. 179–184, 2007.
- YU, X.; GUO, N.; CHI, Z.; GONG, F.; SHENG, J.; CHI, Z. **Inulinase overproduction by a mutant of the marine yeast *Pichia guilliermondii* using surface response methodology and inulin hydrolysis,** Biochemical Engineering Journal, v. 43, p. 266–271, 2009.

- 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.
- ZUNIGA, A. D. G.; PEREIRA, J.A.M.; COIMBRA, J.S.R.; MINIM, L.A.; ROJAS, E.E.G. **Revisão: Técnicas Usadas no Processo de Purificação de Biomoléculas**. *Boletim do Ceppa*, v.21, n.1, p. 61-82, 2003.

## **CAPÍTULO III**

---

### **PRODUÇÃO DE INULINASE**

### 3.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

As enzimas de origem microbiana, em particular as oriundas de leveduras, possuem muitas vantagens sobre as equivalentes de origem animal ou vegetal, como o menor custo de produção, a possibilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais, além de oferecer um amplo espectro de características físico-químicas (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

A levedura *Kluyveromyces marxianus* pode ser utilizada na produção da enzima inulinase com a vantagem de ser reconhecida como segura (GRAS), podendo ser utilizada na produção de alimentos e fármacos sem oferecer riscos (MAZUTTI *et al.*, 2007; 2006).

#### 3.1.1 Levedura *Kluyveromyces marxianus*

A levedura *Kluyveromyces marxianus* apresenta diversas características que a tornam uma excelente opção para a produção industrial, como seu bom rendimento de crescimento em uma ampla faixa de temperatura. Esta espécie pode ser cultivada em temperaturas elevadas, de até 52 °C, reduzindo a necessidade de controles de contaminação no cultivo comercial, pois a maioria dos organismos encontrados em um ambiente industrial não crescem nesta temperatura (PECOTA *et al.*, 2007).

Muitas estirpes de *K. marxianus* podem crescer em uma ampla variedade de fontes de carbono de baixo custo e necessitam de poucos nutrientes adicionais, tornando-os economicamente atraentes para os processos comerciais (PECOTA *et al.*, 2007).

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).

Diversos trabalhos têm sido publicados sobre a produção e os efeitos das condições de cultivo sobre a produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* (MAZUTTI *et al.*, 2010; ASTOLFI *et al.*, 2011; SINGH *et al.*, 2007).

### 3.1.2 Produção de inulinase

A produção de inulinase por fermentação no estado sólido (FES) tem atraído muita atenção devido a alta produtividade, simples operação, relação custo-eficácia e uma melhor recuperação do produto (SINGHANIA *et al.*, 2009).

As inulinasas comerciais são obtidas empregando inulina como substrato, a qual é uma matéria prima de alto valor agregado. Dentre os substratos industriais destacam-se os resíduos gerados pelas indústrias de processamento de cana de açúcar e milho, onde o Brasil destaca-se 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 a produção 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 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 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 superior à observada por Santos (1998).

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

Bender *et al.* (2006) avaliaram o emprego de bagaço de cana na produção de inulinase empregando o micro-organismo *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. Foram investigados, mediante planejamento de experimentos, os efeitos da temperatura de fermentação, umidade inicial do bagaço, concentração de melaço de cana e concentração de água de maceração de milho (AMM). A máxima atividade encontrada foi de 445 U/g em 72 horas de fermentação, com 23,4 % de AMM (m/m– 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 associaram esta 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/gss 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 em relação aos observados por 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/gss 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 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, foi obtido 410 U/gss de atividade enzimática. Todos os experimentos foram realizados a 30 °C por 72 horas, com a umidade inicial dos substratos 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 empregando alho como

fonte de carbono, comum a máxima produção de enzima de 117 U/gss 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/gss 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/gss após 120 horas de fermentação. As condições operacionais foram definidas como sendo: 60,5% de umidade inicial dos substratos, 2,5 % de volume de inoculo, 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 significativamente o desempenho do processo. A melhor condição para produção da enzima foi em temperatura e vazão volumétrica de ar de entrada de 30 °C e 3 m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup>, respectivamente, alcançando uma atividade de 463 U/gss. Os resultados obtidos pelos autores mostram que o biorreator de leito fixo é tecnicamente viável para a produção de inulinase.

Astolfi *et al.* (2011) estudaram 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 U/gss), cuja atividade corresponde a uma produtividade obtida de 24,4 U.gss<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

Dilipkuma *et al.* (2013) avaliaram a produção de inulinase utilizando fermentação em estado sólido em reator de leito fixo. *Kluyveromyces marxianus var. marxianus* foi utilizado para produzir a enzima inulinase. Parâmetros tais como a taxa de fluxo do ar, a densidade de embalagem e o tamanho das partículas foram otimizados utilizando a metodologia de superfície de resposta a fim de maximizar a produção da enzima. As condições ótimas para a máxima produção de inulinase foram: taxa de fluxo de ar - 0,82 min<sup>-1</sup>, a densidade de embalagem - 40 g/L e o tamanho das partículas - 0,0044 milímetros. Nestas condições otimizadas, a produção de inulinase de 300,5 U.gss<sup>-1</sup>.

No decorrer do estudo de produção da enzima inulinase a fermentação em estado sólido em biorreator de leito fixo demonstrou ser uma proposta promissora. Além disso, a levedura *Kluyveromyces marxianus* demonstrou bons rendimentos de atividade nos trabalhos avaliados. Neste contexto, objetivou-se a produção da enzima inulinase por fermentação em estado sólido em biorreator de leito fixo com capacidade operacional de 3 kg (base seca) utilizando a levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Produção de inulinases

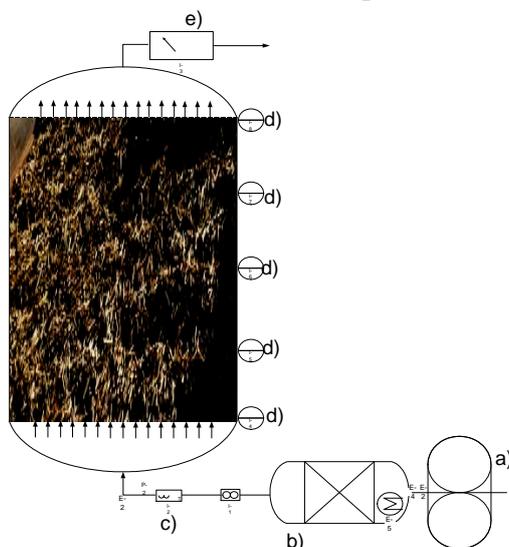
O micro-organismo utilizado foi a levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, a qual foi previamente reportada como produtora de inulinase e é pertencente ao grupo GRAS (*Generally Recognized as Safe*) (MAZUTTI *et al.*, 2007). O micro-organismo foi mantido a 4 °C em ágar YM contendo: 3 g/L de extrato de levedura, 3g/L de extrato de malte, 5 g/L de peptona, 10 g/L de glicose e 20 g/L de ágar. O meio para o

pré-inóculo contém: 5 g/L de extrato de levedura, 20 g/L sacarose, 5 g/L de  $K_2HPO_4$ , 1,5 g/L de  $NH_4Cl$ , 1,15 g/L de  $KCl$  e 0,65 g/L de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ . Cada tubo de meio YM foi utilizado para inocular um erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio, o qual foi incubado a 30 °C, por 24 horas (MAZUTTI *et al.*, 2007).

O meio sólido usado como substrato na fermentação em estado sólido (FES), para a produção de inulinase, foi composto por bagaço de cana suplementado com 15 % (m/m) de melão de cana pré-tratado, 30 % (m/m) de água de maceração de milho (AMM) e 20 % (m/m) de farelo de soja, cuja composição foi definida em trabalhos anteriores, conduzidos 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, de maneira a uniformizar o tamanho de partículas. A AMM foi adquirida na Corn Products Internacional – Mogi Guaçu (SP); o melão de cana foi adquirido na Refinaria Éster – Campinas (SP) e o farelo de soja adquirido na empresa Olfar – Erechim (RS). A umidade inicial dos substratos foi corrigida para 65 %, definida como ótima em trabalho anterior (MAZUTTI *et al.*, 2006). O melão de cana, na concentração de 200 g/L, foi pré-tratado 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 x 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 de 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 se obter um 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 1 apresenta um diagrama esquemático do biorreator de leito fixo utilizado no desenvolvimento deste trabalho.

**Figura 1.** 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 CO<sub>2</sub>, temperatura e umidade.



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

Após as fermentações no biorreator de leito fixo, a atividade de inulinase foi determinada em três diferentes alturas do biorreator, com coleta de amostras entre 0-10 cm, 10-30 cm e 30-40 cm.

A inulinase foi extraída do meio pela adição de 100 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,8, seguido de 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 3.2.2.

### 3.2.2 Atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada empregando uma diluição na proporção de 1 mL de extrato enzimático para 9 mL de água de água destilada. Foi adicionado 0,5 mL desta solução diluída em 4,5 mL de uma solução 2 % (m/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  $\mu\text{mol}$  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 RESULTADOS E DISCUSSÃO

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 umidades entre as mesmas (MAZUTTI *et al.*, 2010). As amostras foram coletadas entre 0-10 cm, 10-30 cm, e 30-40 cm e suas respectivas atividades estão apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Produção de inulinase por FES em biorreator de leito fixo em termos de atividade enzimática em cada uma das zonas dentro do biorreator.

<b>Batelada 1</b>		<b>Batelada 2</b>	
<b>Zonas do biorreator</b>	<b>Atividade U/gss</b>	<b>Zonas do biorreator</b>	<b>Atividade U/gss</b>
Superior (30-40 cm)	658,8	Superior (30-40 cm)	553,4
Intermediária (10-30 cm)	332,9	Intermediária (10-30 cm)	348,3
Inferior (0-10 cm)	117,3	Inferior (0-10 cm)	145,6

A máxima produção da enzima inulinase foi obtida na zona superior do biorreator para ambas as fermentações (658,8 U/gss e 553,4 U/gss). A produção da enzima aumentou proporcionalmente com 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. As massas de material fermentado em ambos biorreatores foram, independentemente, homogeneizadas e submetidas a uma etapa de extração, com tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,8, gerando os extratos 1 e 2. Para a extração empregou-se uma proporcionalidade de 30 g de material fermentado para 100

mL de tampão. O extrato enzimático obtido na batelada 1 foi utilizado para os testes de precipitação, mudança de força iônica e teste preliminares do sistema aquoso bifásico, já o extrato proveniente da batelada 2 foi utilizado para o restante do trabalho.

De acordo com os dados apresentados, as atividades encontradas são comparáveis àquelas obtidas por Xiong *et al.* (2007), com atividade máxima de 410 U/gss 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/gss após 24 horas de fermentação.

### 3.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

Nesta primeira etapa do trabalho foi possível produzir a enzima inulinase por fermentação em estado sólido utilizando como substratos, água de maceração de milho, farelo de soja, bagaço de cana e melaço de cana, juntamente com a levedura *kluyveromyces marxianus*. As atividades enzimáticas obtidas durante as fermentações foram semelhantes às encontradas na literatura para a levedura e os substratos utilizados.

## 3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASTOLFI, V.; JORIS, J.; VERLINDO, R.; OLIVEIRA, J.V.; MAUGERI, F., M. A.; MAZUTTI, OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. **Operation of a fixed-bed bioreactor in batch and fed-batch modes for production of inulinase by solid-state fermentation.** Biochemical Engineering Journal, v. 58–59, p. 39–49, 2011.
- 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.
- 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.
- DILIPKUMAR, M.; RAJAMOHAN, N. RAJASIMMAN, M. **Inulinase production in a packed bed reactor by solid state fermentation.** Carbohydrate Polymers, v. 96, p. 196–199, 2013.
- GARCIA, R., **Combustíveis e combustão industrial.** Editora Interciência, Rio de Janeiro, 2002.
- 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.
- 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.
- KALIL, S. J.; SUZANA, 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.
- 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.; CENIG, 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.

- MILLER, G. L., **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** Analytical Chemistry, v. 31, p. 426-428, 1959.
- PECOTA, D. C.; RAJGARHIA, V.; DA SILVA, N. A. **Sequential gene integration for the engineering of *Kluyveromyces marxianus*.** Journal of Biotechnology, v. 127, p. 408–416, 2007.
- 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.
- 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.
- 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.
- SINGHANIA, R. R., PATEL, A. K., SOCCOL, C. R., & PANDEY, A. **Recent advances in solid-state fermentation,** Biochemical Engineering Journal, v. 44, p. 13–18, 2009.
- 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.
- XIONG, C.; JINHUA, W.; DONGSHENG, L. **Optimization of solid-state medium for the production of inulinase by *Kluyveromyces* S120 using response surface methodology.** Biochemical Engineering Journal, v. 34, p. 179–184, 2007.

## **CAPÍTULO IV**

---

### **PURIFICAÇÃO DE INULINASE POR PRECIPITAÇÃO**

## 4.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 4.1.1 Precipitação por solventes

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.

Sendo a precipitação uma forma eficaz de atingir certo grau de purificação, como no caso do processamento de enzimas extracelulares (GILL *et al.*, 2006; CUI *et al.*, 2007), 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).

Muitos solventes orgânicos miscíveis em água são capazes de precipitar enzimas. Devido às suas constantes dielétricas baixas (em comparação com a água), os solventes orgânicos possibilitam um aumento na atração entre as moléculas de proteína, conduzindo a formação de agregados, os quais ao atingirem proporções macroscópicas precipitam. Esse fenômeno tem sido descrito como a remoção de água das esferas de hidratação das proteínas. Neste caso, a água é removida tanto por substituição em massa pelo solvente orgânico, quanto por estruturação de toda a molécula orgânica. Como consequência, a constante dielétrica é reduzida. As áreas hidrofóbicas da proteína tendem a tornarem-se mais solúveis, mas, como indicado pela teoria de solubilidade, isto leva a uma redução na solubilidade da proteína no meio aquoso (CORTEZ e PESSOA Jr, 1999).

A técnica de precipitação de proteínas com sais é considerada uma ferramenta importante para pré-concentração de proteínas. Este processo promove a separação das proteínas da maioria dos demais compostos do meio, facilitando os processos subsequentes (MARTINS, 2001). A pré-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).

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 são encontrados na literatura (ZHANG *et al.*, 2004; CORTEZ e PESSOA Jr *et al.*, 1999).

Cortez e Pessoa Jr (1999) realizaram a separação de xilanase e  $\beta$ -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  $\beta$ -xilosidase com o comportamento de xilanase total presentes no meio. A análise por eletroforese demonstrou que as enzimas podem ser seletivamente separadas do meio, de acordo com suas massas molares, pela precipitação com etanol. Os resultados obtidos neste trabalho (74 % de  $\beta$ -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 massas molares de corte proporcionaram um aumento 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.

Golunski *et al.* (2011a) utilizaram precipitação com etanol como uma etapa para a purificação da enzima inulinase produzida por *Kluyveromyces marxianos*. Os efeitos da concentração de etanol e de sua taxa de adição ao extrato bruto foram avaliados utilizando a técnica de planejamento experimental. A precipitação proporcionou uma ativação da enzima com um fator de purificação de até 2,5 vezes e um rendimento de atividade de 168,48 %, utilizando uma concentração de 55 % de etanol e uma vazão de 19,9 mL/min.

Soares *et al.* (2012) purificaram bromelaína, um extrato aquoso de ananás que contém uma mistura complexa de proteases, utilizando precipitação com etanol. Os resultados mostraram que a bromelaína foi recuperada usando etanol nas concentrações de 30 e 70 %, com fator de purificação de 2,8 vezes e um rendimento da atividade de 98 %.

Durante o desenvolvimento deste estudo foi possível constatar que as técnicas de precipitação são aplicadas nos estágios iniciais das operações de *downstream*, reduzindo o número de estágios posteriores.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo desenvolver uma estratégia de isolamento e pré-purificação da enzima inulinase, baseada na mudança de força iônica do meio seguida de precipitação com álcoois n-propílico e iso-propílico.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Pré-concentração do extrato enzimático por precipitação

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. O solvente refrigerado (álcool n-propílico ou iso-propílico) foi adicionado, 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 e sob agitação constante durante todo o processo. Após a adição do solvente, o precipitado resultante foi centrifugado a 10.000 x g 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 (sobrenadante e precipitado), conforme procedimento descrito nos itens 4.2.2 e 4.2.3. Os efeitos da concentração do solvente orgânico 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  $2^2$  (DCCR), totalizando 11 experimentos.

As faixas de concentração e vazão estudadas estão apresentadas na Tabela 2. Os níveis foram definidos com base em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa (RISSO *et al.*, 2009; GOLUNSKI *et al.*, 2011a). Os resultados foram analisados utilizando o programa Statistica 8.0 (Stat Soft Inc. Tulsa, OK, EUA).

**Tabela 2.** Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo  $2^2$ , para otimização da recuperação enzimática.

<b>Variáveis Independentes / Níveis</b>	<b>-1,41</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>	<b>+1,41</b>
Concentração de álcool (%)	10	22	50	78	90
Vazão (mL/min)	0,1	3,0	10	17	19,9

#### 4.2.2 Precipitação com sais com posterior precipitação com solventes

Para os ensaios de mudança da força iônica do meio, foram utilizados os sais NaCl e CaCl<sub>2</sub> nas concentrações de 0,05; 0,1 e 0,5 mol/L. Para o NaCl a força iônica é igual à concentração do sal. Para as soluções de CaCl<sub>2</sub>, as forças iônicas equivalentes a cada concentração estudada são 0,26; 0,60 e 3,0 mol/L, respectivamente. Após a adição das diferentes soluções salinas ao extrato enzimático bruto, a solução resultante foi submetida à precipitação com os álcoois (n-propílico e iso-propílico), nas condições otimizadas pelo planejamento de experimentos. Após a adição dos álcoois, o precipitado resultante foi centrifugado a 10.000 x g durante 15 min a 5 °C. O precipitado obtido foi recolhido e dissolvido em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,8. A atividade da enzima e proteína total foi determinada em todas as frações.

### 4.2.3 Atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada empregando uma diluição na proporção de 1 mL de extrato enzimático para 9 mL de água destilada. Desta solução retirou-se 0,5 mL, os quais foram adicionados a 4,5 mL de uma solução 2 % (m/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).

### 4.2.4 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 (Sigma A3294).

### 4.2.5 Avaliação das estratégias de purificação de enzimas

#### *Fator de Purificação (FP)*

O fator de purificação (FP) é uma medida empregada para acompanhar as operações de purificação. Ele foi calculado pela Equação 1 (PORTO *et al.*, 2008):

$$FP = \frac{A_{esp\ purificado}}{A_{esp\ bruta}} \quad (1)$$

sendo:

$A_{esp\ purificado}$ : é a atividade específica da enzima purificada ou no precipitado ressuspendido (U/mg);

$A_{esp\ bruta}$ : é a atividade específica da enzima inulinase bruta (U/mg) (extrato bruto antes do equilíbrio de fases (SAB) ou da precipitação).

**Recuperação ou rendimento de enzima (RP)**

A recuperação da enzima foi calculada pela Equação 2 (PORTO *et al.*, 2008).

$$RP = \frac{[A_{enzima\ purificada} \times V_{purificado}]}{[A_{extrato\ bruto} \times V_{inicial}]} \times 100 \quad (2)$$

sendo:

$A_{enzima\ purificada}$  :é a atividade enzimática na fração considerada(U/mL);

$A_{extrato\ bruto}$ :é a atividade enzimática na alimentação (U/mL);

$V_{inicial}$  :é o volume inicial do extrato adicionado em mL.

**4.2.6 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.

**4.2.6.1 Preparo das amostras**

Primeiramente foi adicionado 40 µL de ácido tricloroacético (TCA) em 100 µL das amostras, contidas em tubos de centrífuga do tipo *ependorfs*, a serem aplicadas no gel. Esta solução foi armazenada em freezer (-8 °C) durante uma noite. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 30 minutos a 4 °C e retirado o sobrenadante, tomando cuidado para que o *pellet* não fosse desfeito. Posteriormente fez-se a adição de 100 µL de uma solução aquosa gelada de acetona 90 % (6 °C), a fim de lavar o *pellet* sem desfazê-lo, sendo este centrifugado como na etapa anterior. Novamente o sobrenadante foi removido e adicionado mais 100 µL de acetona 90 % gelada e centrifugado nas mesmas condições, removendo novamente o sobrenadante. O

precipitado foi ressuspenso com 50  $\mu\text{L}$  do tampão da amostra ( $\beta$ -mercaptoetanol). Em seguida, as amostras foram desnaturadas em banho-maria a 100 °C por 10 minutos.

#### 4.2.6.2 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  $\mu\text{L}$  da solução de persulfato de amônio 10 % e 5  $\mu\text{L}$  de tetrametiletilenodiamina (TEMED). Todos estes componentes foram misturados e transferidos para as placas de eletroforese, deixando aproximadamente 2,5 cm da borda livre. O restante da placa foi completado com água destilada para formar uma linha reta sobre o gel, e este foi deixado polimerizar por 40 minutos em temperatura ambiente. Após a polimerização do gel a água foi retirada.

#### 4.2.6.3 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  $\mu\text{L}$  da solução de persulfato de amônio 10 % e 7,5  $\mu\text{L}$  de tetrametiletilenodiamina (TEMED). Todos estes componentes foram misturados e transferidos para a placa 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.

#### 4.2.6.4 Aplicação das amostras

Após a polimerização do gel as amostras foram adicionadas. No primeiro poço foram adicionados 15  $\mu\text{L}$  do padrão de massa molar (*Fermentas Life Sciences*), e nos outros poços foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  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.

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1 Pré-concentração do extrato enzimático por precipitação com solventes

Neste estudo foram utilizados os álcoois n-propílico e iso-propílico. A precipitação foi avaliada utilizando-se um delineamento composto central rotacional (DCCR)  $2^2$ , cuja matriz com os valores reais e codificados para as variáveis independentes (concentração e vazão do álcool utilizado) e as respectivas respostas em termos de atividade específica, rendimento da enzima e o fator de purificação estão apresentados na Tabela 3.

A atividade específica do extrato enzimático bruto foi de 74,6 e 81,6 U/mg para os testes com o álcool n-propílico e iso-propílico, respectivamente. Geralmente é observado um aumento na atividade específica após a precipitação. Independente do álcool, as maiores atividades específicas foram encontradas no experimento 8, com 182,2 U/mg para o álcool n-propílico e 194,7 U/mg para o álcool iso-propílico. Cabe destacar que a recuperação da enzima foi superior a 100 % para o álcool n-propílico nos ensaios 6, 7, 8, 9 e 10 e para o álcool iso-propílico somente no ensaio 8. Estes resultados sugerem uma remoção de inibidores enzimáticos, como metais pesados, comumente presentes nos meios de fermentação (PORTO *et al.*, 2008). Para ambos os alcoóis, os menores rendimentos foram obtidos para o ensaio conduzido com a menor concentração de álcool (experimento 5).

Com exceção do experimento 5, os demais ensaios realizados com álcool n-propílico apresentaram um FP superior a 1. Os resultados também mostram que a precipitação pode levar a diferentes graus de purificação, sendo que os maiores fatores de purificação foram obtidos nos experimentos 7, 8, seguidos do ponto central. Para o

álcool iso-propílico os ensaios 1, 3 e 5 apresentaram FP menor que 1, provavelmente devido as baixas concentrações de álcool utilizadas nestes ensaios. Os maiores fatores de purificação foram obtidos no ensaio 8 seguido do ponto central. Cabe destacar que os fatores de purificação encontrados (FP = 2,4 vezes) são significativamente maiores ( $\cong$  60 %) que os comumente relatados na literatura (FP = 1,75 vezes) para purificação de enzimas mediante precipitação com solventes (ZHAO *et al.*, 2011). Resultados similares foram encontrados por Golunski *et al.*, 2011a.

**Tabela 3.** Matriz do DCCR 2<sup>2</sup> (valores reais e codificados) e respectivas respostas em termos de atividade específica, rendimento da atividade de inulinase e fator de purificação para precipitação com os álcoois n-propílico e iso-propílico.

Ensaio	Concentração %	Vazão (mL/min)	n-propílico			iso-propílico		
			Atividade Específica (U/mg)	Rendimento Atividade %	Fator de Purificação (FP)	Atividade Específica (U/mg)	Rendimento Atividade %	Fator de Purificação (FP)
Enzima bruta	-	-	74,6	100	1,0	81,6	100	1,0
1	-1 (22)	-1 (2,97)	100,9	41,7	1,3	41,0	21,9	0,5
2	+1 (78)	-1 (2,97)	141,2	94,0	1,9	11,8	88,6	1,4
3	-1 (22)	+1 (17)	152,6	42,3	2,0	48,3	27,3	0,6
4	+1 (78)	+1 (17)	144,0	99,9	1,9	128,1	89,4	1,6
5	-1,41 (10)	0 (10)	9,6	3,0	0,1	7,4	2,2	0,1
6	+1,41 (90)	0 (10)	150,8	105,9	2,0	107,9	84,9	1,3
7	0 (50)	-1,41 (0,09)	162,2	100,3	2,2	114,9	83,9	1,4
8	0 (50)	+1,41 (19,9)	182,2	113,8	2,4	194,7	126,1	2,4
9	0 (50)	0 (10)	159,1	100,0	2,1	151,0	98,2	1,8
10	0 (50)	0 (10)	157,1	101,5	2,1	149,4	97,4	1,8
11	0 (50)	0 (10)	157,0	99,4	2,1	151,2	100,0	1,8

A análise estatística dos dados experimentais permitiu a validação de modelos empíricos para o fator de purificação e o rendimento da enzima em função da concentração e da vazão dos álcoois utilizados. A Tabela 4 apresenta os modelos codificados para o fator de purificação e rendimento da enzima em diferentes álcoois.

**Tabela 4.** Modelos propostos para o fator de purificação e rendimento da enzima inulinase em função da concentração e da vazão dos álcoois n-propílico e iso-propílico.

Álcool	Modelo: $Y_{CAL} =$
<b>n-propílico(R)</b>	$100,32 + 31,97 * C - 25,87 * C^2 + 3,21 * V + 0,59 * V^2 + 1,33 * C * V$
<b>n-propílico(FP)</b>	$2,09 + 0,40 * C - 0,50 * C^2 + 0,12 * V + 0,12 * V^2 - 0,17 * C * V$
<b>iso-propílico(R)</b>	$98,62 + 30,76 * C - 31,84 * C^2 + 8,85 * V - 1,80 * V^2 - 1,55 * C * V$
<b>iso-propílico(FP)</b>	$1,80 + 0,45 * C - 0,62 * C^2 + 0,21 * V - 0,01 * V^2 + 0,02 * C * V$

Sendo  $Y_{CALC}$  o rendimento da enzima (%) ou o fator de purificação, dependendo do álcool utilizado, C e V são a concentração e a vazão do álcool utilizado, respectivamente.

