

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

PRODUÇÃO DE INULINASE POR *Kluyveromyces marxianus* E PURIFICAÇÃO DA
ENZIMA POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM COLUNA DE
LEITO EXPANDIDO

Susana Juliano Kalil

Mestre em Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1997

Orientadora: Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Susana Juliano Kalil, aprovada pela Comissão Julgadora em 03 de agosto de 2000.

Campinas, 03 de agosto de 2000.


Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues
Presidente da Banca

CAMPINAS

2000

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



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

2000/2001

UNIDADE BC
 N.º CHAMADA:
TIUNICAMP
K124p
 V. Ex.
 TOMBO BC/ 42433
 PROC 06-278100
 C ☐ D ☒
 PREÇO R\$ 00,00
 DATA 09/09/00
 N.º CPD

CM-00145880-7

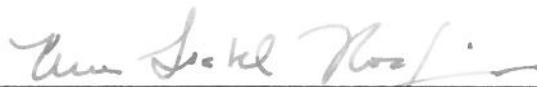
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

K124p Kalil, Susana Juliano
 Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* e
 purificação da enzima por cromatografia de troca iônica em
 coluna de leito expandido / Susana Juliano Kalil. – Campinas,
 SP: [s.n.], 2000.

Orientador: Maria Isabel Rodrigues
 Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Inulinase. 2.Cromatografia de troca iônica. 3.Planejamento
 experimental. I.Rodrigues, Maria Isabel. II.Universidade
 Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.
 III.Título.

BANCA EXAMINADORA



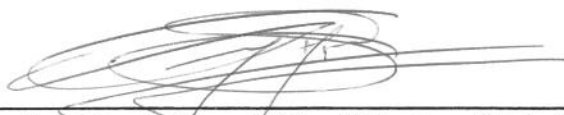
Profª. Dra. Maria Isabel Rodrigues (Orientadora)
DEA/FEA/UNICAMP



Prof. Dr. Ângela Maria Moraes (Membro-Titular)
DPB/FEQ/UNICAMP



Prof. Dr. César Costapinto Santana (Membro-Titular)
DPB/FEQ/UNICAMP



Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho (Membro-Titular)
DEA/FEA/UNICAMP



Dr. Marlei Barboza (Membro-Titular)
DEQ/UFSCAR

Dra. Gabriela Alves Macedo (Membro-Suplente)
Rhodia

Profª. Dra. Gláucia M. Falcão de Aragão (Membro-Suplente)
DEQ/UFSC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

DEDICATÓRIA

A meu filho que trouxe tanta alegria para a minha vida.

Ao Medeiros, pelo amor, companheirismo e dedicação em todos os momentos.

A meus pais, Michel (in memorian) e Maria Antonia pelo amor e apoio de toda
uma vida.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

AGRADECIMENTOS

À professora Maria Isabel pela preciosa amizade, orientação e atenção no decorrer de todo o doutorado.

Ao professor Francisco Maugeri pelas valiosas sugestões e conselhos em relação a toda tese.

Aos membros da banca, Dra. Ângela Maria Moraes, Dr. César Costa Pinto, Dr. Marlei Barboza, Dra. Gabriela Alves Macedo e Dra. Gláucia M. Falcão de Aragão, pelas importantes sugestões.

A toda minha família, que me ajudou e incentivou ao longo do doutorado, principalmente ao meu irmão Paulo Ricardo, minha cunhada Rejane, minhas primas Maria Angélica e Cristina, minha sogra Neli, meus cunhados Tita, Cris, Vera e Giovani.

Aos amigos, Alessandra, Mauro e Ana Priscila pelo grande e indispensável apoio durante estes anos em Campinas.

Aos amigos André e Janaína, pela amizade, carinho e contribuições importantes ao longo da tese.

Aos amigos Eliana, Fifa, Lia e Flávio Honorato que ajudaram a tornar possível esta tese.

A todos os colegas do laboratório de Engenharia de Bioprocessos: Aline, Belzinha, Daniel, D. Maria, Guiga, Yemiko, Luciano, Márcio, Oscar, Rafael, Reinaldo e Rodrigo.

Aos colegas, Flávio, Kity e Rose pelos bons momentos compartilhados.

Aos colegas Ana Virgínia, Milton Espírito Santo e Bernadelli pela ajuda durante este período de afastamento.

À Fundação Universidade do Rio Grande que propiciou a realização deste doutorado.