Analisando as equações da Tabela 4 podemos observar que tanto o rendimento (R) quanto o fator de purificação (FP) são dependentes da concentração e da vazão dos álcoois utilizados. Os parâmetros das equações mostram que a concentração linear e a vazão linear de ambos os álcoois afeta de maneira positiva a recuperação e purificação da enzima, demonstrando que um aumento na concentração e na vazão dos álcoois pode ocasionar um aumento na precipitação da enzima. No entanto, convém salientar, que após um certo nível, elevadas concentrações de álcool podem causar perda da atividade da enzima devido à desnaturação. Um estudo do nosso grupo de pesquisa (GOLUNSKI *et al.*, 2011a) sobre purificação de inulinase relatou o uso da variação da concentração de etanol. Os dados obtidos neste estudo serviram como base para a realização deste trabalho.

A análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 5 foi empregada para a validação dos modelos matemáticos codificados usados para precipitação da enzima. O valor de F indica a significância de cada fator do modelo. Todos os modelos propostos foram validados por meio da análise de variância (ANOVA), apresentando coeficientes

de correlação (R) superiores a 0,91 e valor de F calculado maior do que o F tabelado, com 95 % de confiança.

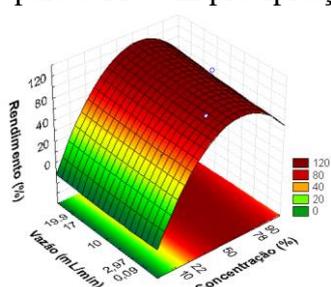
**Tabela 5.** Análise de variância para avaliação da significância estatística dos modelos propostos para a precipitação com álcoois da enzima inulinase.

Álcoois/resposta	Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calculado
<b>n-propílico / R</b>	<b>Regressão</b>	12401,11	5	2480,22	28,8
	<b>Resíduos</b>	431,33	5	86,26	
	<b>Total</b>	12832,44	10		
<b>n-propílico/ FP</b>	<b>Regressão</b>	3,38	5	0,68	5,3
	<b>Resíduos</b>	0,64	5	0,13	
	<b>Total</b>	4,02	10		
<b>iso-propílico / R</b>	<b>Regressão</b>	14200,15	5	2840,03	14,4
	<b>Resíduos</b>	986,49	5	197,30	
	<b>Total</b>	15186,64	10		
<b>iso-propílico/ FP</b>	<b>Regressão</b>	4,32	5	0,86	14,0
	<b>Resíduos</b>	0,31	5	0,06	
	<b>Total</b>	4,63	10		

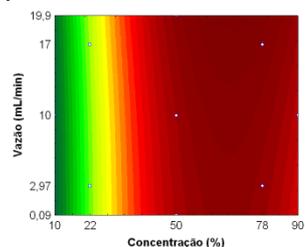
$$F_{\text{tab } 5,5,95\%} = 5,05$$

Os gráficos na Figura 2 apresentam as superfícies de resposta e curvas de contorno geradas a partir do modelo validado para a recuperação e o fator de purificação da enzima. De acordo com as superfícies de respostas e curvas de contorno, ambos o rendimento e fator de purificação da enzima são mais dependentes da concentração de álcool do que da taxa de sua adição 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 álcool para o sistema pode aumentar ou diminuir o rendimento da enzima, dependendo da concentração deste.

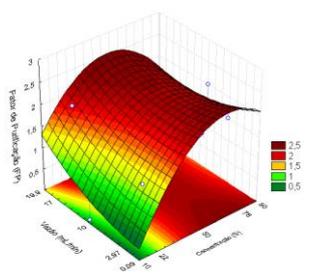
**Figura 2.** Superfícies de resposta para avaliação do comportamento da precipitação da enzima inulinase em álcool n-propílico e iso-propílico, sendo (a) superfície de resposta para o rendimento com precipitação por n-propílico, (b) curva de contorno para o rendimento com precipitação por n-propílico, (c) superfície de resposta para o FP com precipitação por n-propílico, (d) curva de contorno para o FP com precipitação por n-propílico, (e) superfície de resposta para o rendimento com precipitação por iso-propílico, (f) curva de contorno para o rendimento com precipitação por iso-propílico, (g) superfície de resposta para o FP com precipitação por iso-propílico, (h) curva de contorno para o FP com precipitação por iso-propílico.



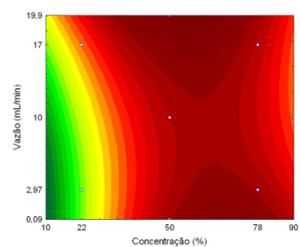
(a)



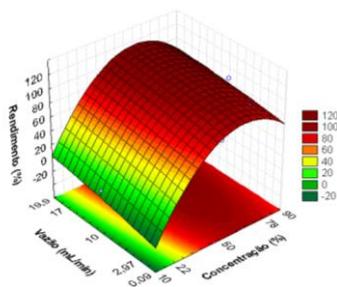
(b)



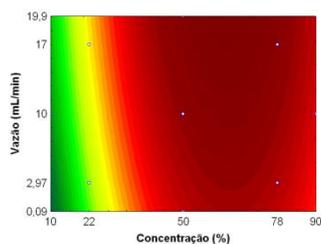
(c)



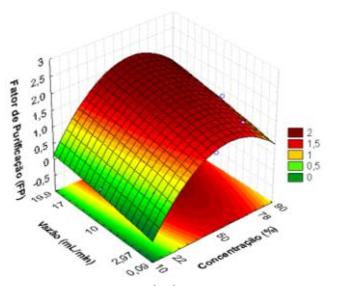
(d)



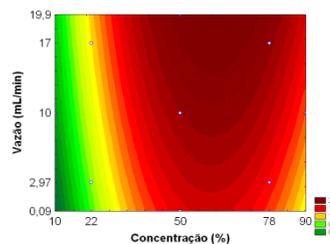
(e)



(f)



(g)



(h)

No presente estudo, optou-se pela concentração de álcool de 50 % e uma vazão de 19,9 mL/min para continuidade do trabalho, uma vez que nesta condição foram obtidos os melhores fatores de purificação para ambos os álcoois.

#### 4.3.2 Mudança da força iônica do meio seguida por precipitação com álcoois

Considerando que os resultados obtidos com os álcoois n-propílico e iso-propílico foram similares aos obtidos com etanol em trabalhos anteriores (GOLUNSKI *et al.*, 2011a), avaliou-se a estratégia combinada, que consiste em mudar a força iônica do meio com diferentes sais e posterior precipitação, com ambos os álcoois.

O efeito da mudança da força iônica do meio foi avaliada pela adição de diferentes concentrações de NaCl e CaCl<sub>2</sub> ao extrato bruto, e posterior precipitação com álcoois. Os resultados estão apresentados na Tabela 6.

A maioria dos ensaios apresentou uma diminuição da proteína total (mg/mL) e um aumento da atividade total (U/mL), quando comparado ao extrato bruto, e consequentemente um aumento da atividade específica (U/mg).

Para os ensaios conduzidos com NaCl, independente da concentração, somente o etanol apresentou rendimento de atividade superior a 100 %. Para os ensaios realizados empregando o CaCl<sub>2</sub>, praticamente todos os ensaios apresentaram rendimentos de atividades superiores a 100 %. Com este sal rendimentos inferiores a 100 % somente foram observados para uma condição, [CaCl<sub>2</sub>] = 0,50 mol/L, utilizando álcool n-propílico como agente precipitante. Os maiores rendimentos foram observados para os ensaios conduzidos com o sal CaCl<sub>2</sub> e os álcoois iso-propílico ([CaCl<sub>2</sub>] = 0,10 e 0,50 mol/L) e n-propílico ([CaCl<sub>2</sub>] = 0,05 mol/L).

Este aumento no rendimento da atividade foi vinculado a um favorecimento da precipitação seletiva da enzima pela adição dos sais, a qual ocorre com menor agregação de inibidores. O uso de sais, como o sulfato de amônio, é frequentemente citado na literatura em etapas de pré-concentração de enzimas, conduzindo a um aumento de suas atividades enzimáticas (SILVA *et al.*, 2011; GILL *et al.*, 2006; SHARMA *et al.*, 2007). Em relação à concentração dos sais, observa-se uma tendência para a maioria dos solventes, um aumento inicial do rendimento de atividade, seguido de um decréscimo da mesma, quando as concentrações dos sais são aumentadas de 0,05 para 0,1 mol/L e de 0,1 para 0,5 mol/L, respectivamente. Esta tendência demonstra a

necessidade de uma etapa de otimização desta variável, a qual com seu aumento favorece a precipitação da enzima, porém com perda de atividade.

**Tabela 6.** Efeito da mudança de força iônica sobre o extrato enzimático seguido de precipitação com solventes orgânicos.

Álcool	Espécies de Sal	Concentração	Proteína	Atividade	Atividade	Rendimento Atividade (%)	Fator Purificação FP
		Sal (mol/L)	Total (mg/mL)	Total (U/mL)	Específica (U/mg)		
*	*	*	0,238	25,6	107,6	100	1,0
n-propílico	NaCl	0,05	0,165	52,2	315,1	81,5	2,9
n-propílico	NaCl	0,10	0,155	50,4	323,8	78,8	3,0
n-propílico	NaCl	0,50	0,098	50,0	516,6	78,1	4,8
*	*	*	0,331	20,7	62,6	100	1,0
iso-propílico	NaCl	0,05	0,216	51,3	236,2	98,5	3,8
iso-propílico	NaCl	0,10	0,232	52,5	227,2	101,3	3,6
iso-propílico	NaCl	0,50	0,200	46,6	232,6	89,8	3,7
*	*	*	0,262	18,0	68,6	100	1,0
Etanol	NaCl	0,05	0,297	48,8	164,4	108,6	2,4
Etanol	NaCl	0,10	0,241	53,4	221,7	118,8	3,2
Etanol	NaCl	0,50	0,201	48,2	240,0	107,4	3,5
*	*	*	0,228	15,4	67,4	100	1,0
n-propílico	CaCl <sub>2</sub>	0,05	0,205	46,4	226,4	120,7	3,3
n-propílico	CaCl <sub>2</sub>	0,10	0,175	45,1	257,3	117,4	3,8
n-propílico	CaCl <sub>2</sub>	0,50	0,199	21,4	107,6	55,6	1,6
*	*	*	0,234	17,3	74,3	100	1,0
iso-propílico	CaCl <sub>2</sub>	0,05	0,237	43,6	183,4	100,7	2,5
iso-propílico	CaCl <sub>2</sub>	0,10	0,222	56,2	253,3	129,8	3,4
iso-propílico	CaCl <sub>2</sub>	0,50	0,228	52,1	229,6	120,4	3,1
*	*	*	0,247	19,9	80,5	100	1,0
Etanol	CaCl <sub>2</sub>	0,05	0,417	54,2	137,1	108,8	1,7
Etanol	CaCl <sub>2</sub>	0,10	0,288	56,2	195,7	112,9	2,4
Etanol	CaCl <sub>2</sub>	0,50	0,275	54,8	200,4	110,0	2,5

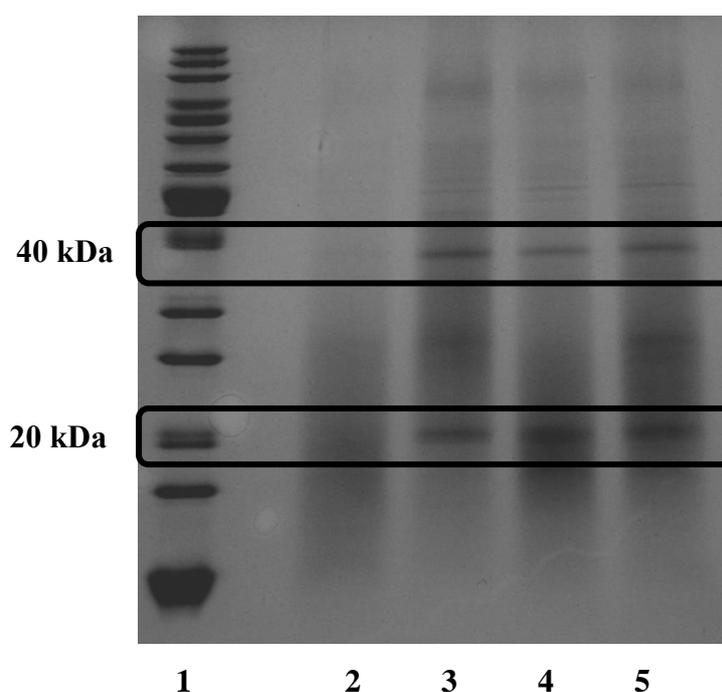
\* extrato bruto

Ensaio conduzidos em paralelo com os três solventes, empregando concentrações destes sais superiores a 2,0 mol/L, conduziram a precipitação instantânea das enzimas no momento da adição dos solventes, porém com total perda de atividade.

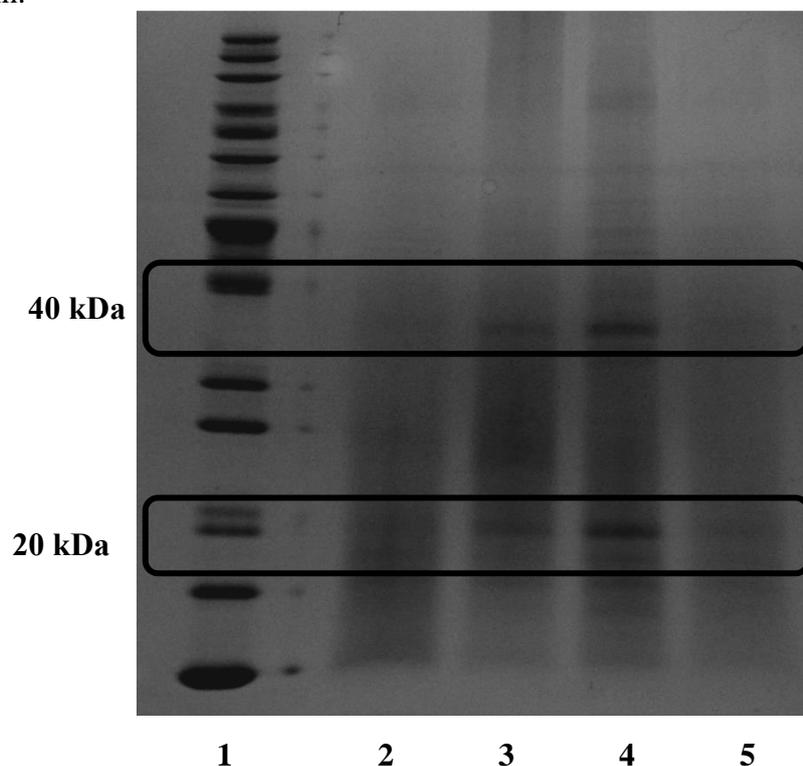
Considerando os fatores de purificação, praticamente todos os ensaios conduzidos com adição de sal apresentaram fator de purificação superior a 2,4-vezes (valor do ensaio de referência conduzido somente com o álcool). Cabe destacar a condição empregando a concentração de 0,5 mol/L de NaCl e o álcool n-propílico, a qual apresentou uma duplicação no fator de purificação (4,8-vezes) em relação a referência. Possivelmente, este aumento no fator de purificação pode estar vinculado a uma ativação da enzima o que possibilitou a remoção de inibidores.

O gel SDS-PAGE das frações apresentadas na Tabela 8 é mostrado nas Figuras 3 e 4. Uma baixa variação no perfil de proteína pode ser observada no extrato bruto (Fig. 3 e Fig. 4, linha 2). As bandas na região de 20 kDa e 40 kDa são intensificadas, sugerindo a ocorrência de purificação da enzima inulinase.

**Figura 3.** SDS-PAGE das diferentes frações protéicas obtidas por purificação do extrato enzimático. Da esquerda para a direita: Linha 1: marcador de massa molar (de cima para baixo) 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15 e 10 kDa. Linha 2: extrato enzimático bruto. Linha 3: extrato enzimático após mudança de força iônica do meio por NaCl 0,5 mol/L e precipitação com n-propílico 50 % / 19,9 mL/min. Linha 4: extrato enzimático após mudança de força iônica do meio por NaCl 0,05 mol/L e precipitação com iso-propílico 50 % / 19,9 mL/min. Linha 5: extrato enzimático após mudança de força iônica do meio por NaCl 0,5 mol/L e precipitação com etanol 55 % / 19,9 mL/min.



**Figura 4.** SDS-PAGE das diferentes frações protéicas obtidas por purificação do extrato enzimático. Da esquerda para a direita: Linha 1: marcador de massa molar (de cima para baixo) 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15 e 10 kDa. Linha 2: extrato enzimático bruto. Linha 3: extrato enzimático após mudança de força iônica do meio por  $\text{CaCl}_2$  0,1 mol/L e precipitação com n-propílico 50 % / 19,9mL/min. Linha 4: extrato enzimático após mudança de força iônica do meio por  $\text{CaCl}_2$  0,1 mol/L e precipitação com iso-propílico 50 % / 19,9mL/min. Linha 5: extrato enzimático após mudança de força iônica do meio por  $\text{CaCl}_2$  0,5 mol/L e precipitação com etanol 55 % / 19,9mL/min.



Os fatores de purificação e os rendimentos encontrados no presente estudo são comparáveis ou superiores aos relatados na literatura. Li *et al.* (2012) relataram um FP de 3,4-vezes e um rendimento de 51,1 % após purificação por cromatografia DEAE-Sepharose Fast Flow de endo-inulinase. Zhang *et al.*, (2009) encontraram um FP de 2,53 e rendimento de 46 %, mesmo após purificação de inulinase recombinante por cromatografia de afinidade. Um fator de purificação de 3,75 com um rendimento de 62,48 %, utilizando HiTrap Butyl Sepharose 4 FF + Ultrafiltração foi relatado por Jdrzejczak-Krzepkowska *et al.*, (2011) para purificação  $\beta$ -fructofuranosidase. Os resultados apresentados no presente estudo demonstram a potencialidade da metodologia como uma etapa simples e de baixo custo de uma estratégia sequencial de purificação.

#### 4.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

Neste estudo foi proposto uma estratégia para purificação da enzima inulinase produzida por fermentação em estado sólido, utilizando duas técnicas de baixo custo, baseadas em mudança da força iônica do meio e precipitação com álcool n-propílico e iso-propílico. O fator de purificação pode ser aumentado de 2 a 2,4-vezes dependendo da concentração de álcool sobre a sua adição ao extrato enzimático bruto. A precipitação com álcool causou a ativação da enzima, possivelmente devido à remoção de inibidores. Os resultados mostraram que foi possível obter uma purificação de 4,8-vezes com um rendimento de 78,1%, após mudança de força iônica do meio seguida por precipitação. Os resultados obtidos são promissores quando comparados com a literatura, comprovando que uma purificação com técnicas simples e de baixo custo pode ser mais eficaz do que algumas técnicas cromatográficas.

## 4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- CORTEZ E.V.; PESSOA A. JR. **Xylanase and  $\beta$ -xylosidase separation by fractional precipitation.** Process Biochemistry, v. 35, p. 277-283, 1999.
- 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.
- 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.
- GOLUNSKI, S., ASTOLFI, V., CARNIEL, N., OLIVEIRA, D., DI LUCCIO, M., MAZUTTI, M. A., TREICHEL, H. **Ethanol precipitation and ultrafiltration of inulinases from *Kluyveromyces marxianus*.** Separation and Purification Technology, v. 78, p. 261–265, 2011.
- JEDRZEJCZAK-KRZEPKOWSKA, M.; TKACZUK, K. L.; BIELECKI, S. **Biosynthesis, purification and characterization of  $\alpha$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* KN29.1.** Process Biochemistry. v. 46, p. 1963–1972, 2011.
- LI, Y.; LIU, G.; WANG, K.; CHI, Z.; MADZAK, C. **Overexpression of the endo-inulinase gene from *Arthrobacter* sp. S37 in *Yarrowia lipolytica* and characterization of the recombinant endo-inulinase.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 74, p. 109–115, 2012.
- 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.
- MILLER, G. L., **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** Analytical Chemistry, v. 31, p. 426-428, 1959.
- 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: Process Intensification, v. 7, p. 716-721, 2008.
- RISSO 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.
- 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.
- SILVA, M.F.; FREIRE, D. M. G.; CASTRO, A. M.; DI LUCCIO, M.; MAZUTTI, M. A.; OLIVEIRA, J. V.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA D. **Concentration, Partial Characterization, and Immobilization of Lipase Extract from *P.brevicompectum* by Solid-State Fermentation of Babassu Cake and Castor Bean Cake.** Appl Biochem Biotechnol, v. 164, p. 755–766, 2011.
- SOARES, P. A.G.; VAZ, A. F.M.; CORREIA, M. T.S.; PESSOA JR, A. CARNEIRO-DA-CUNHA M. G. **Purification of bromelain from pineapple wastes by ethanol precipitation,** Separation and Purification Technology, doi.org/10.1016/j.seppur.2012.06.042, 2012.
- SWENNEN, K.; COURTIN, C. M.; BRUGGEN, B. V.; VANDECASTEELE, C.; DELCOUR, J. A., **Ultrafiltration and ethanol precipitation for isolation of arabinoxylooligosaccharides with different structures.** Carbohydrate Polymers, v. 62, p. 283–292, 2005.
- 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.
- ZHAO, M.; MU, W.; JIANG, B.; ZHOU, L.; ZHANG, T.; LU, Z.; JIN, Z.; YANG, R. **Purification and characterization of inulin fructotransferase (DFA III-forming) from *Arthrobacter aureescens* SK 8.001.** Bioresource Technology, v. 102, p. 1757–1764, 2011.

## **CAPÍTULO V**

---

### **PURIFICAÇÃO DE INULINASE POR SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO**

## 5.1 REFERENCIAL TEÓRICO

### 5.1.1 Sistema aquoso bifásico (SAB)

Sistema aquoso bifásico (SAB) é uma técnica de fracionamento líquido-líquido que tem sido amplamente estudada para a recuperação e purificação de produtos biológicos. Esta técnica envolve a construção de sistemas de extração que podem ser formados por dois polímeros, um polímero e um sal, um líquido iônico e um sal ou um álcool com baixa massa molar e um sal misturado ao longo de um limite de concentração, formando assim duas fases imiscíveis (PARK *et al.*, 2007; RUIZ-RUIZ *et al.*, 2012).

Este método é bastante utilizado para purificação de proteínas, o qual minimiza a desnaturação e/ou a perda da atividade biológica, devido ao elevado teor de água e baixa tensão interfacial dos sistemas, os quais protegem as proteínas. Os polímeros utilizados também podem ter um efeito estabilizador. Particionamento por SAB podem ser utilizados para separar as proteínas a partir de detritos das células ou para purificar proteínas a partir de outras proteínas (ANSEJO e ANDREWS, 2012).

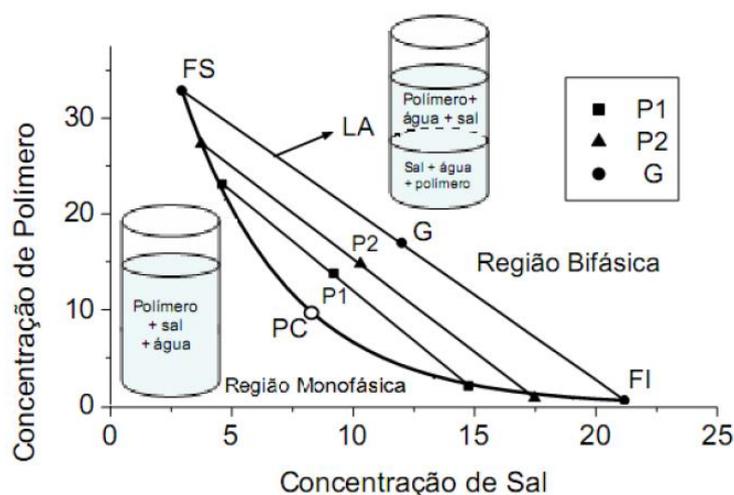
As vantagens desta técnica incluem potencial escalonamento, operação contínua, facilidade de integração do processo, biocompatibilidade, simplicidade de operação, além de permitir tanto a seleção específica quanto o rápido processamento. Ao particionar a proteína específica para uma fase e contaminantes da proteína para outra em condições apropriadas, esta técnica permite a separação, purificação e recuperação de materiais biológicos em uma única etapa (OOI *et al.*, 2009; NANDINI e RASTOGI, 2009).

Além disso, os SAB são facilmente dimensionáveis e permitem a reciclagem dos reagentes utilizados no processo. Seu alto teor de água implica em alta biocompatibilidade e baixa tensão interfacial, minimizando a degradação de biomoléculas (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Estes sistemas apresentam ainda vantagens ambientais como baixa toxicidade e inflamabilidade mínima (MARTINS *et al.*, 2008). Sistemas polímero, sal e água são particularmente adequados para a partição de compostos devido ao seu custo relativamente baixo e a baixa viscosidade, a qual permite uma separação eficiente de fases (CARVALHO *et al.*, 2007).

Sistemas aquosos bifásicos compostos de um solvente orgânico e uma solução salina têm sido empregados para isolar proteínas, aminoácidos e outros produtos naturais. As vantagens deste sistema incluem a sua baixa polaridade, viscosidade elevada e a facilidade com que o álcool pode ser recuperado por evaporação. Além disso, o sistema é barato e de baixa toxicidade ao meio ambiente (OOI *et al.*, 2009).

A concentração de sal e a concentração do polímero presente em um sistema bifásico com composições globais diferentes (P1, P2 e G), bem como suas linhas de amarração podem ser representadas na forma de um diagrama de fases (Figura 5).

**Figura 5.** Diagrama de fase esquemático de um sistema aquoso bifásico. Fonte: Cardoso, 2007.



O diagrama informa em quais composições o sistema é homogêneo e em quais é heterogêneo, sendo essas duas regiões separadas pela linha binodal. A posição da linha binodal varia de acordo com o tipo e a massa molar do polímero, a natureza química do sal, a temperatura e o pH do meio (SILVA e LOH, 2006). Ela é formada por pontos cujas coordenadas são as mínimas concentrações de sal e de polímero nas quais o sistema apresenta-se como duas fases em equilíbrio termodinâmico. Abaixo da linha binodal tem-se a região formada por pontos representando concentrações que formam um sistema monofásico, e acima, a região formada por pontos que formam duas fases.

Estas concentrações podem ser expressas em qualquer unidade, porém, geralmente elas são expressas em % mássica (CARDOSO, 2007).

Os SAB resultam da incompatibilidade de dois polímeros em soluções, embora a variedade de SAB seja grande, os mais aplicados à extração líquido-líquido são os constituídos de polietilenoglicol (PEG)/dextrana e polietilenoglicol (PEG)/sal (fosfato, sulfato, citrato). A incompatibilidade ocorre em função da concentração desses compostos, quando comparados com sistemas tradicionais constituídos com solventes orgânicos. Os sistemas PEG/Sal têm sido propostos para extração de enzimas por apresentarem baixo custo, elevada seletividade das proteínas, tempo de separação de fases, possibilidade de esterilização, atoxicidade e faixa de aplicação. Outra vantagem dos SAB é a possibilidade de reciclagem dos seus componentes (ZUNIGA *et al.*, 2003). A escolha do sal utilizado tem impacto direto na separação, concentração e purificação da proteína, devido à sua influencia na formação do sistema reacional (NANDINI e RASTOGI, 2009).

A partição depende principalmente das propriedades físico-químicas das proteínas, tais como ponto isoelétrico, superfície de hidrofobicidade, massa molar, e outras variáveis do meio, como massa molar do polímero, pH, o tipo de sal adicionado e sua concentração. Conhecendo e controlando estes fatores é possível separar e recuperar seletivamente uma proteína (TUBIO *et al.*, 2004). Atualmente, os SAB são aplicados mais eficientemente em etapas iniciais dos processos de purificação, mas em alguns casos raros podem até mesmo substituir os clássicos sistemas cromatográficos (SILVA e LOH, 2006).

Entre os trabalhos que relatam a purificação de enzimas por sistema aquoso bifásico podemos citar Barbosa *et al.* (2011) que utilizaram PEG 400, 1000, 1500, 4000, 6000, 8000 e 20.000 g/mol, fosfato de potássio pH 6 para a purificação de lipase de *Bacillus* sp. ITP-001. O maior fator de purificação obtido foi de 169 vezes utilizando PEG 20.000 em uma concentração de 20 % e 18 % de tampão fosfato de potássio pH 6. Bassani *et al.* (2010) purificou lipase de *Candida rugosa* utilizando SAB formado por PEG 2000 e tampão fosfato de potássio, obtendo um fator de purificação de 2,3 vezes.

Tanase produzida por *Aspergillus niger* foi purificada por SAB composto por PEG nas massas molares de 400, 600 e 1000 e fosfato de potássio. Uma recuperação de 96 % foi obtida para a fase inferior do sistema composto por PEG 1000, com um aumento de 7 vezes no fator de purificação (RODRÍGUEZ-DURÁN *et al.*, 2013).

Ali *et al.* (2014) utilizaram SAB para concentrar e purificar enzimas fibrinolíticas de *Auricularia polytricha*. Foi realizado uma avaliação dos parâmetros do sistema, como peso molecular do PEG, concentração de PEG, concentração de sal e pH. A utilização de PEG 8000-fosfato foi considerada adequada para a recuperação primária da enzima fibrinolítica a partir do extrato bruto. Este sistema compreendeu uma proporção de 20 % (m/m) de PEG 8000, 11,6 % (m/m) de fosfato pH 7 e foi carregado com 25 % (m/m) de extrato bruto, apresentando uma purificação de 7,01 vezes e uma recuperação da atividade enzimática de 78 %.

Maciel *et al.* (2014) investigaram a separação e purificação de poligalacturonases (PG) produzidas por *Aspergillus niger* URM 5162 em SAB composto por polietileno glicol e sais de fosfato (PEG/fosfato). Para avaliar o efeito da massa molar de polietilenoglicol (PEG) (400-8000 g/mol), a concentração de PEG (12,5-17,5%, m/m), a concentração de fosfato (15 - 25% m/m) e o pH (6,0-8,0) em relação a purificação da PG, os autores utilizaram a ferramenta planejamento de experimentos. Para as endo-poligalacturonases (endo-PG) e exo-poligalacturonase (exo-PG) os maiores valores de recuperação (74,04% e 17,97%) e FP (8,18 e 1,98), respectivamente, foram obtidos utilizando uma concentração de 12,5% de PEG 8000 g/mol e 25% de tampão fosfato pH 6,0. Os autores concluíram que de acordo com esses resultados, o sistema PEG/fosfato é uma alternativa útil e de baixo custo para purificação da PG produzida por *A. niger* URM 5162.

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

O SAB utilizando PEG/Citrato vem sendo utilizado como uma alternativa para a purificação de biomoléculas, que possuem aplicação na indústria de medicamentos e alimentos. Marcos *et al.* 1999 e 2002 utilizaram o sistema PEG/Citrato na purificação

da enzima Penicilina acilase, produzida por *Echerichia coli*, a qual é empregada na indústria farmacêutica para a produção de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos.

Como pode ser observado, não foi encontrado nenhum trabalho científico visando à utilização dos SAB na concentração e purificação de inulinases. Neste contexto, a purificação de proteínas por SAB apresenta-se como uma proposta desafiadora, necessitando de um grande esforço de pesquisa. Neste trabalho, foi estudada a otimização da purificação da enzima inulinase utilizando sistema aquoso bifásico. Os efeitos do pH, massa molar do polímero, concentração do polímero e do fosfato de potássio e citrato de sódio foram investigados, tendo como respostas o fator de purificação e a recuperação enzimática.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Massa molar do polietilenoglicol (PEG)

As massas molares do polietilenoglicol avaliadas neste estudo foram selecionadas com base nos trabalhos de Minami (1997) e Bradoo *et al.* (1999), Oliveira *et al.* (2008), Zafarini-Moattar *et al.* (2004) e Tubío-Moattar *et al.* (2006).

Para o processo de purificação da inulinase no sistema PEG/fosfato de potássio foram selecionadas as massas molares de polietilenoglicol de 1500, 4000, 6000, 8000 e 10000 Da. Para o sistema PEG/citrato de sódio foram utilizadas massas molares de polietilenoglicol de 1500, 4000, 6000 e 8000.

### 5.2.2 Determinação da curva binodal

As curvas binodais para os SAB/fosfato de potássio foram determinadas segundo metodologia descrita por Minami (1997) para os sistemas compostos de fosfato de potássio e PEG de massas molares de 8.000 e 10.000 Da em pH 6 e 7. Estas estão dispostas no Anexo II. Para os SAB/fosfato de potássio formados com PEG de massas molares 1500, 4000 e 6000 em pH 6 e 7 foram utilizadas as curvas binodais publicadas por Minami (1997). Para os SAB/citrato de sódio formados com PEG de massas molares 1500, 4000, 6000 e 8000 em pH 5 foram utilizadas as curvas binodais

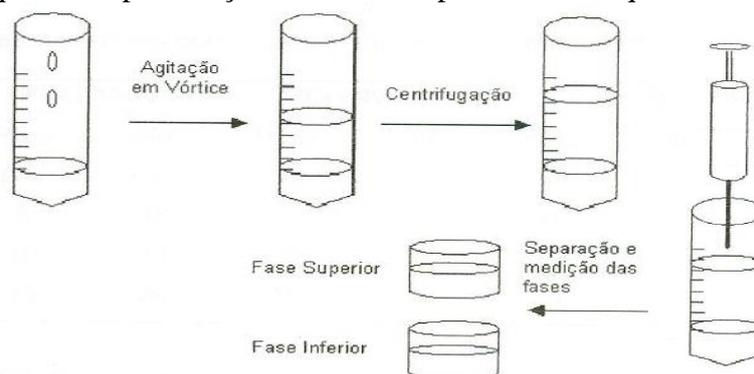
publicadas por Oliveira *et al.* (2008), Zafarini-Moattar *et al.* (2004) e Tubío-Moattar *et al.* (2006), dispostas no Anexo III.

### 5.2.3 Preparação do sistema aquoso bifásico

Os sistemas aquosos bifásicos formados por PEG/fosfato de potássio e PEG/citrato de sódio foram preparados em tubos de centrifuga graduados, pesando-se as quantidades apropriadas de PEG, tampão fosfato de potássio (30 % e 40 % m/m  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) e, de PEG, tampão citrato de sódio (40 %  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) nos valores de pH a serem estudados e água deionizada. Os limites de concentração de PEG e fosfato de potássio foram definidos com base no diagrama de fases determinado para cada massa molar do polímero (MINAMI, 1997). O conteúdo destes tubos foi homogeneizado mecanicamente em vórtex para completa dissolução do polímero, e o sistema foi mantido em banho de gelo. Após a formação de duas fases, adicionou-se 8 g do extrato enzimático, com pH ajustado ao do sistema, para completar a massa total de 40 g em todos os sistemas, levando-se imediatamente a agitação em vórtex para a homogeneização final. O sistema foi centrifugado a 4 °C durante 10 minutos a 4700 x g (ANTELO *et al.*, 2010) e mantido em repouso em banho de gelo a fim de atingir o equilíbrio das fases.

As fases de topo e de fundo foram separadas tomando-se o cuidado de não perturbar o equilíbrio, sendo então medidos os volumes de cada uma (ANTELO *et al.*, 2010). Foi retirada uma alíquota de cada fase para a determinação da atividade enzimática e quantidade de proteína total. Um ensaio controle foi realizado sem a adição da enzima para verificar se havia interferência dos componentes do sistema nas dosagens analíticas. A Figura 6 mostra o esquema da purificação da inulinase pelo sistema aquoso bifásico (ANTELO, 2007).

**Figura 6.** Esquema da purificação da inulinase pelo sistema aquoso bifásico.



Fonte: Antelo, 2007

#### 5.2.4 *Screening* de diferentes condições de PEG/fosfato de potássio no sistema aquoso bifásico para a purificação da inulinase

Para a realização dos ensaios de purificação empregando diferentes massas molares de PEG (1500, 4000, 6000, 8000 e 10000 Da) e valores de pH (6,0 e 7,0) foram selecionados pontos na região bifásica das curvas binodais em diferentes concentrações do polímero e de fosfato de potássio. Os ensaios foram realizados em triplicata, com realização de análises também em triplicatas. Como respostas foram considerados o fator de purificação, recuperação da inulinase, coeficiente de partição ( $K_{part}$ ), razão de volumes do sistema e atividade da enzima, conforme definições a partir do item 5.2.8.

#### 5.2.5 Estratégia para a maximização da purificação por sistema aquoso bifásico/fosfato de potássio

Os efeitos do percentual do polietilenoglicol e do tampão fosfato de potássio sobre o fator de purificação e a recuperação da inulinase foram avaliados por meio de

um planejamento fatorial completo com pontos axiais para verificação dos efeitos de primeira e segunda ordem, bem como as interações entre as variáveis, com triplicata do ponto central para PEG de massa molar 4000 e fosfato de potássio pH 7,0.

A Tabela 7 apresenta os valores dos níveis codificados usados no planejamento para a maximização da purificação da inulinase.

**Tabela 7.** Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo  $2^2$ , para otimização das condições de purificação enzimática com PEG 4000 e fosfato de potássio pH 7,0.

<b>Variáveis Independentes / Níveis</b>	<b>-1,41</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>	<b>+1,41</b>
PEG (%)	15,13	18	25	32	34,87
Fosfato de potássio (%)	5,77	7	10	13	14,23

Os níveis foram definidos através da curva binodal PEG 4000 Da e fosfato de sódio determinada segundo metodologia descrita por Minami (1997).

### 5.2.5.1 Avaliação da adição de NaCl sobre o particionamento da enzima inulinase

A fim de avaliar o efeito da adição de sal no SAB foi adicionado ao sistema soluções de NaCl nas molaridades de 0,1, 0,5 e 1,0 mol/L a fim de verificar o comportamento da partição total de proteínas. Cada concentração do sal foi adicionada ao sistema na condição ótima do DCCR. A atividade da enzima e a proteína total foram determinadas em ambas as fases, sendo que a quantificação do teor de proteína foi efetuada pelo método do Fluorímetro (Invitrogen Qubit™).

### 5.2.5.2 Quantificação do teor de proteína pelo método fluorimétrico

O procedimento de leitura do teor de proteína é padrão onde o equipamento é acompanhado de uma solução tampão de proteína, solução para tampão, solução padrão 1, solução padrão 2 e solução padrão 3.

Inicialmente é preparada a solução tampão com 25  $\mu$ L da solução para tampão e 4,975  $\mu$ L do tampão de proteína. Os padrões 1, 2 e 3 são feitos com: 190  $\mu$ L da solução

tampão e 10  $\mu\text{L}$  da solução padrão 1, 190  $\mu\text{L}$  de solução tampão mais 10  $\mu\text{L}$  da solução padrão 2 e 190  $\mu\text{L}$  de solução tampão com 10  $\mu\text{L}$  de solução padrão 3, respectivamente. O preparo da amostra para leitura é feito utilizando 190  $\mu\text{L}$  da solução tampão mais 10  $\mu\text{L}$  da amostra de enzima. Para leitura do teor de proteína, primeiramente é feita a calibração do equipamento pela inserção dos padrões 1, 2 e 3 respectivamente e após é efetuada a leitura do teor de proteína da amostra do extrato enzimático bruto e purificado (COGHETTO *et al.*, 2012).

### **5.2.5.3 Estratégia de purificação envolvendo precipitação com solvente e SAB**

Primeiramente, a força iônica do extrato enzimático bruto foi alterada com a adição de uma solução de NaCl 0,5 mol/L. Após a homogeneização, a amostra foi submetida à precipitação com álcool n-propílico em condição otimizada no item 3.4 (concentração de 50 % e um vazão de 19,9 mL/min). Depois da adição do álcool, o precipitado resultante foi centrifugado a 9000 x g durante 15 min a 5 °C. O precipitado foi recolhido, ressuspendido em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,8 e utilizado como substituto do extrato enzimático bruto no ensaio com SAB em condições previamente otimizadas.

### **5.2.5.4 *Screening* de diferentes condições de PEG/citrato de sódio no sistema aquoso bifásico para a purificação da inulinase**

Para a realização dos ensaios de purificação empregando diferentes massas molares de PEG (1500, 4000, 6000 e 8000 Da) e valores de pH (5,0) foram selecionados pontos na região bifásica das curvas binodais em diferentes concentrações do polímero e de citrato de sódio. Os ensaios foram realizados em triplicata, com realização de análises também em triplicatas. As respostas foram o fator de purificação, recuperação da inulinase, coeficiente de partição ( $K_{\text{part}}$ ), razão de volumes do sistema e atividade da enzima, conforme definições a partir do item 5.2.8.

### 5.2.6 Estratégia para a maximização da purificação por sistema aquoso bifásico/citrato de sódio

Os efeitos do percentual do polietilenoglicol e do tampão citrato de sódio sobre o fator de purificação e a recuperação da inulinase foram avaliados através de um planejamento fatorial completo com pontos axiais para verificação dos efeitos de primeira e segunda ordem, bem como as interações entre as variáveis, com triplicata do ponto central para PEG de massa molar 1500 Da e citrato de sódio pH 5,0.

A Tabela 8 apresenta os valores dos níveis codificados usados no planejamento para a maximização da purificação da inulinase.

**Tabela 8.** Variáveis e níveis estudados no planejamento fatorial completo  $2^2$ , para otimização das condições de purificação enzimática com PEG 1500 e citrato de sódio pH 5,0.

Variáveis Independentes / Níveis	-1,41	-1	0	+1	+1,41
PEG (%)	35,77	37	40	43	44,23
Citrato de sódio (%)	5,77	7	10	13	14,23

Os níveis foram definidos através da curva binodal para o PEG 1500 Da e citrato de sódio construída por Oliveira *et al.* (2008).

### 5.2.7 Purificação da enzima inulinase em sistema aquoso bifásico - álcool/sal

Diferentes concentrações de álcool e sal (18/20 e 24/22) foram testadas para avaliar o potencial de uso de SAB à base de álcoois. As soluções estoque foram preparadas com 40 % (m/m) de sal. O sal utilizado neste sistema foi o citrato de sódio, e os álcoois utilizados foram etanol, n-propílico e iso-propílico. Os sistemas foram pesados em tubos de centrífuga, agitados em vórtex, deixados em repouso em temperatura ambiente por 15 minutos para separação das fases. Após este tempo as amostras foram centrifugadas a 4000 x g por 10 minutos a 5 °C. Foram preparadas amostras controle em cada ensaio onde, no lugar do extrato enzimático, foi utilizado água destilada na mesma proporção. As análises de atividade foram realizadas com a

fase de topo e a fase de fundo, diminuindo-se os valores de atividade da amostra controle. Os resultados foram mensurados em termos de fator de purificação e rendimento.

### 5.2.8 Avaliação das estratégias de purificação de enzimas

#### *Fator de Purificação (FP)*

O fator de purificação (FP) é uma medida empregada para acompanhar as operações de purificação. Ele foi calculado pela Equação 1 (PORTO *et al.*, 2008):

$$FP = \frac{A_{esp\ purificado}}{A_{esp\ bruta}} \quad (1)$$

sendo:

$A_{esp\ purificado}$ : é a atividade específica da enzima purificada ou no precipitado ressuspenso (U/mg);

$A_{esp\ bruta}$ : é a atividade específica da enzima inulinase bruta (U/mg) (extrato bruto antes do equilíbrio de fases (SAB) ou da precipitação).

#### *Recuperação ou rendimento de enzima (RP)*

A recuperação da enzima foi calculada pela Equação 2 (PORTO *et al.*, 2008).

$$RP = \frac{[A_{enzima\ purificada} \times V_{purificado}]}{[A_{extrato\ bruto} \times V_{inicial}]} \times 100 \quad (2)$$

sendo:

$A_{enzima\ purificada}$ : é a atividade enzimática na fração considerada (U/mL);

$A_{\text{extrato bruto}}$ : é a atividade enzimática na alimentação (U/mL);

$V_{\text{inicial}}$ : é o volume inicial do extrato adicionado em mL.

### ***Coefficiente de Partição ( $K_{\text{partição}}$ )***

O coeficiente de partição  $K_{\text{partição}}$  para a inulinase foi calculado pela Equação 3 (PERICIN *et al.*, 2009).

$$K_{\text{partição}} = \frac{A_{F \text{ topo}}}{A_{F \text{ fundo}}} \quad (3)$$

sendo:

$A_{F \text{ topo}}$ : é a atividade enzimática na fase de topo, em U/mL, após o processo de purificação;

$A_{F \text{ fundo}}$ : é a atividade enzimática na fase de fundo, em U/mL, após o processo de purificação.

### ***Razão de Volumes do Sistema ( $R_{\text{azão volume}}$ )***

A razão de volume ( $R_{\text{azão volume}}$ ) do sistema foi determinada pela Equação 4 (NALINANON *et al.*, 2009).

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

sendo:

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

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

## 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.3.1 *Screening* de diferentes condições de PEG/fosfato de potássio no sistema aquoso bifásico para a purificação da inulinase

Para este estudo foram testados PEG de diferentes massas moleculares (1500, 4000, 6000, 8000 e 10000) em pH 6,0 e 7,0. Foram escolhidos pontos aleatórios na região bifásica, baseados nos dados relatados por Minami (1997), da curva binodal de cada sistema (Anexo II). Nas Tabelas 9 a 13 estão apresentados os melhores resultados obtidos para o fator de purificação, recuperação, coeficiente de partição e razão volume.

**Tabela 9.** Purificação de inulinase por sistemas aquosos bifásicos baseados em PEG 1500 pH 6 e 7.

Ensaio	pH	PEG (%)	Fosfato de Potássio (%)	Fase	Fator Purificação	RP (%)	$K_{partição}$	$R_{razão\ volume}$
1	6,0	16	14	Topo	0,9	27,1	0,4	1,2
2	6,0	24	12	Topo	1,1	31,7	0,4	2,0
3	6,0	34	8	Fundo	1,3	71,8	0,1	4,2
4	7,0	8	18	Fundo	0,2	9,9	0,7	2,5
5	7,0	23	14	Topo	0,1	41,1	0,4	1,3
6	7,0	38	5	Fundo	0,9	13,5	0	12,8

**Tabela 10.** Purificação de inulinase por sistemas aquosos bifásicos baseados em PEG 4000 pH 6 e 7.

Ensaio	pH	PEG (%)	Fosfato de Potássio (%)	Fase	Fator Purificação	RP (%)	$K_{partição}$	$R_{razão\ volume}$
7	6,0	14	16	Fundo	0,6	55,3	0,3	0,7
8	6,0	20	12	Topo	0,9	20,4	0,3	1,6
9	6,0	34	8	Topo	0,9	19,0	0,1	1,6
10	7,0	4	15	Fundo	0,4	150,1	0,6	0,2
11	7,0	25	10	Topo	3,4	140,6	0	2,5
12	7,0	36	5	Topo	1,5	195,7	0,7	6,0

**Tabela 11.** Purificação de inulinase por sistemas aquosos bifásicos baseados em PEG 6000 e pH 6 e 7.

Ensaio	pH	PEG (%)	Fosfato de Potássio (%)	Fase	Fator Purificação	RP (%)	$K_{partição}$	$R_{azão\ volume}$
13	6,0	20	10	Fundo	1,2	73,0	0,2	1,7
14	6,0	20	30	Topo	0,3	25,2	0,1	3,3
15	6,0	32	6	Topo	1,2	101,3	0,3	4,4
16	7,0	5	28	Topo	0,7	40,8	4,0	0,1
17	7,0	11	13	Topo	0,8	79,1	0,5	0,4
18	7,0	15	10	Fundo	0,9	43,4	0,1	1,6

**Tabela 12.** Purificação de inulinase por sistemas aquosos bifásicos baseados em PEG 8000 e pH 6 e 7.

Ensaio	pH	PEG (%)	Fosfato de Potássio (%)	Fase	Fator Purificação	RP (%)	$K_{partição}$	$R_{azão\ volume}$
19	6,0	18	16	Fundo	0,1	6,8	0	0,8
20	6,0	22	12	Topo	3,0	100,8	10,1	1,3
21	6,0	30	8	Topo	1,5	65,6	1,2	3,8
22	7,0	5	28	Topo	1,6	65,0	0,2	6,6
23	7,0	11	13	Topo	1,6	54,6	0,3	10,5
24	7,0	15	10	Topo	0,4	59,7	2,5	0,6

**Tabela 13.** Purificação de inulinase por sistemas aquosos bifásicos baseados em PEG 10000 e pH 6 e 7.

Ensaio	pH	PEG (%)	Fosfato de Potássio (%)	Fase	Fator Purificação	RP (%)	$K_{partição}$	$R_{razão\ volume}$
25	6,0	15	14	Fundo	0,4	33,4	0	0,8
26	6,0	24	12	Topo	0,7	181,1	3,6	1,5
27	6,0	30	8	Topo	0,6	78,7	0,5	3,0
28	7,0	11	17	Fundo	0,5	188,7	0,1	0,2
29	7,0	17	10	Topo	0,8	91,3	1,2	0,3
30	7,0	25	10	Topo	1,8	140,6	0,8	2,5

O maior fator de purificação, FP = 3,4 vezes, foi observado no ensaio 11, utilizando 25 % PEG 4000 e 10 % de fosfato de potássio pH 7, com uma recuperação de 140,6 %. O ensaio 20 apresentou um FP de 3,0 vezes utilizando 22 % de PEG 8000 e 12 % de fosfato de potássio pH 6, com uma recuperação de 100,8 %. Não foi encontrado na literatura nenhum trabalho sobre purificação de inulinase por SAB para comparação dos resultados.

As maiores recuperações (RP) foram observadas nos ensaios 12, com 36 % PEG 4000 e 5 % fosfato de potássio e 28, com 11 % PEG 10000 e 17 % fosfato de potássio, com 195,7 % e 188,7 %, respectivamente (Tabela 10 e Tabela 13). No entanto, destes, somente o ensaio 12 conduziu à purificação da enzima (FP > 1).

Valores de recuperação superiores a 100 %, como os encontrados nos ensaios 10, 11, 12, 15, 20, 26, 28 e 30 podem ser atribuídos a dois motivos: i) há remoção de metabólitos ou metabólitos secundários durante a purificação, que inibem a atividade da enzima, e ii) a elevada concentração de sal e/ou proteína, os quais ajudam a manter a conformação da proteína na forma ativa (PAN *et al.*, 2001).

Porto *et al.* (2008) estudaram a extração de uma protease de *Clostridium perfringens* por sistema PEG/citrato e alcançaram uma recuperação de atividade de 255 %. Este aumento da atividade foi relacionado à alteração da estrutura do sítio ativo da enzima na presença de PEG, aumentando sua atividade específica.

Avaliando-se o coeficiente de partição ( $K_{partição}$ ), podemos observar que nem todos os valores de K foram inferiores a 1 (um). Os ensaios 16, 20, 21, 24, 26 e 29

apresentaram valores superiores, demonstrando que a enzima apresenta diferentes tendências de partição entre as fases. Albertsson (1971) e Marcos *et al.* (1999) reportam que a fase rica em sal (fase de fundo) possui características hidrofílicas, e a fase rica em PEG (fase de topo) características hidrofóbicas. Deste modo, o particionamento da enzima inulinase apresentou uma maior afinidade pela fase rica em PEG (fase de topo), favorecida pela sua interação hidrofóbica ao sistema.

As discrepâncias observadas para alguns ensaios entre FP e  $K_{\text{partição}}$ , por exemplo, maior fator de purificação e menor coeficiente de partição deve-se ao fato de que o fator de purificação é calculado em relação atividade específica (U/mg), a qual considera o teor de proteína, já o  $K_{\text{partição}}$  é calculado pela atividade (U/mL).

Quanto ao pH, a maior purificação foi encontrada em pH 7, com recuperação de 140,6 % (ensaio 11). Como a enzima apresenta maior estabilidade na faixa de pH 4,8 – 5,0, pH maiores que 7 não foram testados a fim de evitar a desnaturação enzimática, preservando a manutenção das propriedades biológicas da molécula.

Analisando a influência da massa molar de PEG na razão de volume do sistema, não foi possível estabelecer uma correlação, ou seja, não houve mudança na tendência geral para o comportamento na razão de volume do sistema.

O coeficiente de partição e a razão de volume no sistema são importantes fatores na determinação da eficiência de um processo de purificação. A partição unilateral com elevada razão de volume no sistema reduz o volume de fundo a ser tratado nas etapas posteriores de purificação, obtendo-se assim um processo de integração (acoplamento de concentração com a etapa de purificação) (ANANDHARAMAKRISHNA *et al.*, 2005).

Os fatores de purificação encontrados neste estudo são semelhantes aos encontrados na literatura para a purificação de enzimas. Bassani *et al.* (2010) purificou lipase de *Candida rugosa* utilizando SAB formado por PEG de massa molecular 2000 Da e tampão fosfato de potássio e obteve fator de purificação de 2,3 vezes. Rodríguez-Durán *et al.* (2013), para a purificação de tanase produzida por *Aspergillus niger* empregando SAB composto por PEG nas massas molares de 400, 600 e 1000 Da e fosfato de potássio, obtiveram um FP superior ao encontrado neste trabalho. Uma recuperação de 96 % foi encontrada na fase inferior do sistema composto por PEG 1000 com um aumento de 7 vezes no fator de purificação.

### 5.3.2 Otimização da purificação de inulinase por SAB/fosfato de potássio

Após a verificação das melhores condições para a purificação da enzima pelo SAB, realizou-se um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2<sup>2</sup>, com as variáveis concentração de PEG e fosfato de potássio, a fim de incrementar e/ou otimizar a purificação e recuperação da enzima inulinase utilizando PEG de massa molar 4000 Da e tampão fosfato de potássio em pH 7,0. Durante este estudo, foi constatado que o método de Bradford, utilizado para quantificar proteínas, sofre efeito do sal conforme é apresentado no anexo I. Devido a este fato optou-se por quantificar a proteína neste estudo pelo método fluorimétrico, o qual esta descrito no item 5.2.5.2 deste trabalho.