À CAPES, órgão financiador da bolsa de estudo.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

ÍNDICE GERAL

Nomenclatura	v
Resumo	vii
Summary	viii
1 - Introdução	01
2 - Revisão Bibliográfica	07
2.1 – Inulina	07
2.2 – Inulinases	08
2.2.1 – Microrganismos produtores de inulinase	09
2.2.2 - Produção de inulinase	09
2.2.3 – Caracterização da inulinas	12
2.3 - Purificação	14
2.3.1 - Métodos cromatográficos	15
2.3.1.1 - Classificações da cromatografia	16
2.3.2 - Cromatografia por troca iônica	18
2.3.2.1 - Matriz e grupos trocadores	20
2.3.2.2 - Purificação de inulinase	23
2.3.3 - Adsorção em coluna de leito expandido	25
2.3.3.1 - Generalidades	25
2.3.3.2 - Processo de adsorção em leito expandido	27
2.3.3.3 - Estudos de adsorção em leito expandido	28
2.3.3.4 – Hidrodinâmica do leito	31
2.4 - Teoria da adsorção	34
2.4.1 - Processo de adsorção	34
2.4.2 - Curva de ruptura	35

2.5 – Conclusão.....	38
3 - Materiais e Métodos.....	39
3.1 – Otimização da produção da inulinase.....	39
3.1.1 – Preparo do inóculo.....	39
3.1.2 – Planejamento experimental.....	41
3.1.2.1 – Planejamento fatorial fracionado.....	43
3.1.2.2 – Planejamento fatorial completo.....	43
3.1.3 – Dinâmica de produção da inulinase.....	44
3.2 – Estudo da influência da concentração de substrato, pH e temperatura na determinação da atividade enzimática da inulinase.....	44
3.2.1 – Produção da enzima.....	44
3.2.2 – Planejamento experimental.....	45
3.3 – Purificação da inulinase.....	45
3.3.1 – Resina adsorvente.....	45
3.3.2 – Cinética de adsorção.....	46
3.3.3 – Isotermas de adsorção.....	47
3.3.4 – Seleção das condições de eluição da enzima.....	50
3.3.5 – Recuperação e purificação da enzima na coluna de leito expandido Streamline 25.....	50
3.3.5.1 – Sistema de trabalho.....	50
3.3.5.2 – Preparo da coluna Streamline 25.....	52
3.3.5.3 – Estudo do comportamento hidrodinâmico.....	53
3.3.5.4 – Obtenção das curvas de ruptura.....	53
3.3.5.4.1 – Comparação das curvas de ruptura.....	53
3.3.5.4.2 – Comparação dos graus de expansão.....	54
3.3.5.4.3 – Curvas de ruptura para a mesma expansão e atividades diferentes.....	54
3.3.5.4.4 - Curvas de ruptura para a mesma expansão com e sem células.....	55

3.3.5.5 – Operação do leito expandido para purificação da enzima.....	56
3.4 – Metodologia analítica.....	57
3.4.1 – Determinação da atividade enzimática.....	57
3.4.2 – Determinação de açúcares redutores.....	57
3.4.3 – Determinação de açúcares redutores totais.....	58
3.4.4 – Dosagem de proteína.....	58
3.4.5 – Massa seca.....	58
3.4.6 – Condutividade.....	58
3.4.7 – Densidade.....	58
3.4.8 – Viscosidade.....	58
4 – Resultados e Discussão.....	59
4.1 – Otimização da produção da inulinase.....	59
4.1.1 – Planejamento fatorial fracionado.....	59
4.1.2 – Planejamento fatorial completo.....	64
4.1.3 – Dinâmica de produção da inulinase.....	72
4.2 – Estudo da influência da concentração de substrato, pH e temperatura na determinação da atividade enzimática.....	73
4.3 – Resultados da etapa de recuperação e purificação da enzima.....	84
4.3.1 – Cinética de adsorção.....	84
4.3.2 – Isotherma de adsorção.....	85
4.3.3 – Obtenção dos parâmetros cinéticos e de transporte de massa.....	87
4.3.4 – Seleção das condições de eluição de coluna de leito fixo.....	90
4.3.5 – Ensaio na coluna Streamline 25.....	102
4.3.5.1 - Estudo do comportamento hidrodinâmico	102
4.3.5.2 – Obtenção das curvas de ruptura.....	104
4.3.5.2.1 – Comparação dos graus de expansão.....	104
4.3.5.2.2 – Curvas de ruptura para a mesma expansão e diferentes atividades.....	106
4.3.5.2.3 - Curvas de ruptura para a mesma expansão (2,0)	

com e sem células.....	107
4.3.5.2.4 – Curvas de ruptura completa para expansão 2,5 e 3,0.....	108
4.3.5.3 – Operação do leito para purificação da enzima.....	110
5 – Conclusões.....	129
6 – Sugestões.....	132
7 - Referências Bibliográficas.....	133

NOMENCLATURA

C	enzima em solução	U/mL
C ₀	enzima na alimentação	U/mL
C ₁	Concentração de sal no tanque 1	g/mL
C ₂	Concentração de sal no tanque 2	g/mL
C _B	concentração de ruptura da enzima	kg / m ³
C _E	concentração de exaustão da enzima	kg / m ³
D _c	diâmetro da coluna	m
D _{ef}	difusividade efetiva	cm ² /s
d _p	diâmetro da partícula da resina	m
F ₁	vazão de saída do tanque 1	mL/h
F ₂	vazão de saída do tanque 2	mL/h
H	altura do leito expandido	cm
H ₀	altura do leito expandido sedimentado	cm
k ₁	constante cinética de adsorção	mL/U.min
k ₂	constante cinética de dessorção	min ⁻¹
k _d	constante de dissociação para adsorção	U/mL
k _s	coeficiente de transferência de massa na película líquida	cm/s
n	coeficiente de Richardson-Zaki	-
N _{Re}	número de Reynolds	-
Q	concentração de enzima adsorvida na resina	U / m ³ resina
Q _m	quantidade máxima de enzima que pode ser adsorvida na resina	U/ m ³ resina