A matriz do planejamento completo com os valores reais e codificados é apresentada na Tabela 14, onde também estão apresentados os dados referentes ao fator de purificação, recuperação da enzima, coeficiente de partição e razão de volume do sistema obtido em cada ensaio.

Para o ponto central foi definido as condições do ensaio que apresentou o melhor fator de purificação e recuperação da enzima durante a varredura (item 5.3.1), ou seja, 25 % de PEG e 10 % de fosfato de potássio, onde os mínimos e máximos foram obtidos através da curva binodal.

Os resultados das condições experimentais estão apresentados na Tabela 14, a qual apresenta os valores reais e codificados para as variáveis independentes (PEG e concentrações de fosfato de potássio) e as suas respostas em termos de fator de purificação e rendimento da atividade.

Em todos os ensaios, a enzima inulinase demonstrou afinidade para a fase superior. A atividade específica do extrato enzimático bruto foi de 48,7 U/mg. O maior rendimento foi encontrado no ensaio 1 (96,2 %). As menores recuperações foram encontradas no ensaio 3, seguido do ensaio 5 (48,4%).

Com exceção dos ensaios 3, 5 e 7 todos os testes apresentaram algum grau de purificação da enzima. O fator de purificação mais elevado foi encontrado no ensaio 1 (3,85 vezes), utilizando uma concentração de 18% de PEG e 7% de fosfato de potássio. Os fatores de purificação obtidos neste estudo são semelhantes aos encontrados na

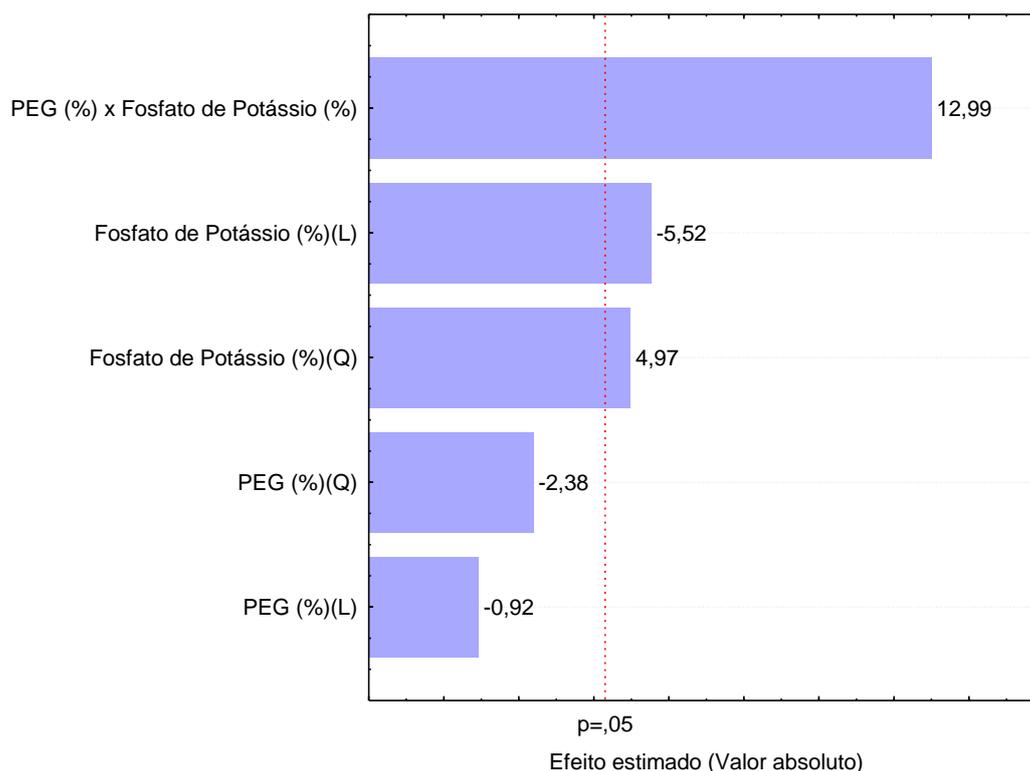
literatura para a purificação de enzimas. Bassani *et al.* (2010), obtiveram um fator de purificação de 2,3 vezes, na purificação de lipase de *Cândida rugosa* utilizando um SAB consistido de PEG 2000 e tampão de fosfato de potássio.

**Tabela 14.** Matriz do planejamento experimental com as variáveis concentração de PEG e de fosfato de potássio e as respostas em termos de fator de purificação (FP), recuperação enzimática (RP), coeficiente de partição ( $K_{partição}$ ) e razão de volume do sistema (razão volume).

Ensaio	PEG (%)	Tampão (%)	Fator de Purificação	RP (%)	$K_{partição}$	Razão volume
1	-1 (18%)	-1 (7%)	3,85	96,2	0,15	3,50
2	+1 (32%)	-1 (7%)	1,55	71,8	0,18	4,83
3	-1 (18%)	+1 (13%)	0	0	0,54	1,13
4	+1 (32%)	+1 (13%)	1,19	64,1	0,47	1,67
5	-1,41 (15,13%)	0 (10%)	0,53	48,4	0,25	1,50
6	+1,41 (34,87%)	0 (10%)	1,07	60,8	0,26	2,8
7	0 (25%)	-1,41 (5,77)	0,88	75,0	0,21	5,2
8	0 (25%)	1,41 (14,23%)	2,38	75,8	0,62	1,36
9	0 (25%)	0 (10%)	1,23	62,1	0,27	2,09
10	0 (25%)	0 (10%)	1,19	59,4	0,25	2,09
11	0 (25%)	0 (10%)	1,44	67,1	0,29	1,09

A previsão das condições envolvidas na purificação de enzimas por SAB pode ser difícil, uma vez que o tipo e a concentração de impurezas no extrato enzimático não são conhecidos, e podem estar afetando diretamente as propriedades do sistema (CHOUYYOK *et al.*, 2005), e, portanto, a sua separação, recuperação e pureza.

Os efeitos das concentrações de PEG e fosfato de potássio sobre o fator de purificação estão apresentados na Figura 7.

**Figura 7.** Gráfico de Pareto dos efeitos para o fator de purificação.

Observando o gráfico foi possível constatar que, das variáveis independentes, somente a concentração de fosfato de potássio, apresentou efeito significativo. Para esta variável o efeito principal linear foi negativo ( $p < 0,05$ ). A interação entre as duas variáveis também apresentou efeito significativo, porém neste caso positivo, ou seja, quando os níveis de ambas as variáveis são aumentados, o fator de purificação aumenta. Se a concentração de PEG e a concentração de fosfato de potássio são baixas, o FP e a recuperação são baixos e a enzima não pode ser purificada. Por outro lado, se as concentrações de PEG e fosfato de potássio forem demasiadamente elevados, a enzima pode ser desnaturada, devido a altas concentrações, o que diminui o desempenho enzimático.

### 5.3.2.1 Efeito da adição de NaCl sobre o particionamento da enzima inulinase e pré-purificação do extrato enzimático

SAB formados por 18 % PEG 4000 e 7 % tampão fosfato de potássio foi a condição otimizada para avaliar o efeito de NaCl no particionamento da inulinase. Concentrações de cloreto de sódio variando de 0,1 a 1,0 mol/L foram escolhidas para

determinar o efeito da adição de sal, a fim de melhorar o particionamento da inulinase. Os resultados são apresentados na Tabela 15.

**Tabela 15.** Efeito da concentração de sal na purificação da inulinase de *K. marxianus*.

Ensaio	Sistemas	Atividade Específica (U/mg)	Recuperação Enzimática (%)	Fator de Purificação (PF)
1	18% PEG 4000 + TFP 7% (sem NaCl)	187,3	96,2	3,85
2	18% PEG 4000 + TFP 7% + NaCl 0,1 mol/L	170,4	116,0	3,50
3	18% PEG 4000 + TFP 7% + NaCl 0,5 mol/L	142,0	107,0	2,91
4	18% PEG 4000 + TFP 7% + NaCl 1,0 mol/L	89,4	106,0	1,83
5	NaCl 0,5 mol/L + precipitação com álcool n-propílico + extração com SAB 18% PEG 4000 e TFP 7%	229,2	86,2	5,45

\* Extrato enzimático com atividade específica de 42.0 U/mg.

O aumento da concentração de sal proporcionou uma diminuição do fator de purificação da enzima, o qual é acompanhado por um aumento de recuperação, indicando uma ativação da enzima. Resultados similares foram obtidos por Kavakçioğlu e Tarhan (2013), os quais estimaram o efeito de NaCl no particionamento de catalase e descobriram que quanto maior a concentração de sal utilizada, menor é o fator de purificação. Uma alta concentração de sal pode afetar a estrutura terciária da enzima conduzindo a uma desnaturação da mesma (KINUGASA *et al.*, 2003; HEBBAR *et al.*, 2008). Este não parece ser o caso, uma vez que a recuperação aumentada. Uma hipótese possível seria o aumento da partição de proteínas contaminantes para a fase superior devido ao efeito de precipitação salina.

O resultado da estratégia de combinação (PEG + TFP + NaCl) para a purificação da inulinase é mostrado no ensaio 5, da Tabela 15, o qual demonstra que uma combinação de procedimentos simples pode melhorar o FP em até 5,45 vezes, ou seja, duas vezes superior aos relatados na literatura para a purificação da inulinase. Zhang *et al.* (2009) relataram um FP de apenas 2,53 e recuperação de 46%, mesmo após purificação da inulinase recombinante por cromatografia de afinidade.

### 5.3.3 *Screening* de diferentes condições de PEG/citrato de sódio no sistema aquoso bifásico para a purificação da inulinase

Para este estudo foram testados PEG de diferentes massas moleculares (1500, 4000, 6000 e 8000) em pH 5,0. Foram escolhidos pontos aleatórios da região bifásica, baseados na curva binodal de cada sistema (Anexo III). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 16.

Para a purificação, os ensaios que conduziram aos melhores resultados, com fatores de purificação (FP) de 2,0 e 1,2 vezes foram os conduzidos utilizando 40 % PEG 1500 e 10 % citrato de sódio (fase de topo) e 45 % PEG 4000 e 10 % citrato de sódio (fase de fundo), respectivamente. Cabe destacar que as recuperações obtidas para estes ensaios foram de 37,2 e 20,9 %, respectivamente.

**Tabela 16.** Resultados obtidos com sistemas baseados em PEG 1500, 4000, 6000 e 8000 em pH 5.

PEG	Ensaio	PEG (%)	Citrato de Sódio (%)	Fase	Fator de Purificação	RP %	$K_{\text{partição}}$	$R_{\text{azão volume}}$
1500	1	40	10	Topo	2,0	37,2	0,1	4,1
	2	25	20	Topo	0,4	5,5	0,1	1,3
4000	3	45	10	Fundo	1,2	20,9	0,1	3,9
	4	10	25	Fundo	0,2	34,0	0,1	0,4
6000	5	40	5	Fundo	0,2	30,9	0,2	0,2
	6	20	10	Fundo	0,3	6,4	0,2	1,9
8000	7	30	6	Fundo	0,4	30,4	0,1	6,5
	8	5	20	Fundo	0,3	16,1	0,1	3,9

As maiores recuperações (RP), com 37,2 e 34,0 %, foram observadas para os ensaios 1, com 40 % PEG 1500 e 10 % citrato de sódio, e 4, com 10 % PEG 4000 e 25 % citrato de sódio, respectivamente. No entanto, destes ensaios somente o ensaio 1 conduziu à purificação da enzima ( $FP > 1$ ).

Avaliando-se o coeficiente de partição ( $K_{\text{partição}}$ ), pode-se observar que todos os valores de K foram bem inferiores a 1 (um), demonstrando a tendência da partição da enzima para uma das fases.

Neste contexto observa-se uma distinção nítida da distribuição enzimática em função da massa molar do PEG. Nos ensaios conduzidos com PEG 1500 a enzima se concentrou na fase rica em PEG (fase de topo) enquanto que nos ensaios conduzidos com PEG  $\geq$  a 4000 a enzima se concentrou na fase rica em citrato (fase de fundo).

Oliveira *et al.*, 2001 estudaram a purificação da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), de *Saccharomyces cerevisiae*, por sistema aquoso bifásico, preparados com polietilenoglicol (PEG) e sal citrato. Os resultados mostraram que é possível purificar a G6PDH nesse tipo de sistema, com a condução do processo em duas etapas de extração. A primeira delas realizada com 17 % (m/m) de PEG 400 e 20 % (m/m) de citrato, proporcionou a obtenção de um alto elevado valor de coeficiente de partição ( $K_{\text{partição}} = 142$ ), porém com um baixo aumento de pureza da enzima na fase superior do sistema (FP = 0,9). Uma segunda etapa de extração da fase superior da primeira etapa, realizada com 10 % (m/m) de PEG 1500 e 15 % (m/m) de citrato conduziu a um aumento de pureza na fase superior de 2,2 vezes.

#### **5.3.4 Estratégia para a maximização da purificação por SAB/citrato de sódio**

Após a verificação das melhores condições para a purificação da enzima pelo SAB, realizou-se um delineamento composto rotacional (DCCR) 2<sup>2</sup>, variando a concentração de PEG e citrato de sódio, a fim de incrementar e/ou otimizar a purificação e recuperação da enzima inulinase utilizando PEG de massa molar 1500 e tampão citrato de sódio em pH 5,0.

A matriz do planejamento completo com os valores reais e codificados é apresentada na Tabela 17. Também são apresentados os valores referentes ao fator de purificação, recuperação da enzima, coeficiente de partição e razão de volume do sistema obtido em cada ensaio.

**Tabela 17.** Matriz do planejamento experimental com as variáveis concentração de PEG e de citrato de sódio e as respostas em termos de fator de purificação (FP), recuperação enzimática (RP), coeficiente de partição ( $K_{partição}$ ) e razão de volume do sistema (Razão volume.)

Ensaio	PEG (%)	Tampão (%)	Fator de Purificação	RP (%)	$K_{partição}$	Razão volume
1	-1 (37%)	-1 (7%)	0,8	80,3	0,00	5,6
2	+1 (43%)	-1 (7%)	1,2	79,7	0,01	6,0
3	-1 (37%)	+1 (13%)	0,8	54,3	0,00	3,7
4	+1 (43%)	+1 (13%)	1,2	27,7	0,10	9,3
5	-1,41 (35,77%)	0 (10%)	1,0	48,5	0,01	5,6
6	+1,41 (44,23%)	0 (10%)	0,6	27,3	0,02	7,0
7	0 (40%)	-1,41 (5,77%)	1,7	32,8	0,00	33,0
8	0 (40%)	1,41 (14,23%)	1,1	49,3	0,01	5,6
9	0 (40%)	0 (10%)	1,3	82,9	0,02	5,0
10	0 (40%)	0 (10%)	1,4	81,9	0,01	5,0
11	0 (40%)	0 (10%)	1,4	81,3	0,02	5,0

O ponto central foi definido de acordo com o ensaio que apresentou melhor fator de purificação e recuperação da enzima durante a varredura (item 5.4.3), (40 % de PEG e 10 % de citrato de sódio).

O fator de purificação variou de 0,6 a 1,7. O maior valor, 1,7 vezes, com uma recuperação enzimática de 32,8 %, foi observado no ensaio 7, o qual emprega a concentração de PEG 40 % e de tampão citrato de sódio 7 %.

O ponto central não forneceu resultados semelhantes aos obtidos na varredura (FP de 2,0 vezes e recuperação de 37,2 %). O menor valor do FP, em relação à varredura, foi associado à baixa recuperação, seja por desnaturação e/ou outro fenômeno ainda não elucidado.

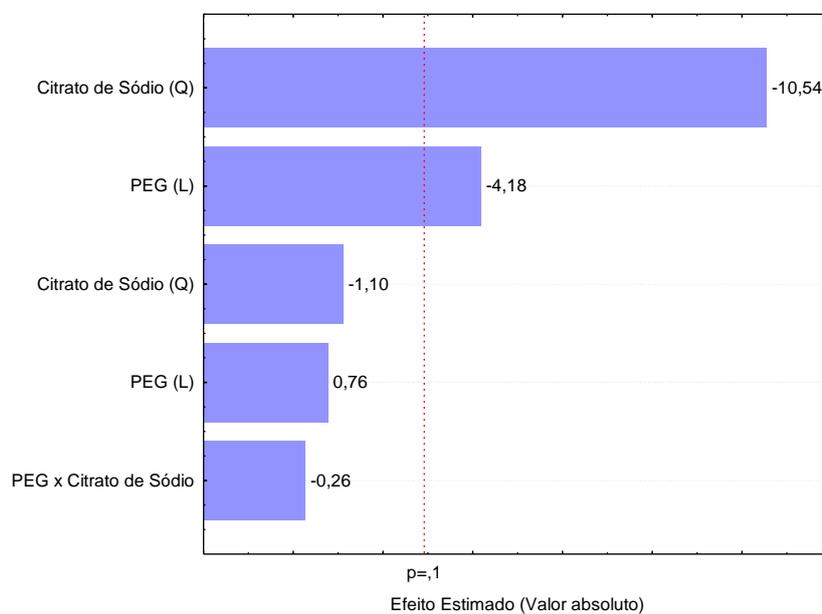
A predição das condições envolvidas na purificação de enzimas por SAB pode ser difícil, uma vez que não se sabe o tipo e a concentração de impurezas presentes no extrato, as quais podem estar afetando diretamente as propriedades do sistema e do

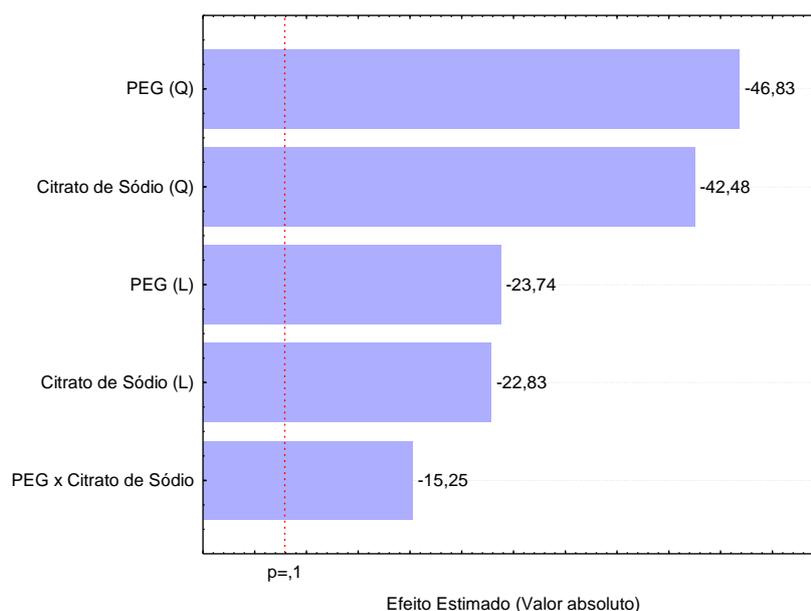
soluto (CHOUYYOK *et al.*, 2005), e, portanto na separação, purificação e recuperação da enzima.

De acordo com os resultados, o FP e a recuperação enzimática podem ser incrementados quando o sistema é constituído por menores concentrações de citrato de sódio e maiores de PEG.

As Figuras 8 e 9 apresentam os gráficos de Pareto com os efeitos estimados das variáveis independentes avaliadas para as respostas fator de purificação e rendimento de atividade.

**Figura 8.** Gráfico de Pareto para os efeitos das variáveis estudadas sobre o fator de purificação.



**Figura 9.** Gráfico de Pareto para os efeitos das variáveis estudadas sobre o rendimento.

De acordo com as Figuras 8 e 9, tanto a concentração de PEG, quanto a concentração de citrato de sódio apresentam efeitos negativos, tanto no fator de purificação quanto no rendimento da atividade ( $p < 0,10$ ), indicando que ambas as variáveis quando diminuídas podem proporcionar uma melhora nos FP e rendimento

Na figura 9, a interação entre as duas variáveis apresentou um efeito negativo, ou seja a diminuição dos níveis de ambas irá resultar na redução do rendimento. Se a concentração de PEG e a concentração de citrato de sódio são muito baixas, o FP e a recuperação são baixos e a enzima talvez não seja purificada. Se as concentrações tanto de PEG quanto de citrato de sódio forem muito altas, a enzima pode ser desnaturada devido às altas concentrações, diminuindo assim o FP e o rendimento enzimático.

### 5.3.5 Sistema aquoso bifásico com álcool e sal para purificação de inulinase

Para este estudo foi utilizado o tampão citrato de sódio (pH 5,0) e os álcoois etanol, n-propílico e iso-propílico. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 18.

**Tabela 18.** Fator de purificação (FP) e recuperação (R %) da enzima inulinase na fase de topo para o sistema aquoso bifásico sal e álcool.

Ensaio	Sistema Bifásico	Concentração de Álcool /Sal	Fator de Purificação (FP)	Recuperação (%)
1	Etanol/citrato de sódio	24/22	0,8	15,1
2	N-propílico/citrato de sódio	18/20	1,2	5,9
3	Iso-propílico/citrato de sódio	18/20	1,0	12,4

Os resultados obtidos mostraram que não foi possível obter um bom FP nem uma boa recuperação enzimática com os sistemas testados. O maior fator de purificação, de 1,2 vezes, foi obtido para o ensaio 2, o qual emprega uma concentração de 18 % para o álcool N-propílico e de 20 % citrato de sódio. No entanto, o maior rendimento, com 15,1 %, foi obtido no ensaio 1, o qual empregou concentrações de 24 % de etanol e de 22 % de citrato de sódio.

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

#### 5.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

A otimização da purificação da enzima inulinase por sistema aquoso bifásico composto por polietilenoglicol e fosfato de potássio foi alcançada. Os melhores resultados em termos de fator de purificação (3,85) e recuperação da enzima (96,2 %) foram obtidos quando o sistema foi composto por uma concentração de 18 % de polietilenoglicol de massa molar 4000 e 7 % de tampão fosfato de potássio. Embora o sistema aquoso bifásico não seja suficientemente seletivo para purificação total da enzima, deve ser levado em consideração como um método em potencial para concentração e purificação nas etapas iniciais dos processos de purificação da enzima. Um fator de purificação de 5,45 vezes e uma recuperação de 86,2 % foi obtido por uma combinação de processos, com a adição de sal ao extrato enzimático bruto, seguida de precipitação com álcool n-propílico e SAB na condição otimizada anteriormente.

## 5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTSSON, P.A. **Partition of cell particles and macromolecules**. John Wiley, 2ª edição, 1971.
- ALI, S. M.; LING, T. C.; MUNIANDY, S.; TAN, Y. S.; RAMAN, J.; SABARATNAM V. **Recovery and partial purification of fibrinolytic enzymes of *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc by an aqueous two-phase system**. Separation and Purification Technology, v.122, p. 359–366, 2014.
- ANANDHARAMAKRISHNA, C.; RAGHAVENDRA, S.N.; BARHATE, R.S.; HANUMESH, U.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. **Aqueous two-phase extraction for recovery of proteins from cheese whey**. Food and Bioproducts Processing, v. 83, p.191-197, 2005.
- ANSEJO, J. A.; ANDREWS, B. A. **Aqueous two-phase systems for protein separation: phase separation and applications**. Journal of Chromatography A, v. 1238, p. 1– 10, 2012.
- ANTELO, F.S. **Purificação de Ficocianina de *Spirulina platensis* através de Sistema Aquoso Bifásico e Caracterização Cinética da Desnaturação Térmica**. Mestrado em Engenharia e Ciências dos Alimentos. Rio Grande, RS, 2007.
- ANTELO, F.S.; ANSCHAU, A.; COSTA, J. V.; KALIL, S.J. **Extraction and Purification of C-phycoyanin from *Spirulina platensis* in Conventional and Integrated Aqueous Two-Phase Systems**. Journal of Brazilian Chemical Society p.1-6, 2010.
- BARBOSA, J. M. P.; SOUZA, R. L.; A. FRICKS, T.; ZANIN, G. M.; SOARES, C. M.F.; LIMA, A. S. **Purification of lipase produced by a new source of *Bacillus* in submerged fermentation using an aqueous two-phase system**. Journal of Chromatography B, v. 879, p. 3853– 3858, 2011.
- BASSANI G.; FUCIÑOS P.; PICÓ G.; FARRUGGIA B. **Candida rugos lipase LIP1-polyethyleneglycol interaction and the relation with its partition in aqueous two-phase systems**. Colloids and surfaces B: Biointerfaces, v. 75, p. 532-537, 2010.
- BRADDOO, S.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. **Partitioning and resolution of mixture of two lipase from *Bacillus stearothermophilus* SB-1 in aqueous two-phase system**. Process Biochemistry, v. 35, p. 57-62, 1999.
- CARDOSO, M.V.C. **Efeito do centro metálico nas interações intramoleculares dos complexos [M(CN)5NO]x- com o poli(óxido de etileno) em sistema aquoso bifásico**. Dissertação (Mestrado em Agroquímica), Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 2007.
- CARVALHO, C. P.; COIMBRA, J. S. R.; COSTA, I. A. F.; MINIM, L. A.; SILVA, L. H. M.; MAFFIA, M. C. **Equilibrium Data for PEG 4000 + Salt + Water Systems from (278.15 to 318.15) K**. Journal Chemical Engineering., v. 52, p. 351-356, 2007.
- CHOUYYOK, W.; WONGMONGKOL, N.; SIWARUNGSON, N.; PRICHANONT, S. **Extraction of alkaline protease using an aqueous two-phase system from cell free *Bacillus subtilis* TISTR 25 fermentation broth**. Process Biochemistry, v. 40, p. 3514-3518, 2005.
- COGHETTO, C. C.; SCHERER, R. P.; SILVA, M. F.; GOLUNSKI, S.; PERGHER, S. B. C.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V.; TREICHEL, H. **Natural montmorillonite as**

- support for the immobilization of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571.** *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 1, p. 284–289, 2012.
- HEBBAR, H. U., SUMANA, B., & RAGHAVARAO, K.S.M.S. **Use of reverse micellar systems for the extraction and purification of bromelain from pineapple wastes.** *Bioresource Technology*, v. 99, p. 4896-4902, 2008.
- KAVAKÇIOĞLU, B., & TARHAN, L. **Initial purification of catalase from *Phanerochaete chrysosporium* by partitioning in poly(ethylene glycol)/salt aqueous two phase systems.** *Separation and Purification Technology*, v. 105, p. 8-14, 2013.
- KINUGASA, T., KONDO, A., MOURI, E., ICHIKAWA, S., NAKAGAWA, S., NISHII, Y., WATANABE, K., & TAKEUCHI, H. **Effects of ion species in aqueous phase on protein extraction into reversed micellar solution.** *Separation and Purification Technology*, v. 31, p. 251-259, 2003.
- MACIEL, M.H.C.; OTTONI, C. A.; HERCULANO, P. N.; PORTO, T. S.; PORTO, A. L.F.; SANTOS, C.; LIMA, N.; MOREIRA, K. A.; SOUZA-MOTTA, C. **Purification of polygalacturonases produced by *Aspergillus niger* using an aqueous two-phase system.** *Fluid Phase Equilibria*, v. 371, p.125–130, 2014.
- MARCOS, J.C.; FONSECA, L.P.; RAMALHO, M.T.; CABRAL, J.M.S. **Partial purification of penicillin acylase from *Escherichia coli* in poly (ethylene glycol)-sodium citrate aqueous two-phase systems.** *Journal Chromatography B*, v. 734, p. 15-22, 1999.
- MARTINS, J. P.; CARVALHO, C. P.; DA SILVA, L. H. M.; COIMBRA, J. S. R.; DA SILVA, M.C. H.; RODRIGUES, G. D.; MINIM, L. A. **Liquid-Liquid Equilibria of an Aqueous Two-Phase System Containing Poly(ethylene) Glycol 1500 and Sulfate Salts at Different Temperatures.** *Journal Chemical Engineering.*, v. 53, p. 238–241, 2008.
- MINAMI, M.N. **Extração Líquido-Líquido aplicada à separação e purificação da Amiloglicosidase.** São Paulo. Dissertação de Mestrado. Engenharia Química, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, SP, 1997.
- NALINANON, S.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; KISHIMURA, H. **Partitioning of protease from stomach of albacore tuna (*Thunnus alalunga*) by aqueous two-phase systems.** *Process Biochemistry*, v. 44, p. 471-476, 2009.
- NANDINI, K.E.; RASTOGI, N.K. **Liquid-Liquid extraction of lipase using aqueous two-phase system.** *Food Bioprocess Technology*, 2009. DOI 10.1007/s11947-008-0160-0.
- OLIVEIRA, G. G. G.; SILVA, D. P.; ROBERTO, I. C.; VITOLO, M.; PESSOA-JÚNIOR, A. **Purificação de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) em sistemas deduas fases aquosas utilizando PEG/citrato.** *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 37, p. 177-187, 2001.
- OLIVEIRA, R. M.; COIMBRA, J. S. D. R.; FRANCISCO, K. R.; MINIM, L. A.; DA SILVA, L. H. M.; PEREIRA, J. A. M. **Liquid-Liquid Equilibrium of Aqueous Two-Phase Systems Containing Poly(ethylene) Glycol 4000 and Zinc Sulfate at Different Temperatures.** *Journal of Chemical & Engineering*, v. 53, p. 919–922, 2008.
- OOI, C. W.; TEY, B. T.; HII, S. L.; KAMAL, S. M. M.; LAN, J. C. W.; ARIFF, A.; LING, T. C. **Purification of lipase derived from *Burkholderia pseudomallei* with alcohol/salt-based aqueous two-phase systems.** *Process Biochemistry*, v. 44, p. 1083–1087, 2009.

- PAN, I.H.; YAO, H.J.; LI, Y.K. **Effective extraction and purification of  $\beta$ -xylosidase from *Trichoderma koningi* fermentation culture by aqueous two-phase partitioning.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 28, p. 196-201, 2001.
- PARK, H.; LEE, S.; CHANG, W.; KOO, Y. **Affinity separation by protein conjugated IgG in aqueous two-phase systems using horseradish peroxidase as a ligand carrier.** *Journal of Chromatography B*, v. 856, p. 108–112, 2007.
- PERICIN, D.M.; MADAREV-POPOVIĆ, S.Z.; RADULOVIĆ-POPOVIĆ, L.M. **Optimization of conditions for acid protease partitioning and purification in aqueous two-phase system using response surface methodology.** *Biotechnology Letters*, v. 31, p. 43-47, 2009.
- 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: Process Intensification*, v. 7, p. 716-721, 2008.
- RODRÍGUEZ-DURÁN, L. V.; SPELZINI, D; BOERIS, V.; AGUILAR, C. N.; PICO, G. A. **Partition in aqueous two-phase system: Its application in downstream processing of tannase from *Aspergillus niger*.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 101, p. 392-397, 2013.
- RUIZ-RUIZ, F.; BENAVIDES, J.; AGUILAR, O.; RITO-PALOMARES, M. **Aqueous two-phase affinity partitioning systems: Current applications and trends.** *Journal of Chromatography A*, v. 1244, p. 1– 13, 2012.
- SILVA, L.H.M; LOH, W. **Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas.** *Química Nova*, v. 29, p. 1345-1351, 2006.
- TUBIO, G.; NERLI, B.; PICÓ, G. **Relationship between the protein surface hydrophobicity and its partitioning behaviour in aqueous two-phase systems of polyethyleneglycol-dextran.** *Journal Chromatography B*, v. 799, p. 293-301, 2004.
- TUBIO, G.; PELLEGRINI, L.; NERLI, B.B.; PICO G. A. **Liquid-Liquid Equilibria of Aqueous Two-Phase Systems Containing Poly(ethylene glycols) of Different Molecular Weight and Sodium Citrate,** *J. Chem. Eng. Data*, v. 51, p. 209-212, 2006.
- ZAFARANI-MOATTAR, M. T.; SADEGHI, R.; HAMIDI, A. A. **Liquid-liquid equilibria of an aqueous two-phase system containing polyethylene glycol and sodium citrate: experiment and correlation,** *Fluid Phase Equilibria*, v. 219 p. 149–155, 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.
- ZUNIGA, A. D. G.; PEREIRA, J.A.M.; COIMBRA, J.S.R.; MINIM, L.A.; ROJAS, E.E.G. **Revisão: Técnicas Usadas no Processo de Purificação de Biomoléculas.** *Boletim do Ceppa*, v. 21, n.1, p. 61-82, 2003.

## **CAPÍTULO VI**

---

### **MEMBRANAS DE AFINIDADE**

## 6.1 REFERENCIAL TEÓRICO

### 6.1.1 Membranas de afinidade

Membranas de afinidade consistem fundamentalmente de membranas de microfiltração, cujos poros apresentam quimicamente ligados a sua estrutura ligantes de afinidade. Eles permitem que altas vazões sejam atingidas com baixas pressões, possibilitando o processamento de volumes elevados de meio reacional em um curto espaço de tempo. Grandes volumes de soluções diluídas podem ser aplicados às membranas de afinidade sem qualquer pré-tratamento e sem reduzir o rendimento da proteína desejada (CASTILHO *et al.*, 2002). A característica mais importante das membranas de afinidade é a alta vazão e baixa perda de carga, em comparação com a baixa vazão e alta perda de carga típica em colunas de cromatografia de afinidade (ZENG e RUCKENSTEIN, 1996).

O preparo de membranas de afinidade envolve três etapas: (1<sup>a</sup>) preparo da membrana, (2<sup>a</sup>) ativação da membrana e (3<sup>a</sup>) acoplamento do ligante. O material ideal para o preparo das membranas deve preencher as seguintes condições: (i) estrutura porosa apropriada para acomodar a interação entre as biomoléculas e ligantes, (ii) estabilidade mecânica para suportar elevados fluxos e baixas pressões (iii) disponibilidade de grupamentos reativos, como -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH, -COOH, para o posterior acoplamento de molécula espaçadora ou ligantes, (iv) estabilidade química para suportar as condições severas na eluição, (v) estabilidade térmica para suportar temperaturas de esterilização, (vi) superfície hidrofílica para minimizar interações não específicas, como por exemplo, interações hidrofóbicas (ZOU *et al.*, 2001; CHARCOSSET, 1998).

### 6.1.2 Tipos de membranas empregadas

A celulose e seus derivados são materiais amplamente usados no preparo de membranas. A celulose constitui-se de moléculas de D-glicose unidas por ligações  $\beta$ -1,4 e  $\beta$ -1,6. Apesar de sua elevada resistência mecânica, a utilização da celulose nativa na purificação de proteínas é limitada devido à sua sensibilidade a condições alcalinas. Além disso, a disponibilidade de grupos reativos (-CH<sub>2</sub>OH) em moléculas de celulose é

baixa, resultando em baixas densidades de ligantes. As membranas de celulose regenerada e de acetato de celulose, por sua vez, apresentam uma superfície hidrofílica, grupos hidroxila reativos abundantes, assim como baixa adsorção não específica. Quitina e quitosana também já foram usadas para preparar membranas macroporosas, devido às características de hidrofiliabilidade, biocompatibilidade e reatividade química (ZENG e RUCKENSTEIN, 1996; ZOU *et al.*, 2001; MELLADO, 2005).

Poli(sulfona) (PSf) tem-se demonstrando um polímero adequado para uso como membrana, já que possui boa resistência térmica e biológica, além de ser razoavelmente estável quimicamente, suas propriedades não sofrem alterações após reações químicas (CHARCOSSET, 1998). Rodemann e Staude (1994) introduziram grupos epóxi em uma membrana de PSf com uma molécula espaçadora distante sete átomos do esqueleto polimérico. Após a ligação de ácido iminodiacético (IDA) ao grupo epóxi, a membrana foi complexada com íons cobre e usada para concentrar soluções diluídas de histidinas.

As membranas microporosas de poliamida oferecem uma distribuição estreita de tamanho de poros e rigidez mecânica, enquanto membranas de nylon possuem baixa concentração de grupos amina terminais, o que acarreta em baixas densidades de ligante (CHARCOSSET, 1998; MELLADO, 2005).

### **6.1.3 Corantes utilizados em membranas de afinidade**

Como ligantes, os corantes têm despertado um papel importante na separação, purificação e recuperação de proteínas, tanto para separações em laboratório como em grande escala. São baratos, possuem grupos polares e não polares, e podem interagir com as proteínas por meio de forças eletrostáticas, possibilitando seu emprego para a separação de um grande número de proteínas e enzimas (CHEN *et al.*, 2009).

A molécula de corante-ligante possui, além de anéis aromáticos de características hidrofóbicas, diferentes grupos funcionais, como  $-\text{SO}_3\text{H}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{NH}$ , etc, que podem interagir com a proteína a ser purificada. Corantes reativos apresentam alta afinidade por proteínas, embora a capacidade de ligação e a especificidade variem em função da natureza do corante. Comercialmente corantes reativos são ligantes ideais para cromatografia de afinidade, dado que eles são relativamente baratos e robustos para sistemas de processamentos químicos e biológicos. Diferentes corantes, incluindo azul reativo 4, azul cibracon F3GA (azul reativo 2), vermelho reativo 120, amarelo reativo

HE-4R, marrom procion MX 5BR, verde reativo 19 e verde reativo 5, juntamente com diferentes tipos de materiais têm sido estudados em laboratório.

Arica e Bayramoglu (2005) estudaram a síntese da membrana a partir de 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA) e quitosana (pHEMA/quitosana), por polimerização iniciada por UV. Azul Reativo 4 (Azul-4) e Vermelho Reativo 120 (Vermelho-120) foram imobilizadas na membrana pHEMA/quitosana. Na primeira parte deste estudo, as características de ligação de lisozima em diferentes corantes ligantes imobilizados em membranas foram estudadas, utilizando membranas sem o ligante como controle. Na segunda parte, foi investigada a eficácia da purificação de lisozima a partir da clara de ovo. A pureza da lisozima foi de 84 % utilizando uma membrana funcionalizada com vermelho-120, e 21 % para membrana funcionalizada com azul-4. Os rendimentos de recuperação foram de 72 % e 16 % para membranas vermelho-120 e azul-4, respectivamente. A membrana funcionalizada com o corante vermelho-120 proporcionou um método eficiente para purificar a lisozima em clara de ovo, mostrando elevada capacidade de adsorção e alta seletividade para a lisozima.

Chen *et al.* (2009) estudaram a preparação de membranas de nylon pelo acoplamento com quitosana envolvendo corantes ligantes vermelho reativo 120 e marrom reativo 10. Estes corantes foram covalentemente ligados à membrana por uma reação de substituição nucleofílica entre o cloreto de triazina e os grupos amino das membranas de nylon revestidas com quitosana (CS). Estas membranas foram utilizadas na purificação da papaína em pó a partir de extratos de mamão. A capacidade de adsorção da papaína pelas membranas contendo os corantes vermelho reativo 120-CS e marrom reativo 10-CS foram de 143,6 mg/g e 107,3 mg/g, respectivamente. A eficácia da adsorção foi demonstrada pela isoterma de Freundlich. A enzima foi eluída das membranas de afinidade utilizando NaCl 1,0 M pH 6,0. Foram encontrados rendimentos superiores a 80 % para a membrana contendo o corante vermelho 120-CS e apenas uma recuperação de 50 % foi possível para a membrana contendo o corante marrom 10-CS. Os autores concluíram que a membrana de nylon/vermelho 120-CS- desempenhou um papel ativo no processo de separação e purificação de extratos de papaína.

Neste contexto, este capítulo teve como objetivo sintetizar membranas de afinidade pelo acoplamento de quitosana e corantes reativos a estas membranas e estudar a adsorção de albumina de soro bovino (ASB) nas membranas formadas.

## 6.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.2.1 Ligantes de afinidade e agentes facilitadores

O desempenho de membranas de afinidade na purificação dos extratos enzimáticos foi avaliado utilizando ligantes de afinidade e agentes facilitadores em sistemas com membranas de ultrafiltração. Ligantes propostos na literatura foram testados, entre eles os corantes reativos. As membranas foram selecionadas de acordo com os grupamentos funcionais adequados para a reação com os grupamentos dos ligantes em condições previamente determinadas, seguindo protocolos já publicados na literatura (CHEN *et al.*, 2009; GUO e RUCKENSTEIN, 2003).

Membranas microporosas de quitosana foram preparadas pelo método de inversão de fase e, posteriormente, juntamente com os corantes azul reativo 4 e vermelho reativo 120, para gerar membranas de afinidade de quitosana-corante. A albumina de soro bovino (ASB) foi selecionada como uma proteína modelo e sua adsorção na membrana de quitosana foi investigada.

### 6.2.2 Preparo da membrana com quitosana

A solução de quitosana empregada neste estudo foi obtida dissolvendo 1 g de quitosana em 100 mL de solução aquosa de ácido acético 1 % contendo 5 g de polietileno glicol (PEG) 35.000. Posteriormente, 2 mL dessa solução foram adicionados à membrana (acetato celulose 0,8  $\mu\text{m}$ , poliétersulfona 0,22  $\mu\text{m}$  e poliétersulfona 0,45  $\mu\text{m}$ ) em placa de petri. O solvente foi submetido a uma etapa de evaporação por 1,5 horas em temperatura ambiente. A membrana foi imersa em uma solução de NaOH 0,75 mol/L por 6 horas. Após esta etapa, as membranas foram lavadas várias vezes com água destilada e armazenadas em meio úmido para uso posterior. Este suporte proporciona melhores propriedades mecânicas à membrana (ZENG e RUCKENSTEIN, 1996).

### 6.2.3 Reação de acoplamento do corante à membrana de quitosana

Os corantes azul reativo 4 e vermelho reativo 120 foram covalentemente acoplados à membrana de quitosana através da reação nucleofílica entre o cloreto de seu

anel e o grupo hidroxila ou amino da molécula de quitosana, sob condições alcalinas leves. Primeiro, a membrana de quitosana foi imersa, a 60 °C, por 1 hora, em 20 mL de uma solução aquosa contendo 10 g/L de corante reativo. Posteriormente, 1,2 g de cloreto de sódio foram adicionados à solução a 60 °C a fim de estimular a adsorção do corante. Desde que a concentração NaCl seja elevada (<1,0 M), as interações eletrostáticas entre o corante e quitosana são desprezíveis, nestas condições o *salting out* do corante é provavelmente o responsável pela estimulação da adsorção. Na presença de elevada força iônica as moléculas de água estão tão bem organizadas entre si pelo grande número de íons, que as moléculas de corante tornam-se menos compatíveis com a água, aumentando a adsorção. Após 2 h, a temperatura da solução foi aumentada para 80 °C e o pH aumentou de 8 para 10,5 pela adição de 0,4 g de carbonato de sódio. Nestas condições, ocorre uma reação química entre o grupo cloreto (Cl<sup>-</sup>) do corante com grupos -OH ou -NH<sub>2</sub> da quitosana, com a eliminação de HCl, resultando no acoplamento, via ligação covalente, do corante reativo à membrana de quitosana. Uma (1) hora depois, a solução foi resfriada à temperatura ambiente e lavada várias vezes com água destilada morna para retirar o corante quimicamente não ligado à membrana. O processo de lavagem foi mantido até que a solução se tornou incolor. A fim de evitar futura lixiviação do corante durante a adsorção de proteínas, a membrana foi lavada com excesso de tampão tris-HCl 50 mM pH 8. Finalmente, a membrana de afinidade foi armazenada em solução aquosa com 0,4 % de azida sódica para evitar biodegradação (ZENG e RUCKENSTEIN, 1996).

#### 6.2.4 Equilíbrio de adsorção de proteínas

As membranas quitosana-corante reativo foram imersas em 5 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8 por 30 min, antes de serem introduzidas em solução de ASB na concentração de 1 g/L, onde permaneceram por 4 horas a 25 °C em agitação constante a 200 rpm, para atingir o equilíbrio de adsorção. Posteriormente, as membranas foram retiradas, fazendo-se a leitura da adsorção de proteínas pela membrana através do aparelho *Qubit Fluorometer*, pelo método fluorimétrico utilizando um kit comercial da Invitrogen® (Quanti-it). A amostra (10 µL) foi adicionada a uma alíquota de 190 µL do reagente com posterior leitura em fluorímetro digital (*Qubit Fluorometer*) utilizado, conforme as determinações do fabricante.

### 6.2.5 Estudo da otimização do uso de corante e quitosana

Após a realização de ensaios preliminares para antever o comportamento da adsorção das membranas de quitosana acopladas com corantes reativos, fez-se a otimização das condições experimentais utilizando a técnica de planejamento de experimentos e análise de superfície de resposta.

Os efeitos da percentagem de quitosana e percentagem de corante utilizadas foram analisados por um delineamento composto central rotacional  $2^2$  (DCCR), totalizando 7 experimentos. As faixas de quitosana e corante estudada estão apresentadas na Tabela 19. Os níveis foram definidos com base em ensaios preliminares realizados nos itens 6.2.2 e 6.2.3, de acordo com Zeng e Ruckenstein (1996). Os resultados foram analisados utilizando o software Statistica 8.0 (Stat Soft Inc. Tulsa, OK, EUA).

**Tabela 19.** Variáveis e níveis estudados no planejamento experimental  $2^2$ , para otimização da adsorção de proteína.

Variáveis Independentes / Níveis	-1	0	+1
Corante (%)	0,1	0,55	1,0
Quitosana (%)	0	1	2

As variáveis e os níveis estudados foram adotados para as membranas de acetato celulose 0,8  $\mu\text{m}$  e poliétersulfona 0,22  $\mu\text{m}$ , as quais apresentaram melhores resultados em testes preliminares.

### 6.2.6 Dessorção

A membrana que apresentou maior adsorção de proteína em todos os planejamentos realizados foi lavada cinco vezes com solução tampão tris-HCl 50 mM pH 8 (5 mL) para remover as moléculas de proteína pouco aderidas e, finalmente, foi eluída cinco vezes sucessivamente com uma solução tampão NaSCN 0,5 M (5 mL cada). O íon tiocianato ( $\text{SCN}^-$ ), por ser um íon caotrópico atua desorganizando a estrutura da água, estimulando assim a dessorção da proteína (ZENG e RUCKENSTEIN, 1996). Os eluatos foram coletados e a concentração de proteína foi determinada pelo aparelho *Qubit Fluorometer*, utilizado conforme as determinações do

fabricante.

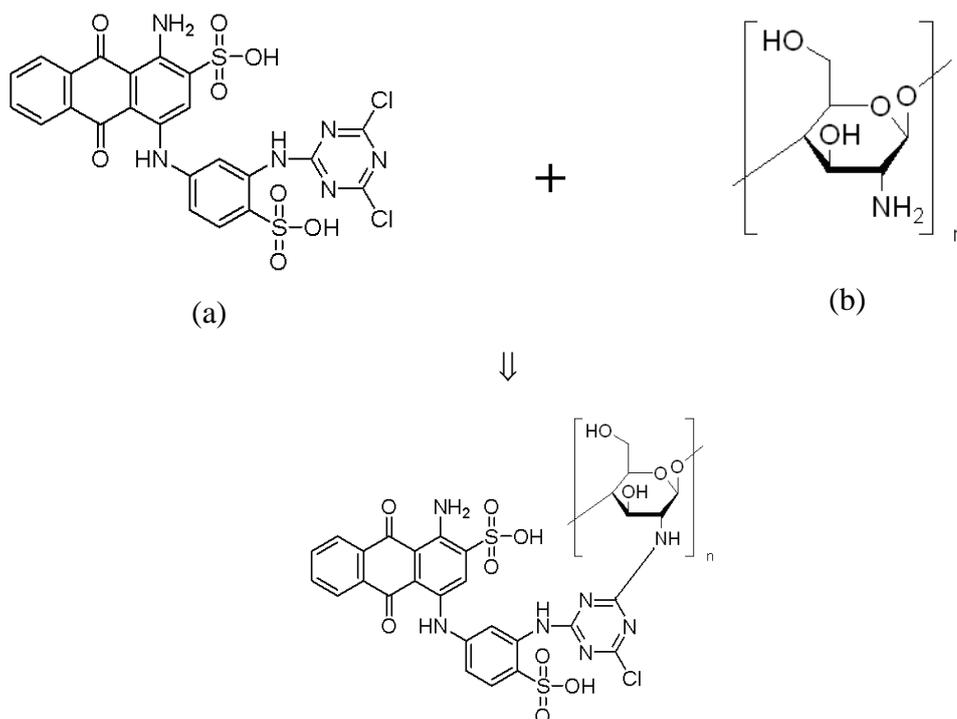
### 6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, é relatado o uso de membranas de afinidade incorporada com corantes e quitosana. Esta substância, depois da celulose, é o biopolímero natural mais abundante. Além de suas propriedades de reatividade química, a quitosana possui uma excelente habilidade formadora de película (ZENG e RUCKENSTEIN, 1996).

#### 6.3.1 Acoplamento dos corantes reativos a membrana de quitosana

As moléculas de quitosana além de hidrofílicas apresentam em sua estrutura sítios reativos (-OH e -NH<sub>2</sub>) capazes de reagir quimicamente com os grupos reativos dos corantes, possibilitando o acoplamento químico do corante reativo a membrana de quitosana. A reação que ocorre é de substituição nucleofílica (S<sub>N</sub>2) entre o grupo nucleofílico (-NH<sub>2</sub>) da quitosana com o carbono (C) eletrofílico ligado ao cloro (Cl) da estrutura do corante, conforme esquemas representados nas Figuras 10 e 11.

**Figura 10.** Reação de acoplamento do corante azul reativo 4 (a) com a membrana de quitosana (b).





membranas virgens. Das três membranas, a de poliétersulfona 0,22  $\mu\text{m}$  incorporada com quitosana e corante foi a que apresentou a maior capacidade adsortiva, com 236,5 mg/g.

**Tabela 20.** Testes preliminares de adsorção nas membranas de quitosana com corante.

Membranas	Adsorção (mg/g)	
	Membrana virgem	membrana-quitosana /corante
Acetato celulose 0,8 $\mu\text{m}$	87,7	96,9
Poliétersulfona 0,22 $\mu\text{m}$	109,4	236,5
Poliétersulfona 0,45 $\mu\text{m}$	0	90,0

Cabe salientar que das três membranas virgens testadas, somente as membranas de acetato de celulose 0,8  $\mu\text{m}$  e poliétersulfona 0,22  $\mu\text{m}$  apresentaram capacidade adsortiva em relação à proteína.

Neste contexto, optou-se por realizar um planejamento experimental com estas duas membranas, avaliando-se os efeitos das concentrações de corante e quitosana. A Tabela 21 apresenta os valores reais e codificados para as variáveis independentes estudadas (corante e quitosana) e as respectivas respostas em termos de adsorção de ASB em (mg/g).

A maior adsorção encontrada para a membrana de acetato celulose 0,8  $\mu\text{m}$  acoplada com corante azul reativo 4 (ACa) foi de 161,5 mg/g, utilizando uma concentração de 1 % de corante e 0 % de quitosana (ensaio 2). Os resultados sugerem que o uso de quitosana para esta membrana e este corante é desnecessário. Para a membrana de acetato celulose 0,8  $\mu\text{m}$  acoplada com corante vermelho reativo 120 (ACv) a maior adsorção (155,4 mg/g) também foi observada no ensaio 2. A membrana de poliétersulfona 0,22  $\mu\text{m}$  acoplada com corante azul reativo 4 (PESa) foi a que apresentou a maior adsorção, com 440,8 mg/g, entre todas as condições avaliadas. Este valor foi observado no ensaio 4, o qual foi conduzido utilizando uma concentração de 1 % de corante e 2 % de quitosana. Para a membrana de poliétersulfona 0,22  $\mu\text{m}$  acoplada com corante vermelho reativo 120 (PESv) o melhor resultado também foi observado no ensaio 4, porém a quantidade adsorvida (334,8 mg/g) foi menor se comparada a obtida com a membrana de poliétersulfona 0,22  $\mu\text{m}$  acoplada com corante azul reativo 4 (440,8

mg/g). Arica e Bayramoglu (2005) também observaram a eficácia da adsorção da lisozima utilizando os corantes azul reativo 4 e vermelho reativo 120.

**Tabela 21.** Matriz dos planejamentos experimentais 22 (valores reais e codificados) com a adsorção de ASB em mg/g para as membranas de acetato celulose 0,8 µm e poliétersulfona 0,22 µm utilizando corante azul reativo 4 e vermelho reativo 120.

Ensaio	Corante (%)	Quitosana (%)	Adsorção (mg/g)			
			ACa <sup>a</sup>	ACv <sup>b</sup>	PESa <sup>c</sup>	PESv <sup>d</sup>
1	-1 (0,1)	-1 (0)	96,9	88,5	81,2	93,4
2	+1 (1,0)	-1 (0)	161,5	155,4	102,3	112,8
3	-1 (0,1)	+1 (2)	92,3	97,6	366,0	274,7
4	+1 (1,0)	+1 (2)	60,0	57,7	440,8	334,8
5	0 (0,55)	0 (1)	106,1	113,9	254,1	198,3
6	0 (0,55)	0 (1)	124,6	110,8	240,0	177,5
7	0 (0,55)	0 (1)	110,8	118,2	211,8	185,2

<sup>a</sup>**ACa:** membrana de acetato celulose 0,8 µm acoplada com corante azul reativo 4.

<sup>b</sup>**ACv:** membrana de acetato celulose 0,8 µm acoplada com corante vermelho reativo 120.

<sup>c</sup>**PESa:** membrana de poliétersulfona 0,22 µm acoplada com corante azul reativo 4.

<sup>d</sup>**PESv:** membrana de poliétersulfona 0,22 µm acoplada com corante vermelho reativo 120.

A análise estatística dos dados experimentais permitiu a validação de um modelo empírico para a adsorção de proteína em função da concentração de quitosana e corante. A Tabela 22 apresenta os modelos codificados para a adsorção de proteína nas diferentes membranas.

**Tabela 22.** Modelos propostos para a adsorção de proteínas em diferentes concentrações de corante e quitosana.

Membrana	Modelo: $Y_{CAL} =$
<b>AC<sub>a</sub></b>	$107,45 + 8,07 * C - 26,52 * Q - 24,22 * C * Q$
<b>AC<sub>v</sub></b>	$106,01 + 6,75 * C - 22,15 * Q - 26,70 * C * Q$
<b>PES<sub>a</sub></b>	$242,31 + 23,97 * C + 155,82 * Q + 13,42 * C * Q$
<b>PES<sub>v</sub></b>	$196,67 + 19,9 * C + 100,8 * Q + 10,2 * C * Q$

Onde:

$Y_{CALC}$  = é a adsorção de proteína (mg/g),

C e Q = a concentração codificada de corante e quitosana, respectivamente.

Todos os modelos propostos foram validados por meio da análise de variância (ANOVA), em um nível de confiança de 95 % ( $F_{calculado} > F_{tabelado}$ ), com coeficientes de determinação ( $R^2$ ) de 0,93, 0,92, 0,96 e 0,98 para as membranas AC<sub>a</sub>, AC<sub>v</sub>, PES<sub>a</sub>, PSE<sub>v</sub> respectivamente.

Os parâmetros dos modelos propostos na Tabela 22 mostram que a concentração de corante apresenta um ponto ótimo para a adsorção de proteínas. Esse comportamento sugere que a adsorção de proteína pode ser aumentada pelo aumento da concentração de corante. Porém um excesso do corante leva à diminuição da adsorção.

A análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 23 foi empregada para a validação dos modelos matemáticos codificados usados para adsorção de proteína a partir da concentração de corante e quitosana utilizados.

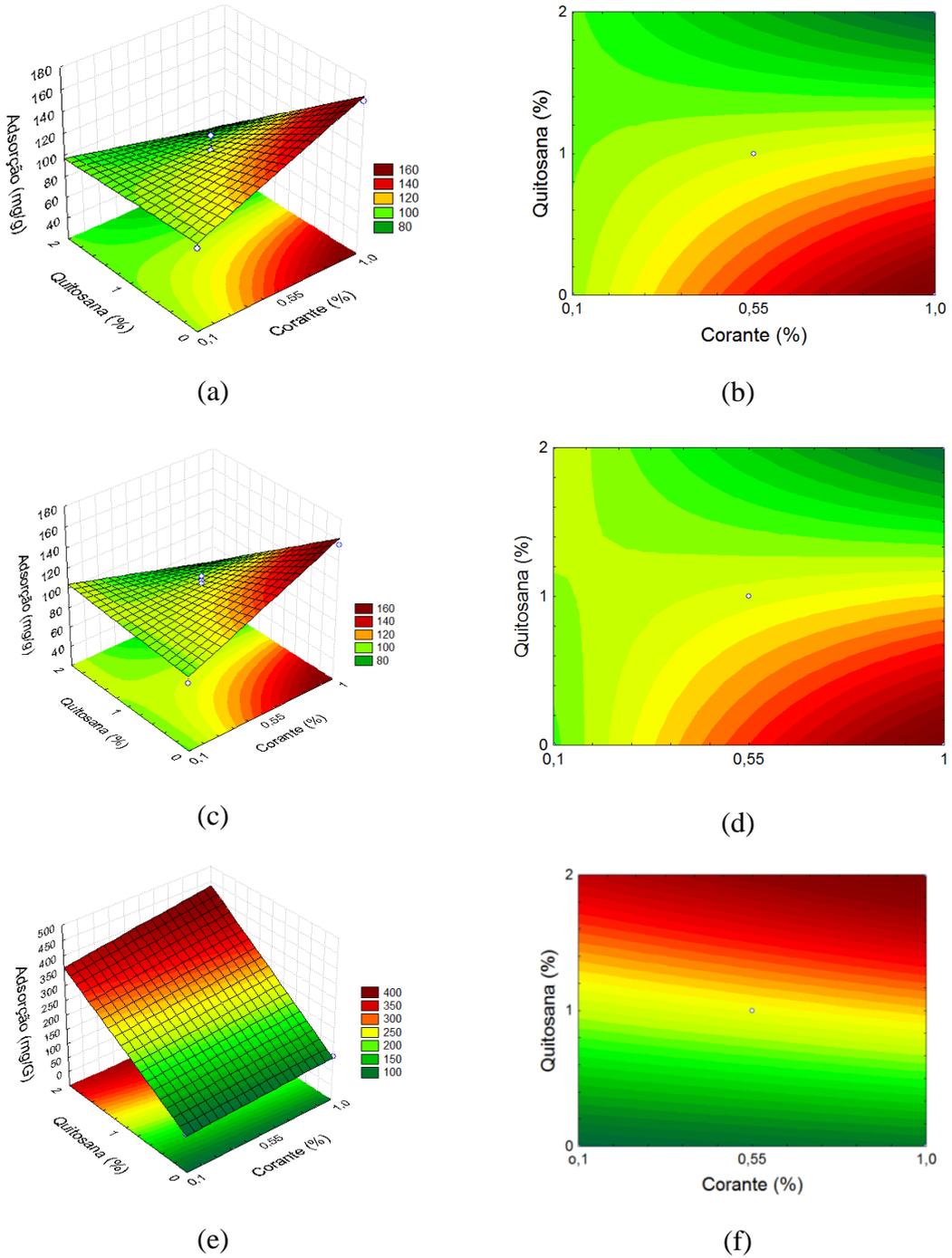
**Tabela 23.** Análise de variância para a avaliação da significância estatística dos modelos propostos para a adsorção de proteínas (mg/g) das membranas.

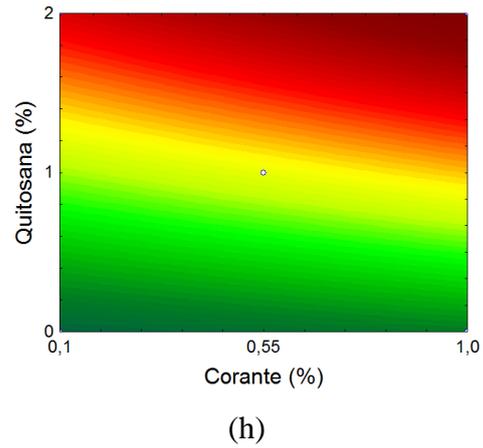
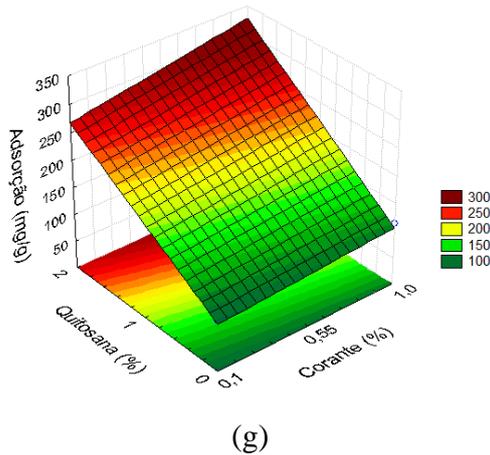
Membranas		Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calculado
Aca	<b>Regressão</b>	5422,5	3	1807,5	13,6
	<b>Resíduos</b>	398,4	3	132,8	
	<b>Total</b>	5820,9	6		
ACv	<b>Regressão</b>	4996,3	3	1665,4	12,8
	<b>Resíduos</b>	388,1	3	129,3	
	<b>Total</b>	5384,3	6		
PESa	<b>Regressão</b>	100145,8	3	33381,9	84,4
	<b>Resíduos</b>	1186,1	3	395,4	
	<b>Total</b>	101331,9	6		
PESv	<b>Regressão</b>	42656,9	3	14219,0	59,8
	<b>Resíduos</b>	712,2	3	237,4	
	<b>Total</b>	43369,2	6		

$$F_{\text{tab } 3,3, 95\%} = 9,27$$

A validação dos modelos permitiu a construção das superfícies de resposta e das curvas de contorno (Figura 12).

**Figura 12.** Superfícies de resposta e curvas de contorno para avaliação do comportamento da adsorção de proteína em diferentes membranas e concentrações de quitosana e corantes, sendo (a) e (b) ACa, (c) e (d) ACv, (e) e (f) PESa, (g) e (h) PESv.





De acordo com a Figura 12, é possível observar que a membrana que apresentou maior adsorção de proteínas foi à membrana de poliétersulfona 0,22  $\mu\text{m}$  na condição otimizada de 1 % de corante e 2 % de quitosana.

### 6.3.3 Dessorção

Os resultados de dessorção da ASB na membrana são apresentados na Tabela 24.

**Tabela 24.** Dessorção do experimento 4 do planejamento de experimentos da membrana de poliétersulfona 0,22  $\mu\text{m}$  acoplada com 2 % de quitosana e 1 % do corante azul reativo 4.

Lavagens	Dessorção (mg/g)
1	49,6
2	48,3
3	43,2
4	40,3
5	39,2

Observando as adsorções encontradas nos ensaios realizados é possível observar que a concentração obtida foi inferior à concentração esperada, calculada por balanço de massa, indicando que a proteína não foi dessorvida adequadamente das membranas. Segundo Cunha *et al.* 2006, a dessorção refer-se ao fenômeno de retirada de substâncias

adsorvidas ou absorvidas por outras, porém neste estudo não foi possível dessorver totalmente a proteína da membrana de afinidade de poliétersulfona acoplada com quitosana e corante. Isto ocorreu possivelmente devido a interação da proteína com o corante ser muito maior do que a interação da proteína com o íon tiocianato (SCN<sup>-</sup>), o qual foi empregado com a função de estimular a dessorção da proteína.

#### 6.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

O estudo das membranas de afinidade se mostrou promissor considerando os ensaios de adsorção de albumina de soro bovino. Foi obtida uma adsorção de proteína de 440,8 mg/g para a membrana de poliétersulfona modificada com quitosana, acoplada com o corante azul reativo 4, porém não foi possível se obter um solvente que favorecesse a dessorção adequada da proteína, sendo necessários mais estudos neste sentido.

6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARICA, M. Y.; BAYRAMOGLU, G., **Purification of lysozyme from egg white by Reactive Blue 4 and ReactiveRed 120 dye-ligands immobilised composite membranes.** *Process Biochemistry*, v. 40, p.1433–1442, 2005.
- CASTILHO, L. R.; ANSPACH, F. B.; DECKWER, W. **Comparison of affinity membranes for the purification of immunoglobulins.** *Journal of Membrane Science*, v. 207, p. 253–264, 2002.
- CHARCOSSET, C. **Purification of Proteins by Membrane Chromatography.** *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 71, p. 95-110, 1998.
- 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.
- CUNHA, R. B.; CASTRO, M. S.; FONTES, W. **Espectrometria de massa de proteínas.** *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, ano IX, nº 36, 2006.
- GUO, W., RUCKENSTEIN, E. **Separation and purification of horseradish peroxidase by membrane affinity chromatography,** *Journal of Membrane Science*, v. 211, p. 101-111, 2003.
- MELLADO, M. C. M., **Purificação de eritropoetina recombinante empregando membranas de afinidade.** Dissertação (Mestrado em Ciências em Engenharia Química)-Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro- RJ, 2005.
- RODEMANN, K., STAUDE, E. **Synthesis and Characterization of Affinity Membranes Made from Polysulfone.** *Journal of Membrane Science*, v. 88, p. 271-278, 1994.
- ZENG, X.; RUCKENSTEIN, E., **Supported chitosan-dye affinity membranes and their protein adsorption.** *Journal of Membrane Science*, v. 117, p. 271-278, 1996.
- ZOU, H., LUO, Q., ZHOU, D. **Affinity Membrane Chromatography for the Analysis and Purification of Proteins.** *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 49, p. 199-240, 2001.

## **CAPÍTULO VII**

---

### **NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS FUNCIONALIZADAS NA PURIFICAÇÃO DE INULINASE**

## 7.1 REFERENCIAL TEÓRICO

### 7.1.1 Partículas Magnéticas

O primeiro relato do emprego da separação magnética foi de William Fullarton, em 1792, para a separação de minerais de ferro mediante o emprego de um ímã. Desde então, várias aplicações para o uso de campos magnéticos têm sido descritas na literatura. Na separação magnética, um campo magnético é utilizado como força principal para o isolamento, a separação e análise de diferentes tipos de moléculas (AGUILAR-ARTEAGA *et al.*, 2010).

Nos últimos anos o emprego de sólidos magnéticos modificados com diferentes grupos funcionais em sua superfície tem sido aplicado para a retenção e isolamento de compostos orgânicos e inorgânicos, como por exemplo: íons metálicos, metais pesados, proteínas, anti-inflamatórios, antibióticos, analgésicos, pesticidas, inseticidas, corantes, surfactantes, substâncias cancerígenas e compostos fenólicos (AGUILAR-ARTEAGA *et al.*, 2010).

Os adsorventes magnéticos apresentam uma fase sólida magnética, geralmente consistindo de minerais de ferro e óxidos de ferro magnéticos, como a magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). Esta característica magnética facilita sua remoção do meio reacional após decorrida a etapa de adsorção do analito desejado, mediante o emprego de um campo magnético externo (MIOTO, 2013).

### 7.1.2 Nanopartículas Magnéticas

São consideradas em escala nano as partículas com diâmetros menores do que 100 nanômetros (nm), podendo conter entre 20 e 15.000 átomos. Estas podem ser produzidas a partir de diferentes materiais em diferentes formas tais como esferas, barras, fios e tubos (LIU, 2006). As nanopartículas exibem propriedades físicas destacadas (tais como a agregação de partículas e de fotoemissão, propriedades elétricas e condutividade de calor) e químicas (tais como a atividade catalítica), e portanto, têm recebido muita atenção de cientistas e pesquisadores em diferentes áreas (LIU, 2006; CAO *et al.*, 2012).

Nanopartículas magnéticas, por exemplo, estão despertando cada vez mais atenção não só por sua fácil separação por um campo magnético externo, mas também pela sua potencial aplicação em várias áreas, tais como biomedicina, diagnósticos, energia e setor de alimentos (FRANZREB *et al.*, 2006; SAFARIK e SAFARIKOVA, 2004; VANAMERONGEN *et al.*, 2005).

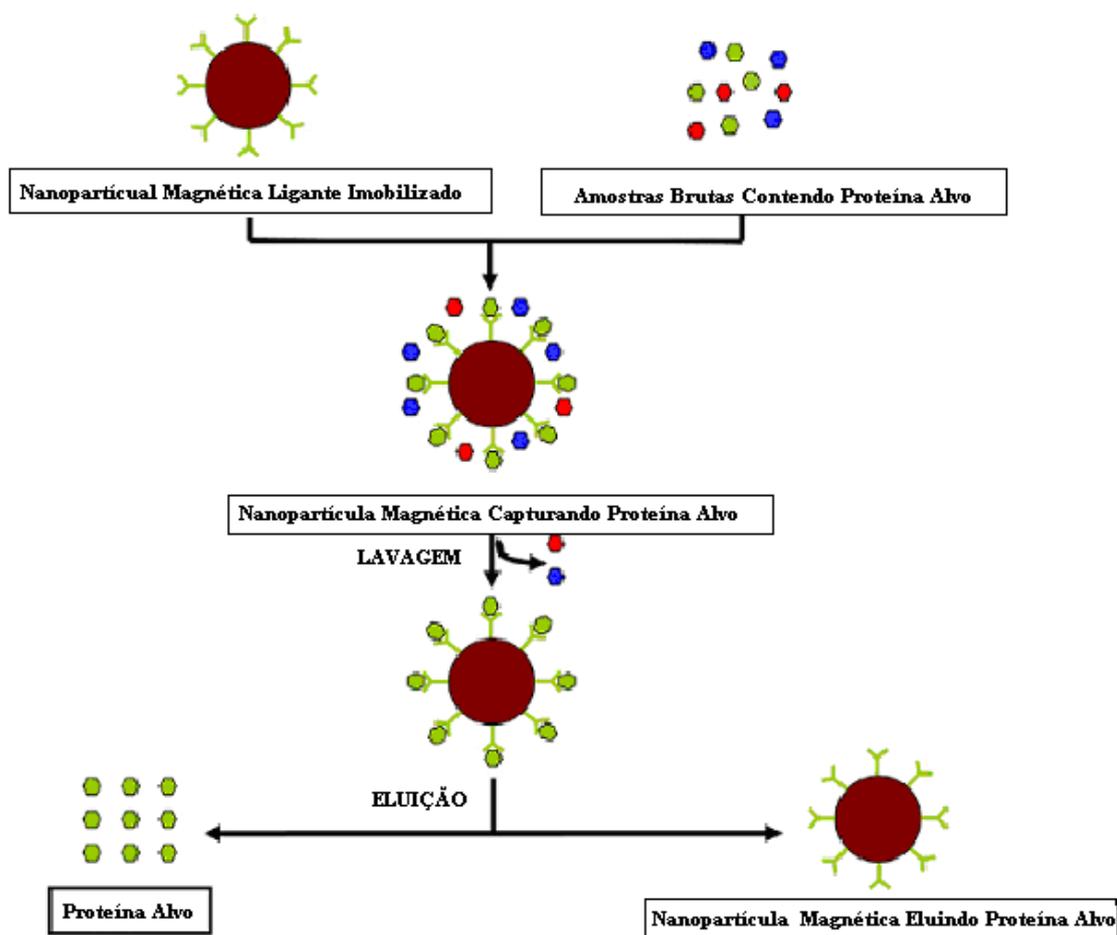
Estas geralmente são constituídas de elementos magnéticos, tais como ferro, cobalto e níquel. Para aplicações relacionadas com a área de alimentos, a preocupação mais importante das nanopartículas magnéticas é a sua segurança. Assim, a utilização de nanopartículas magnéticas em aplicações na indústria de alimentos está vinculada principalmente a óxidos de ferro, entre os quais predominam as nanopartículas superparamagnéticas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , as quais não apresentam nenhuma atoxicidade, boa biocompatibilidade e não retêm magnetismo residual após a remoção do campo magnético externo (CAO *et al.*, 2012).

Com uma modificação adequada da superfície, nanopartículas de óxido de ferro magnético podem ser funcionalizadas com diferentes grupos, como por exemplo, -OH, -COOH, - $\text{NH}_2$ , os quais podem ser posteriormente modificados pela ligação de várias moléculas bioativas para diferentes aplicações (BERRY e CURTIS, 2003).

Quando utilizadas na purificação de proteínas são muitas vezes imobilizadas com diferentes ligantes (por exemplo, afinidade ou de pseudo-afinidade e grupos de troca iônica), de comprovada afinidade pela proteína alvo (FRANZREB *et al.*, 2006; CAO *et al.*, 2012). Em geral, a separação magnética de proteínas fundamenta-se no princípio da separação magnética de afinidade, incluindo métodos diretos e indiretos (SAFARIK e SAFARIKOVA, 2004). No método direto, os ligantes estão quimicamente ligados na superfície das nanopartículas magnéticas, as quais são adicionadas em amostras brutas. Estas nanopartículas magnéticas contendo o ligante reconhecem e capturaram as proteínas-alvo. No método indireto os ligantes de afinidade livres são adicionados à amostra bruta, onde interagem com a proteína alvo para formar um complexo. O complexo é então reconhecido e capturado por partículas magnéticas. Assim, o método indireto pode ser considerado como um método direto inverso. Por ser mais fácil de controlar, o método direto é mais utilizado em purificação de proteínas (CAO *et al.*, 2012).

A Figura 13 apresenta o processo de separação magnética por afinidade direta.

**Figura 13.** Esquema de separação magnética de afinidade da proteína. Fonte: CAO *et al.*, 2012.



As nanopartículas magnéticas modificadas com ligantes capturam a proteína alvo a partir de amostras brutas, formando um complexo ligantes-proteína, os quais são subsequentemente separados usando um campo magnético externo. As proteínas não específicas são removidas e a proteína específica é purificada após várias rodadas de separação magnética e processos de lavagem. A proteína capturada sobre as partículas é posteriormente eluída da nanopartícula magnética.

Deepak *et al.* 2009 estudaram a purificação de natokinase pela imobilização de nanopartículas com polihidroxibutirato. Estas foram submetidas a precipitação com acetona e posteriormente purificadas com a cromatografia de afinidade, obtendo um fator de purificação de 74 vezes e um rendimento de 7 %.

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a adsorção da enzima inulinase utilizando nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, para avaliação do potencial de uso destas na purificação da enzima.

## 7.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 7.2.1 Síntese das partículas magnéticas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

As partículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> foram preparadas pelo método solvotermal (CHEN *et al.*, 2012). Uma massa de 2,7 g de FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O foi dissolvida em 50 mL de etilenoglicol, em banho-maria, com temperatura de 40 °C, durante 10 minutos. Posteriormente, foi adicionado 6,12 g de H<sub>3</sub>CCOONa·3H<sub>2</sub>O juntamente com 50 mL de etilenoglicol. A solução resultante foi transferida para autoclaves de aço inoxidáveis revestidas internamente com teflon, as quais foram submetidas a condição térmica de aquecimento à 250 °C por 6 horas (condição otimizada por MIOTO, 2013). O produto formado foi separado por centrifugação, lavado com água deionizada e seco a 80 °C.

### 7.2.2 Funcionalização das nanopartículas magnéticas

As nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (50 mg) foram dissolvidas em 50 mL de etanol e misturadas com 1 mL de ácido mercaptopropiônico, a mistura foi sonicada em banho ultrassônico por 5 minutos e em seguida foi agitada por 6 horas em temperatura ambiente.

As nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> foram recolhidas magneticamente e lavadas três vezes com água destilada para remover o excesso de ácido mercaptopropiônico, e, finalmente, as nanopartículas foram redispersas em solução tampão fosfato (0,05 M, pH 7,4) (ZHANG *et al.*, 2013).

### 7.2.3 Capacidade de ligação das nanopartículas magnéticas

Oito amostras contendo 100 mg de nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> foram adicionadas em 50 mL da enzima inulinase e incubadas durante 1440 minutos a temperatura ambiente. Estas nanopartículas foram recolhidas magneticamente (nos tempos 0; 15; 30; 60; 180; 360; 720 e 1440 min) e lavadas 3 vezes com tampão fosfato. Posteriormente foi determinado a atividade enzimática e proteína total.

#### 7.2.4 Atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada empregando uma diluição na proporção de 1 mL de extrato enzimático para 9 mL de água de água destilada. Foi adicionado 0,5 mL desta solução diluída em 4,5 mL de uma solução 2 % (m/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  $\mu\text{mol}$  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).

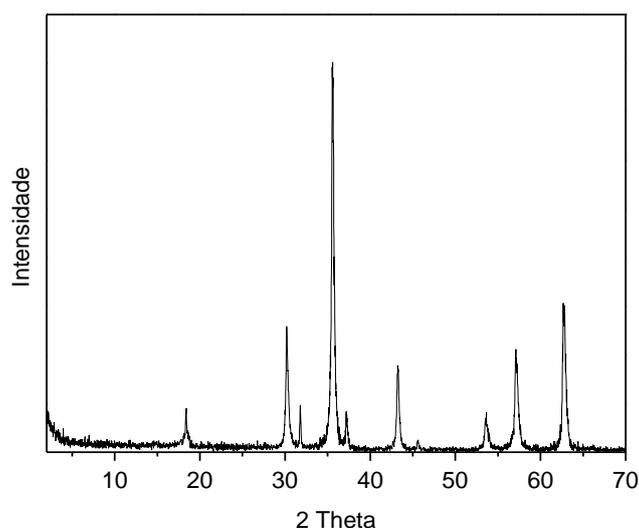
#### 7.2.5 Determinação de proteína total

A concentração de proteína total foi determinada pelo método de Bradford *et al.* (1976), usando albumina de soro bovino (ASB) como padrão (Sigma A3294).

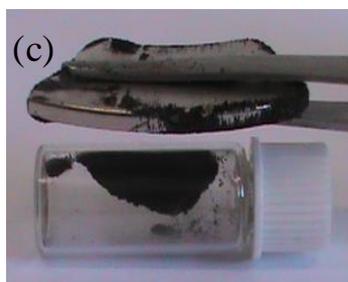
### 7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 7.3.1 Partículas magnéticas

A Figura 14 apresenta o difratograma de raios X da condição experimental empregada na síntese da partícula magnética. Observa-se que a amostra sintetizada apresentou cristalinidade e a formação da estrutura magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), identificada pelos picos de difração 18,5 ( $d_{111}$ ), 30,1° ( $d_{220}$ ), 35,6° ( $d_{311}$ ), 37,2 ( $d_{222}$ ), 43,4° ( $d_{400}$ ), 52,5° ( $d_{422}$ ), 57,2° ( $d_{511}$ ) e 62,8° ( $d_{440}$ ).

**Figura 14.** Difratoograma de raios X das partículas das magnéticas sintetizadas.

Para avaliar o magnetismo as amostras foram submetidas a um campo magnético (Figura 15).

**Figura 15.** Teste de magnetização da partícula de ferro sintetizada.

A amostra, de coloração preta (característica de magnetitas), sintetizada empregando uma temperatura de 250 °C, teve todas suas partículas atraídas pelo imã, indicando um elevado índice de magnetização. Corrobora com estes resultados, o difratograma de raio X da amostra, o qual evidencia a formação da fase magnetita que apresenta propriedades magnéticas (AY *et al.*, 2011).

O tamanho médio dos cristais calculado mediante a Equação de Scherrer (YAN *et al.*, 2008) foi de 40,5 nm, indicando que as mesmas podem ser consideradas nanopartículas, uma vez que apresentam dimensões menores que 100 nm (BUZEA *et al.*, 2007).

### 7.3.2 Testes de adsorção da enzima inulinase utilizando nanopartículas magnéticas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

Na tabela 25 estão apresentadas as adsorções encontradas para a enzima inulinase utilizando nanopartícula magnética.

Os teores de proteína no extrato, após o processo de extração com as partículas magnéticas, apresentaram oscilações distintas, com um aumento de seus valores. Para os tempos de contato iniciais (15 e 30 minutos) e uma diminuição nos valores de proteína após 60 minutos, sugerindo que após este período a proteína esta se adsorvendo as partículas magnéticas, apresentando ao final da etapa adsortiva (1440 minutos) uma adsorção de 2,8 mg/g de partículas magnéticas. As oscilações do teor de proteína observado entre o início do processo (com adsorções negativas) e após 60 minutos de contato (com adsorções positivas), ambas de igual magnitude, sugerem que os resultados obtidos podem estar vinculados a erros experimentais de análise.

**Tabela 25.** Testes de adsorção da enzima inulinase utilizando nanopartícula magnética Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> por 24 horas.

Ensaio	Tempo (min)	Proteína Total (mg/mL)	Atividade Total (U/mL)	Atividade Específica (U/mg)	Adsorção (mg/g)
Extrato bruto	-	0,131	12,33	94,06	-
1	0	0,138	12,40	90,13	- 3,24
2	15	0,137	12,09	88,16	- 3,07
3	30	0,139	11,78	84,48	- 4,19
4	60	0,126	11,15	88,75	2,68
5	180	0,121	11,50	94,67	4,80
6	360	0,126	11,88	94,58	2,73
7	720	0,122	11,58	95,20	4,69
8	1440	0,125	11,22	89,40	2,79

Considerando que as leituras de proteína e de atividade do extrato obtido na etapa de lixiviação não apresentaram resultados positivos foi conduzido um ensaio de atividade enzimática com a partícula magnética, visando comprovar a existência ou não

de material enzimático adsorvido ao suporte (partículas magnéticas). No entanto, os resultados de atividade para o material suportado também foram nulos, sugerindo a inexistência de enzima adsorvida, ou seja, que os resultados obtidos anteriormente estão realmente vinculados ao erro experimental de análise de proteína.

#### 7.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

O processo de síntese das partículas férricas foi eficiente, conduzindo a um material magnético, característico da fase de magnetita que apresenta propriedades magnéticas. No entanto, não foi possível se obter uma boa adsorção da enzima nas nanopartículas produzidas, mostrando que é necessária a funcionalização destas para aumento da capacidade adsortiva.

## 7.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR-ARTEAGA K.; RODRIGUEZ, J.A; BARRADO, E. **Magnetic solids in analytical chemistry: A review**. *Analytica Chimica Acta*, v. 674, p. 157–165, 2010.
- BERRY, C. C., & CURTIS, A. S. G. **Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine**. *Journal of Physics D: Applied Physics*, v. 36, p. 198-206, 2003.
- 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.
- CAO, M.; LI, Z.; WANG, J.; GE, W.; YUE, T.; LI, R.; COLVIN, V. L.; YU, W. W. **Food related applications of magnetic iron oxide nanoparticles: Enzyme immobilization, protein purification, and food analysis**. *Trends in Food Science & Technology*, p. 1-10, 2012.
- CHEN, D.; LI, Y.; ZHANG, J.; ZHOU, J.; GUO, Y.; LIU, H. **Magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/ZnCr-layered double hydroxide composite with enhanced adsorption and photocatalytic activity**. *Chemical Engineering Journal*, v. 185, p. 120 – 126, 2012.
- DEEPAK, V.; PANDIAN, S.R. K.; KALISHWARALAL, K.; GURUNATHAN, S. **Purification, immobilization, and characterization of nattokinase on PHB nanoparticles**. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 6644–6646, 2009.
- FRANZREB, M., SIEMANN-HERZBERG, M., HOBLEY, T. J., & THOMAS, O. R. T. **Protein purification using magnetic adsorbent particles**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 70, p. 505-516, 2006.
- LIU, WEN-T. **Nanoparticles and Their Biological and Environmental Applications**. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 102, DOI: 10.1263/jbb.102.1 . 2006.
- 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.
- MILLER, G. L., **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar**. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MIOTO, N. **Hidrocalcita e magnética aplicada no tratamento de efluentes oleosos**. Dissertação de mestrado em Engenharia Química – UFSC. Florianópolis - SC, 2013.
- SAFARIK, I., SAFARIKOVA, M. **Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides**. *BioMagnetic Research and Technology*, v. 2, p. 1-17, 2004.
- VAN AMERONGEN, A., BARUG, D., & LAUWAARS, M. **Rapid methods for biological and chemical contaminants in food and feed**. Wageningen: Wageningen Academic, p. 19-29, 2005.
- YAN MINGSHUN, Y.; QIANG, X.; JUN Z.; JUAN L., YAN, W.; XIANGLAN, Z.; QINGWU, Z. **Effects of coal rank, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> amounts and activation temperature on the preparation and characteristics of magnetic activated carbon**. *Mining Science and Technology*, v. 20, p. 0872–087, 2008.

ZHANG, G.; WU, T.; LI, Y., HUANG, X.; WANG, Y.; WANG, G. **Sorption of humic acid to organo layered double hydroxides in aqueous solution.** *Chemical Engineering Journal* , v. 191, p. 306– 313, 2013.

## **CAPÍTULO VIII**

---

### **CONCLUSÕES**

## 8. CONCLUSÕES

A busca por estratégias de biosseparação mais eficientes, que utilizem um número reduzido de etapas, utilizando processos de baixo custo, foi desenvolvido neste trabalho que visa contribuir para o campo de conhecimento de purificação da enzima inulinase, propondo-se mediante a utilização de diferentes técnicas de baixo custo que as convencionalmente utilizadas técnicas cromatográficas, como precipitação com sais e solventes, diferentes sistemas aquosos bifásicos e o uso de nanopartículas na purificação.

No decorrer deste estudo observou-se que a precipitação com sais e solventes apresentou resultados satisfatórios. A precipitação utilizando sais e solventes resultou em bons rendimentos e fatores de purificação, provavelmente devido à eliminação de inibidores.

A técnica de purificação por sistemas aquosos bifásicos se mostrou promissora para aplicação na purificação de inulinas produzidas por FES. Foi possível otimizar o fator de purificação por meio de um planejamento de experimentos, variando a concentração do PEG 4000 e do tampão fosfato de potássio pH 7,0. Com uma estratégia de combinação de processos, a qual consistiu de mudança de força iônica do extrato bruto, seguida de precipitação com álcool n-propílico, foi possível obter um fator de purificação expressivo (5,45 vezes). Os ensaios com SABs formados por tampão citrato e PEG e tampão citrato e álcool apresentaram baixos fatores de purificação e rendimentos.

O estudo das membranas de afinidade se mostrou promissor considerando os ensaios de adsorção de albumina de soro bovino. Observa-se uma adsorção de proteína de 440,8 mg/g para a membrana de poliétersulfona modificada com quitosana, acoplada com o corante azul reativo 4. Porém, o estudo da dessorção da proteína se mostrou pouco promissor, pois após diversas tentativas, foi obtida uma dessorção de apenas 49,6 mg/g.

Em outra etapa, foi avaliado o uso de nanopartículas na concentração e purificação da enzima inulinase, porém não foi possível se obter uma boa adsorção da enzima nas nanopartículas produzidas, mostrando que é necessária a funcionalização destas para aumento da capacidade adsortiva.

## **CAPÍTULO IX**

---

### **SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

## 9. 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:

- Estudo da concentração e fracionamento da enzima inulinase utilizando ultrafiltração combinada aos processos de precipitação e SAB;
- Avaliação da membrana de afinidade utilizando o extrato enzimático com posterior avaliação da adsorção e uma possível imobilização da enzima.
- Adsorção por afinidade utilizando corante e microesferas magnéticas de quitosana;

## **CAPÍTULO X**

---

### **ANEXOS**

## ANEXO I – Interferência de sais utilizados em sistema aquoso bifásico sobre a quantificação das proteínas totais pelo método de Bradford

Para avaliar os métodos de purificação de proteínas é necessário quantificar a proteína total nas amostras, as quais serão utilizadas para calcular a atividade enzimática específica e também o fator de purificação. Métodos rápidos e sensíveis de quantificação são os mais requisitados, como ensaios de espectroscopia química e colorimetria. O método colorimétrico proposto por Bradford em 1976 é o mais aceito para a quantificação da proteína na purificação de enzimas por sistema aquoso bifásico (KAVAKÇIOGLU & TARHAN, 2013; LAN *et al.*, 2013; NEVES *et al.*, 2012), devido à sua simplicidade e sensibilidade.

Estudos recentes mostraram que o método de Bradford pode sofrer interferência da intensidade de cor por alguns compostos iônicos utilizados em sistema aquoso bifásico, a fim de aumentar a força iônica da fase aquosa bifásica (SILVÉRIO *et al.*, 2012). Estes sistemas são geralmente aplicados para a purificação de enzimas, e a interferência de sal na quantificação da proteína produzirá resultados errôneos em termos de atividade específica e posteriormente de fatores purificação (LAN *et al.*, 2013).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência de diferentes sais, comumente utilizados em sistema aquoso bifásico, na quantificação de proteínas pelo método de Bradford. O extrato enzimático bruto da enzima inulinase foi utilizado como fonte de proteína simulando a purificação de sistemas reais.

### **Materiais e Métodos**

#### *Quantificação de proteínas*

As determinações de proteína foram realizadas pela adição de 0,1 mL de amostra em 5 mL de reagente de Bradford. Após mistura, as amostras reagiram por 2 min à temperatura ambiente (25 °C) e a absorbância da amostra foi medida a 595 nm.

#### *Preparo da amostra*

As amostras foram preparadas diluindo-se o extrato enzimático com tampão apropriado para chegar a diferentes concentrações de proteína. Fosfato de potássio, citrato de sódio, cloreto de sódio e nitrato de sódio foram adicionados às soluções de extratos a fim de atingir diferentes concentrações de sais. Cada teste foi executado em triplicata.

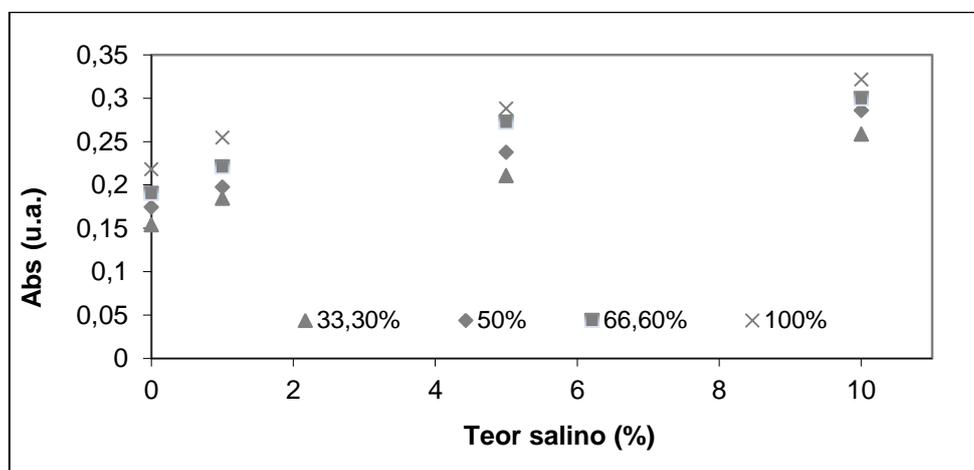
*Determinação do cálcio (Ca), magnésio (Mg), ferro (Fe) e alumínio (Al) no extrato enzimático bruto da inulinase*

As concentrações de Ca, Mg, Fe e Al foram determinados por espectroscopia de absorção atômica. Para isto, 2 mL de extrato bruto foram submetidos à etapa de digestão ácida empregando 1 mL de ácido nítrico concentrado, a 120 °C por 1 hora. Posteriormente, o extrato foi diluído à 50 mL com água deionizada.

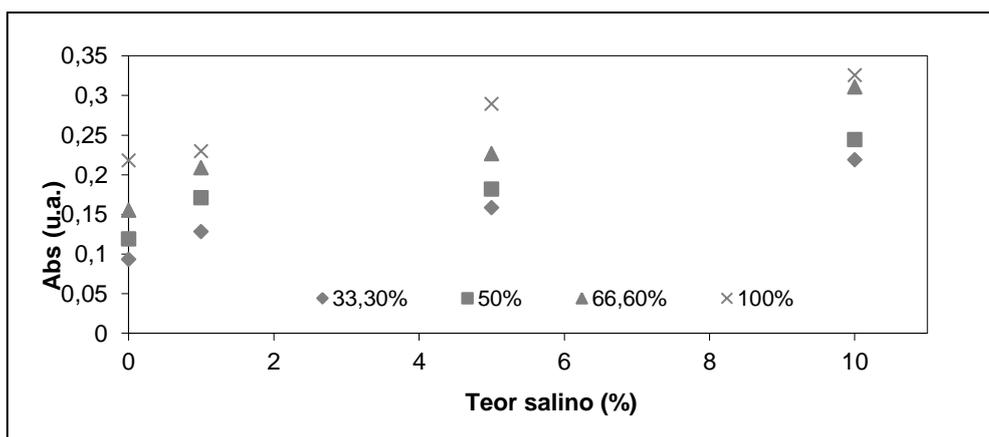
### Resultados e discussão

As absorvâncias em função da concentração de sal para o extrato enzimático estão apresentadas nas Figuras 16 a e b.

**Figura 16.** Interferência do fosfato de potássio (a) e citrato de sódio (b) na quantificação de proteína da enzima inulinase pelo método de Bradford.



(a)



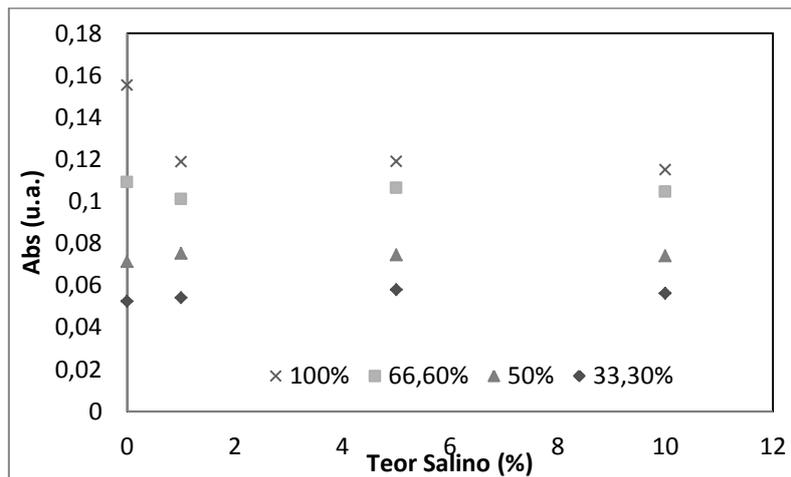
(b)

Para todas as concentrações da enzima estudada, a absorvância aumentou com a adição de sais quando comparado com as amostras sem sais. O aumento da absorvância, obtida pelo método de Bradford, varia linearmente com a concentração de sal nas amostras, permitindo ajustar um modelo para prever o incremento que o sal presente na solução irá proporcionar na absorvância obtida pelo teste de Bradford. A interferência negativa, indicada pela diminuição da intensidade de cor (absorvância) gerada pela adição de sais foi observada por outros autores (SILVÉRIO *et al.*, 2012).

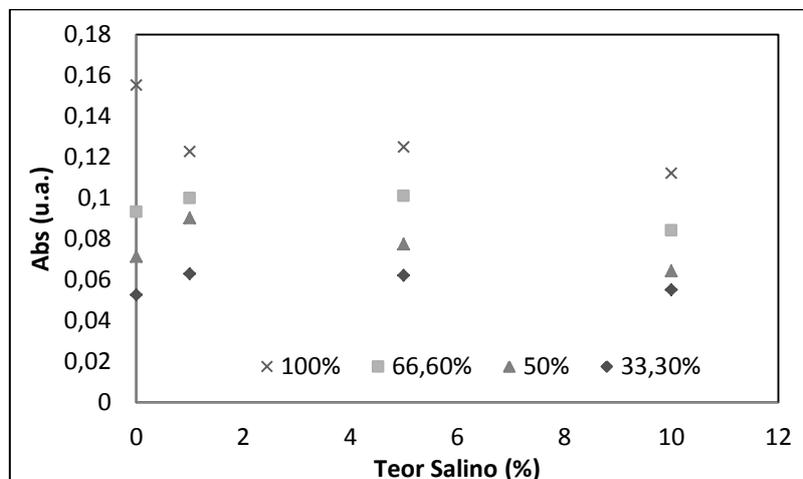
Estas interferências podem estar associadas com o processo de coloração da ligação do reagente de Bradford (Coomassie Brilliant Blue G-250) com a proteína, que é regulada pela interação eletrostática entre os corantes ionizados e os grupos sulfônicos ( $-\text{SO}_3$ ) e os grupos funcionais de carga positiva da enzima. A presença de íons, especialmente íons positivos (cátions), que tendem a ter uma forte interação eletrostática com os grupos do ácido sulfônico do corante, atuam de forma competitiva com os grupos amino ( $-\text{NH}_2$ ) da enzima, para formar o processo de geração de cor. Essa interferência é acentuada pela carga catiônica. Silvério *et al.* (2012) realizaram ensaios utilizando albumina de soro bovino pura como substrato, o qual é livre de íons, e a adição de sais, independentemente da sua composição, interfere negativamente no processo de geração de cor por um desfavorecimento de ligação do corante à proteína. O efeito positivo da adição de sal, isto é, o aumento da intensidade de cor observada no presente estudo, que foi conduzido com o extrato enzimático bruto, foi atribuído a composição do extrato enzimático, mais especificamente às elevadas concentrações de cátions de elevada carga de superfície, tais como o cálcio ( $767,6 \pm 10,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ), o

magnésio ( $464,2 \pm 13,2 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e o ferro ( $173,6 \pm 21,3 \text{ mg.L}^{-1}$ ), os quais apresentam fortes interações com os grupos de ácido sulfônico do corante. Os efeitos positivos observados na adição de fosfato de potássio e sais de citrato de sódio, devido à sua composição, mais especificamente os ânions fosfato e citrato, que têm fortes interações eletrostáticas com os cátions presentes no extrato enzimático, provavelmente, mais intensa do que a observada com os grupos sulfônicos, e eliminado por mascaramento suas interferências no processo de produção de cor, uma vez que não compete com a proteína para os grupos de ácido sulfônico do corante. Esta hipótese concorda com os resultados de alteração da absorvância obtidos pelo método de Bradford observado para o extrato bruto de inulinase contaminado com cloreto de sódio e nitrato de sódio (Figuras 17 a e b).

**Figura 17.** Interferência do (a) cloreto de sódio e (b) nitrato de sódio na quantificação de proteína pelo método de Bradford.



(a)



(b)

A tendência de absorção para estes sais difere daquela observada quando se utilizou o sal fosfato e citrato. Para os sais de cloreto e nitrato, observa-se uma diminuição da absorvância para o extrato bruto de inulinase, semelhante à observada para Silvério et al. (2012). Para estas condições, a presença desses sais não afetam a absorvância.

Esta tendência observada para os sais cloreto e nitrato confirma a nossa suposição, uma vez que os ânions (-Cl e -NO<sub>3</sub>), diferentemente do fosfato e do citrato, tendem a formar interações eletrostáticas mais fracas com metais (Ca, Mg, Fe e Al) presentes no extrato enzimático bruto que as observadas para estes metais com grupos de ácido sulfônico do corante. Portanto, a presença de sais de cloreto e nitrato no extrato não promovem a interação eficaz com os metais, só agem através do aumento na força iônica e, conseqüentemente, contribuindo negativamente para o processo de geração de cores, como observado para o extrato enzimático bruto (100%) nas Figuras 17 a e b.

Se não for levado em conta o aumento da absorção causada pela concentração de sal levaremos a uma superestimação do teor de proteína da amostra. Desta forma, a atividade específica será subestimada. Uma vez que este parâmetro é a base para o cálculo dos fatores de purificação (FP) em estratégias de purificação de sistema aquoso bifásico, o FP, então, também será subestimado. Outros autores relataram um efeito inverso da adição de sal na determinação de proteínas pelo método de Bradford, utilizando albumina de soro de bovino (ASB) (SILVÉRIO *et al.*, 2012). Estes autores referem que a presença de sais nas amostras produziram absorvâncias mais baixas do que as mesmas amostras sem sais. Este efeito oposto pode ser devido à diferenças nas amostras de proteína. Enquanto no estudo de Silvério et al. (2012) ASB pura foi utilizada como uma proteína modelo, em nosso estudo nós testamos amostras reais, composta de extrato enzimático bruto, que são muito mais complexas do que as soluções de ASB. Os testes com amostras reais são mais alinhados com os estudos que estão focados em purificação de enzimas.

### **Considerações finais**

A avaliação do efeito de sal na quantificação de proteínas pelo método de Bradford é importante, pois a sua presença interfere com os resultados do ensaio, e, conseqüentemente, com os resultados da atividade específica e dos fatores de purificação. A interferência positiva induz a resultados mais baixos de atividade

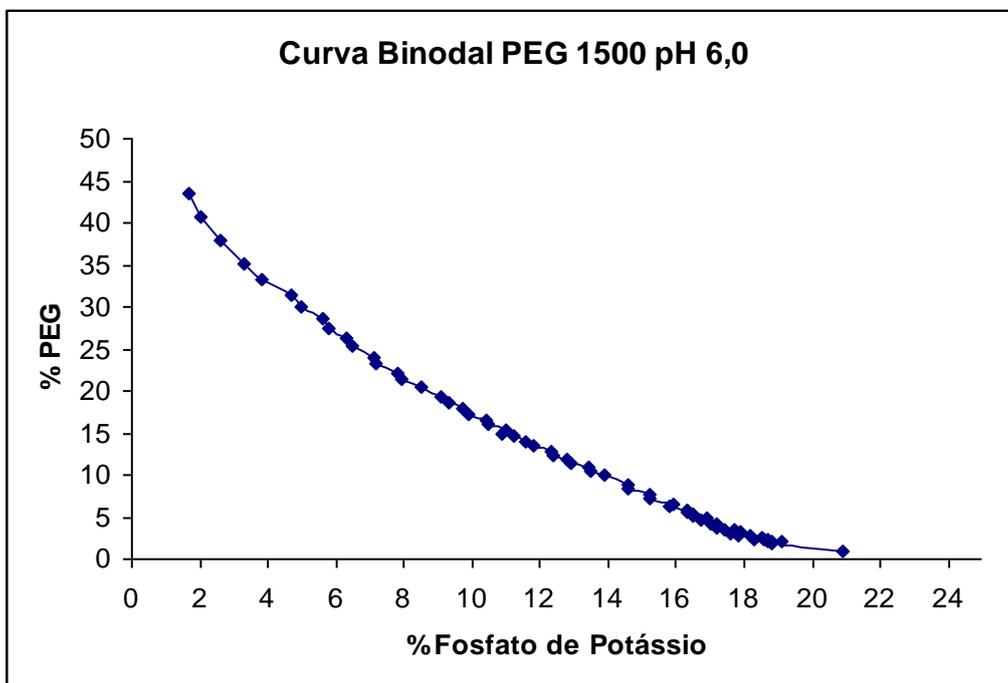
específica e FP. Os resultados obtidos em nosso estudo podem ser úteis para estudos posteriores sobre purificação de enzimas em sistemas aquoso bifásico à base de sal, uma vez que a interferência de sal vai levar a erro nos resultados.

**Referências Bibliográficas**

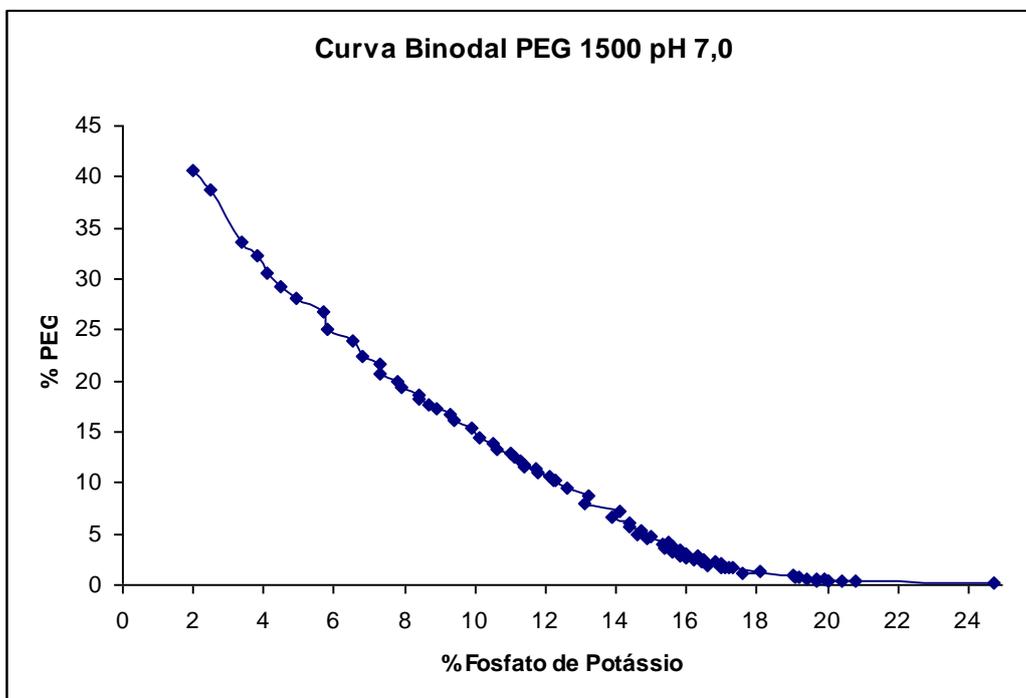
- BRADFORD, M.M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**, Anal. Biochem. 72, 248-254, 1976.
- KAVAKÇIOĞLU, B.; TARHAN, L. **Initial purification of catalase from *Phanerochaete chrysosporium* by partitioning in poly(ethylene glycol)/salt aqueous two phase systems**, Sep. Purif. Technol. 105, 8-14, 2013.
- LAN, J.C.; YEH, C.; WANG, C.; YANG, Y.; WU, H. **Partition separation and characterization of the polyhydroxyalkanoates synthase produced from recombinant *Escherichia coli* using an aqueous two-phase system**, J. Biosci. Bioeng. 116, 499-505, 2013.
- NEVES, M. L. C.; PORTO, T. S.; SOUZA-MOTTA, C. M.; SPIER, M. R.; SOCCOL, C. R.; MOREIRA, K. A.; PORTO, A. L. F. **Partition and recovery of phytase from *Absidia blakesleeana* URM5604 using PEG–citrate aqueous two-phase systems**. Fluid Phase Equilibria. 318, 34-39, 2012.
- SILVÉRIO, S. C.; MOREIRA, S.; MILAGRES, A. M. F.; MACEDO, E. A.; TEIXEIRA, J. A.; MUSSATTO, S. I. **Interference of some aqueous two-phase system phase-forming components in protein determination by the Bradford method**, Anal. Biochem. 421, 719-724, 2012.

ANEXO II – Curvas Binodais para PEG 1500, 4000, 6000, 8000 e 10000 Da e fosfato de potássio pH 6 e 7.

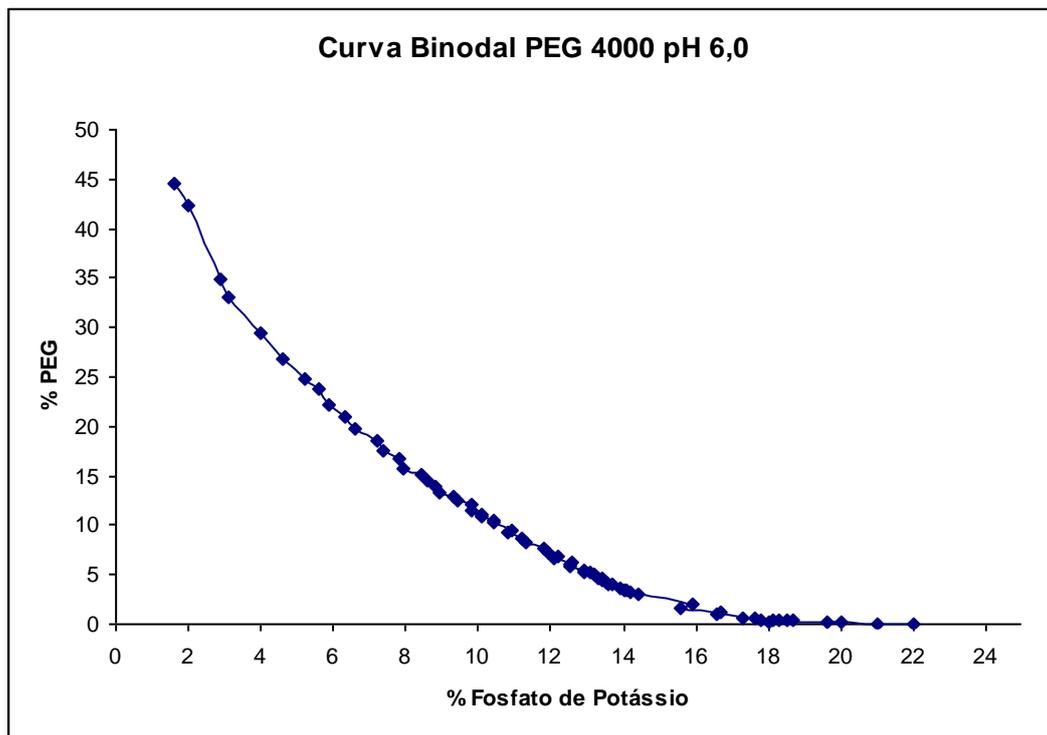
**Figura 18.** Curva Binodal para o PEG 1500 e fosfato de potássio 30% (p/p), pH 6,0.



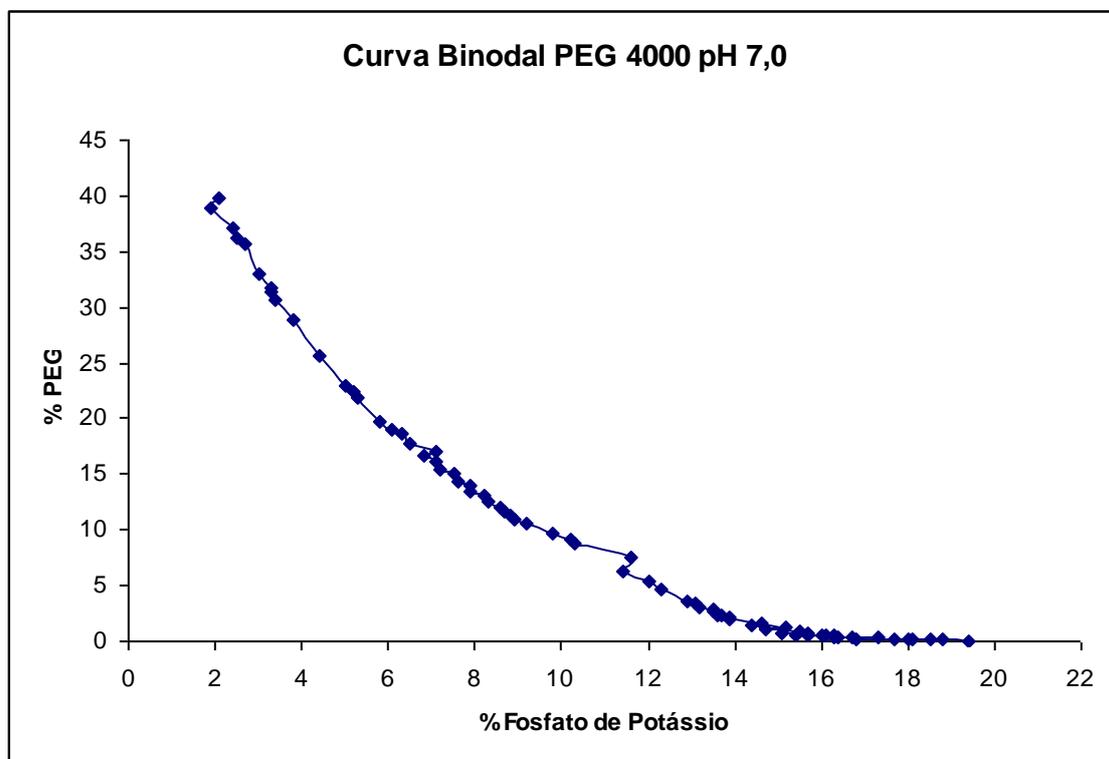
**Figura 19.** Curva Binodal para o PEG 1500 e fosfato de potássio 40% (p/p), pH 7,0.



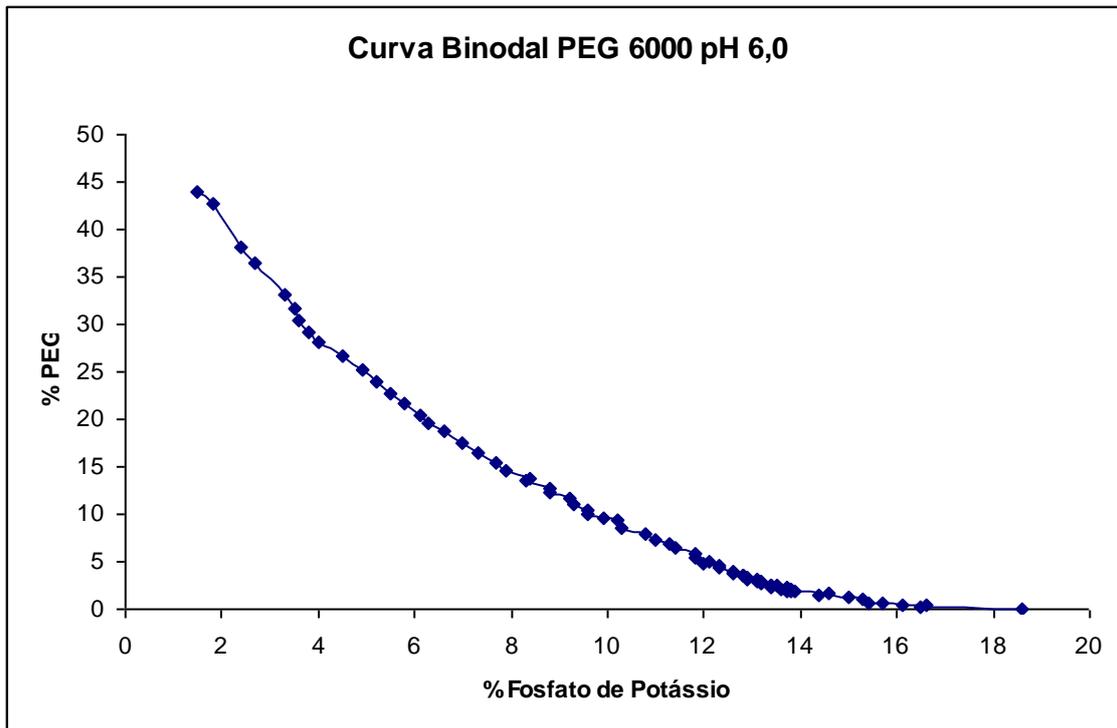
**Figura 20.** Curva Binodal para o PEG 4000 e fosfato de potássio 30% (p/p), pH 6,0.



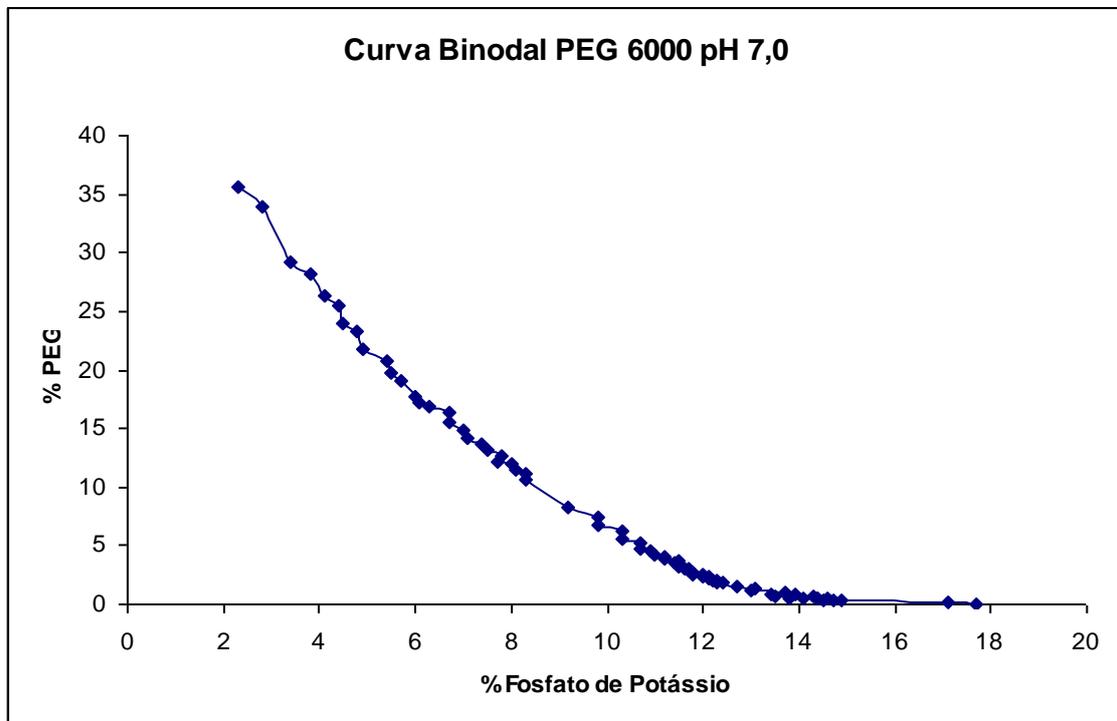
**Figura 21.** Curva Binodal para o PEG 4000 e fosfato de potássio 40% (p/p), pH 7,0.



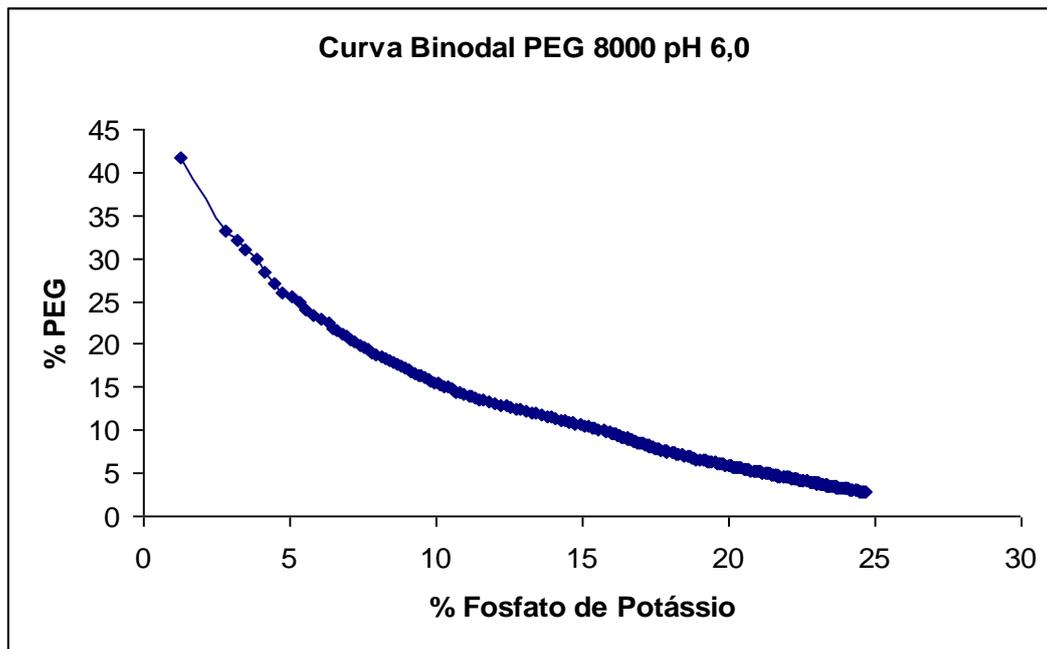
**Figura 22.** Curva Binodal para o PEG 6000 e fosfato de potássio 30% (p/p), pH 6,0.



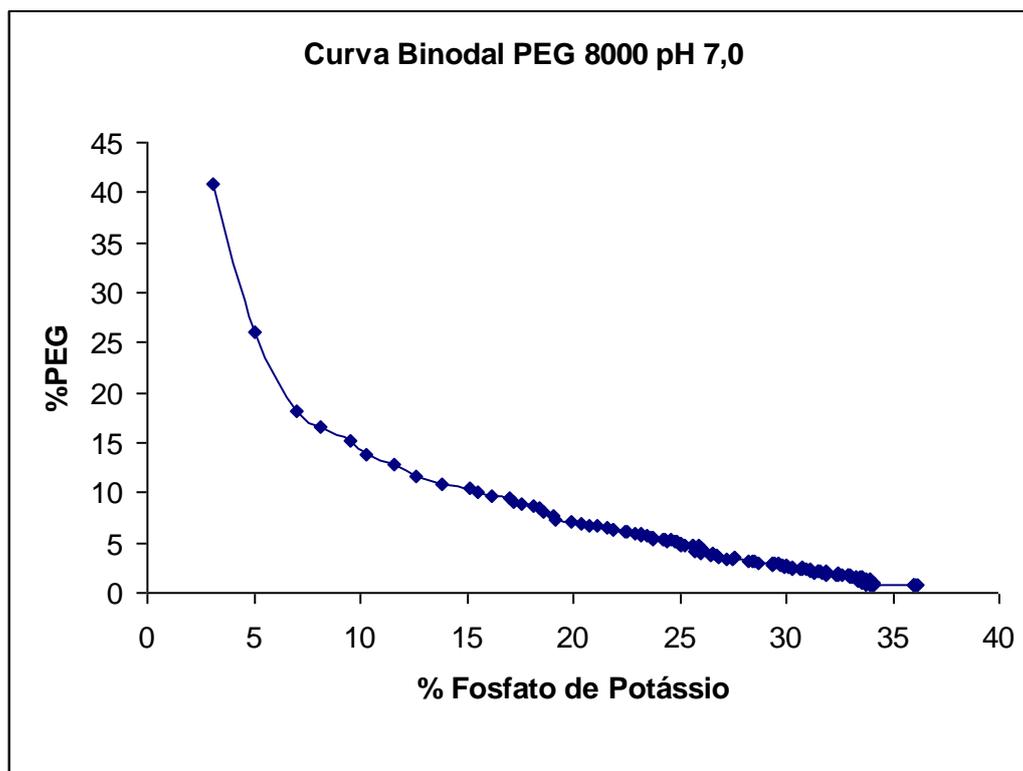
**Figura 23.** Curva Binodal para o PEG 6000 e fosfato de potássio 40% (p/p), pH 7,0.



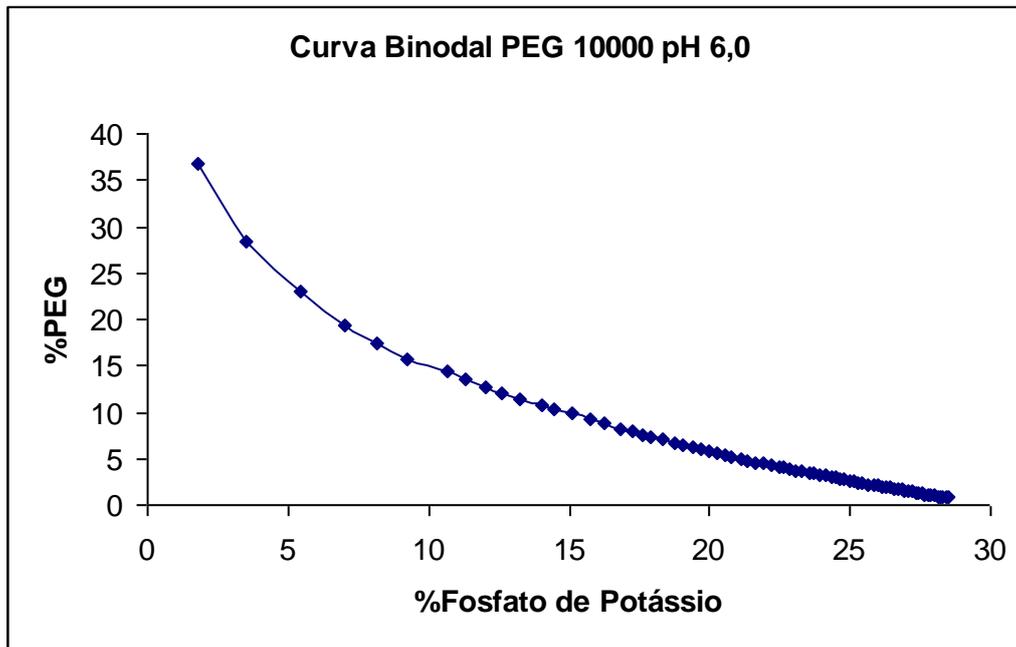
**Figura 24.** Curva Binodal para o PEG 8000 e fosfato de potássio 30% (p/p), pH 6.



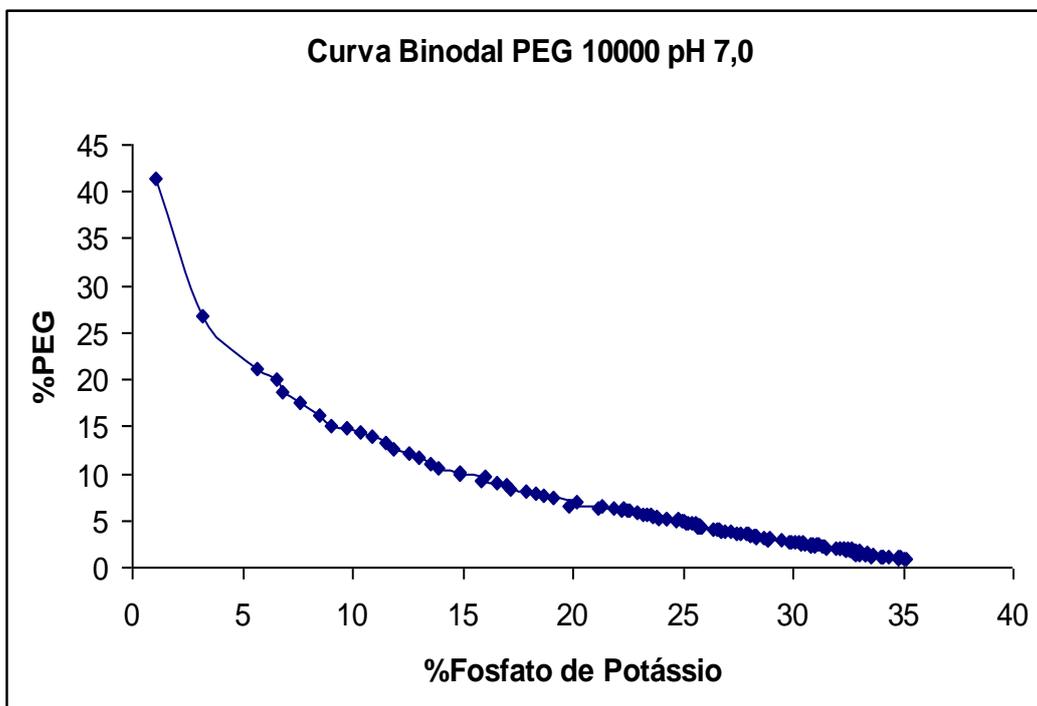
**Figura 25.** Curva Binodal para o PEG 8000 e fosfato de potássio 40% (p/p), pH 7.



**Figura 26.** Curva Binodal para o PEG 10000 e fosfato de potássio 30% (p/p), pH 6

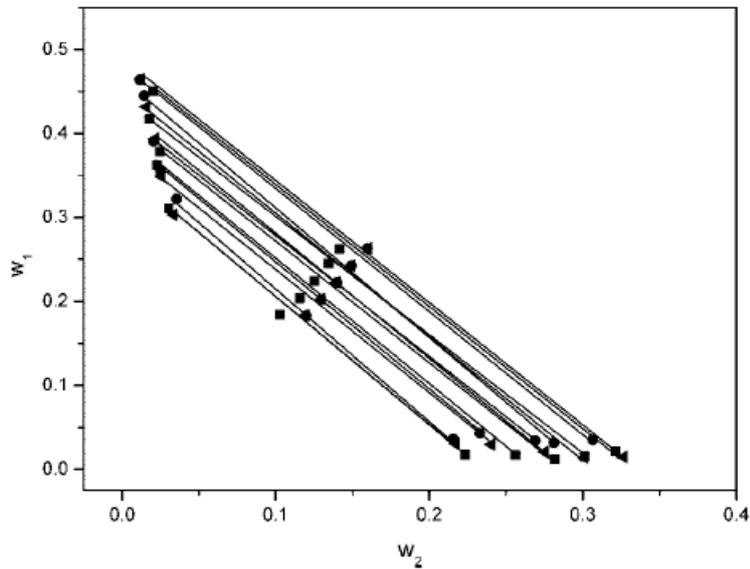


**Figura 27.** Curva Binodal para o PEG 10000 e fosfato de potássio 40% (p/p), pH 7.



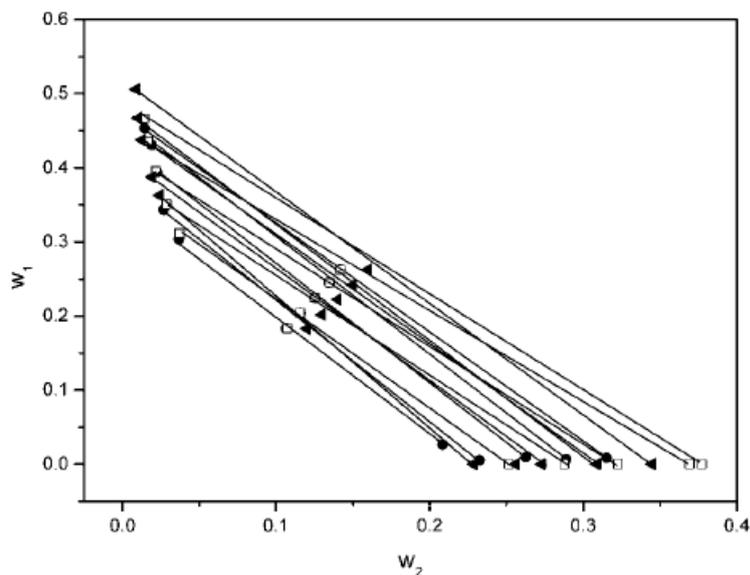
ANEXO III– Curvas Binodais para PEG 1500, 4000, 6000 e 8000 Da e citrato de sódio pH 5.

**Figura 28.** Curva Binodal para o PEG 1500 e citrato de sódio. (OLIVEIRA *et al.*, 2008)



**Figure 3.** Temperature effect on the equilibrium phase compositions for the PEG 1500 (1) + sodium citrate + water (3) system at ■, 10 °C; “triangle left solid”, 35 °C; ●, 45 °C.

**Figura 29.** Curva Binodal para o PEG 4000 e citrato de sódio. (OLIVEIRA *et al.*, 2008)



**Figure 1.** Temperature effect on the equilibrium phase compositions for the PEG 4000 (1) + sodium citrate + water (3) system at ●, 5 °C; □, 10 °C; “triangle left solid”, 25 °C.

**Figura 30.** Curva Binodal para o PEG 6000 e citrato de sódio. (ZAFARINI-MOATTAR *et al.*, 2004).

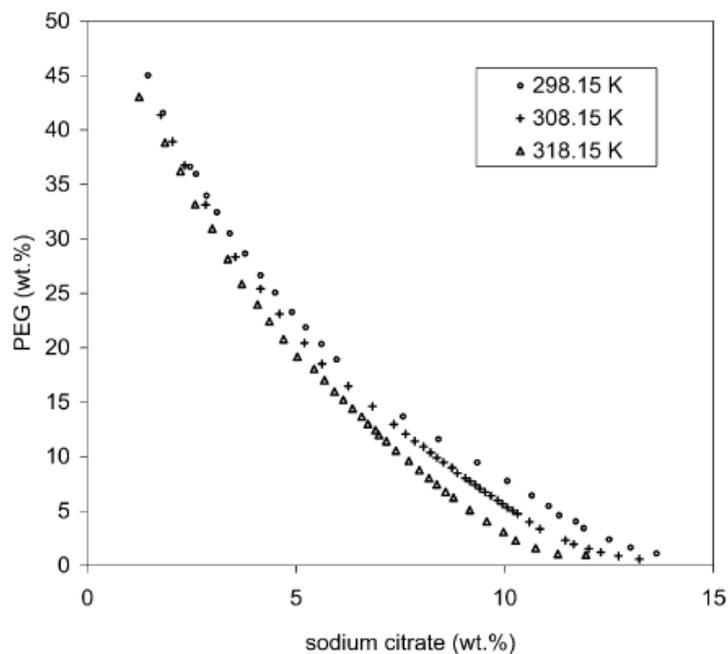


Fig. 1. Binodal curves for the PEG<sub>6000</sub>-sodium citrate-H<sub>2</sub>O system at 298.15, 308.15 and 318.15 K.

**Figura 31.** Curva Binodal para o PEG 8000 e citrato de sódio. (TUBÍO-MOATTAR *et al.*, 2006).

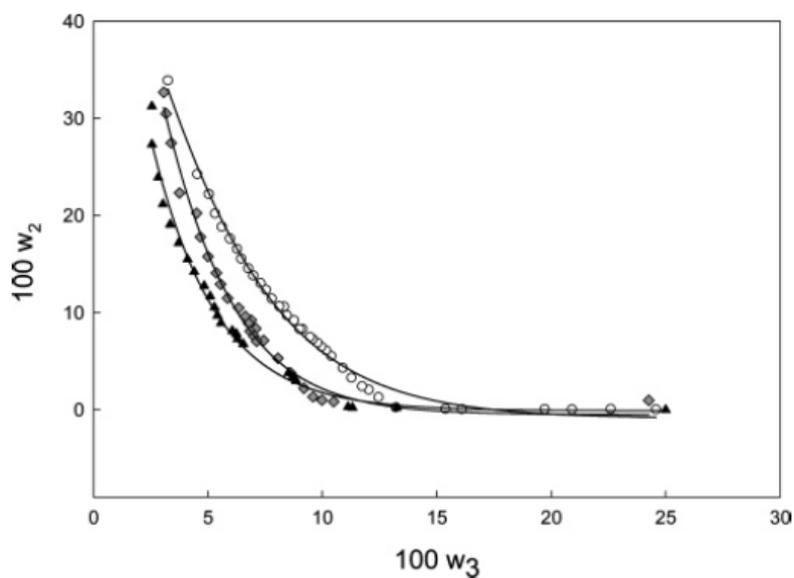


Figure 3. Effect of temperature on binodal curve corresponding to ATPS of water (1) + PEG8000 (2) + citrate (3) at pH 5.20: ○, 295 K; ◇, 310 K; ▲, 323 K.