Re_t	Reynolds terminal	-
t	Tempo	h
t_B	tempo de ruptura	h
t_E	tempo de exaustão	h
u	velocidade de escoamento do meio	m / h
u_t	velocidade terminal da resina	m / h
V_0	volume inicial do reator 2	mL
V_2	volume do reator 2	mL
z	distância axial	m

Termos gregos

ε	porosidade do leito de resina	-
μ	viscosidade	Pa.s ⁻¹
ρ	densidade	kg / m ³

RESUMO

Frutose é o açúcar natural mais doce, sendo uma alternativa segura para substituir a sacarose. A Inulinase tem um importante papel na produção de frutose através da hidrólise enzimática da inulina, que pode ser realizada em uma única etapa e render até 95% de conversão.

Este trabalho teve por objetivos otimizar as condições de produção da enzima inulinase produzida por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045, otimizar as condições de reação sobre a sacarose e a inulina e recuperar a enzima em coluna de leito expandido utilizando a resina de troca iônica Streamline SP.

Técnicas de planejamento experimental e análise de superfície de resposta foram utilizadas para otimizar o meio de cultura para produção da enzima e as condições de determinação da atividade enzimática. Na produção da enzima foram estudadas as variáveis concentração de sacarose, extrato de levedura, peptona, K_2HPO_4 e pH. Para tanto utilizou-se um planejamento fatorial fracionário (2^{5-1}) para determinar as variáveis mais importantes, sendo selecionadas três para serem utilizadas em um planejamento fatorial completo. A enzima obtida foi utilizada nos ensaios de determinação enzimática para verificar os efeitos da concentração de substrato (sacarose ou inulina), pH e temperatura na atividade de inulinase. Usando-se sacarose como substrato, verificou-se que a temperatura e o pH são as variáveis mais importantes e no caso da inulina somente a temperatura, dentro das faixas estudadas. A atividade enzimática passou de 9 para 110 U/mL após o estudo de otimização da produção da enzima.

O caldo bruto clarificado foi utilizado para determinar a isoterma e cinética de adsorção da inulinase extracelular em resina de troca iônica Streamline SP. Através dos dados experimentais de adsorção e mediante modelagem matemática, obteve-se os parâmetros cinéticos intrínsecos e os de transporte de massa. Os valores encontrados foram: $k_1=6,25 \cdot 10^{-3}$ mL/U.min. e $k_2=2,09 \cdot 10^{-3}$ min.⁻¹ independentemente da concentração de meio na solução. Os parâmetros coeficiente de transferência de massa (K_s) e difusividade efetiva (Def) foram $5,03 \cdot 10^{-2}$, $5,03 \cdot 10^{-4}$, $5,03 \cdot 10^{-4}$ cm/s e $1,105 \cdot 10^{-6}$, $6,58 \cdot 10^{-7}$, $3,25 \cdot 10^{-7}$ cm²/s para 45%, 60% e 100% de caldo bruto na solução estudada respectivamente.

Os ensaios no leito expandido com o meio não clarificado permitiram determinar o expoente de Richardson –Zaki (5,3) e a velocidade terminal (17,6 cm/min.). Através dos ensaios de adsorção obteve-se as curvas de ruptura e determinou-se o grau de expansão mais adequado para a purificação da enzima (expansão de 2 vezes). Através dos testes de purificação da inulinase diretamente do caldo bruto, obteve-se uma recuperação de 74% e um fator de purificação de 10,4 vezes para a eluição do tipo degrau.

SUMMARY

Fructose is the sweetest sugar, being a safe alternative for sucrose. Inulinase may play an important role in fructose production, by enzymatic hydrolysis of inulin. The reaction occurs in a single step and it is possible to obtain up to 95% of conversion.

In this work the optimization of the conditions for both inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 and inulinase reaction on sucrose and inulin are proposed, as well as, the enzyme purification using an expanded bed with the ion exchanger Streamline SP is studied.

Factorial design and surface response analysis were used to optimize the culture conditions for inulinase production and the enzymatic reaction parameters. In the enzyme production the following variables were studied: sucrose, yeast extract, peptone and K_2HPO_4 concentration and pH. The technique of factorial fractional design (2^{5-1}) was used, resulting in the selection of three variables utilization in a complete factorial design. The inulinase produced in fermentation for *Kluyveromyces marxianus* was used to verify the effects of substrate concentration, pH and temperature on enzymatic reaction. Using sucrose as substrate it was verified that temperature and pH were the most important variables. However, when inulin was used as substrate only the temperature was selected. The enzymatic activity increased from 9 U/mL to 110 U/mL after production optimization by Surface Response Analysis.

In terms of enzyme purification, the filtrate of crude broth was used for the determination of the adsorption isotherm and the adsorption kinetics of inulinase on the ion exchanger Streamline SP. The kinetics parameters were: $k_1=6.25 \cdot 10^{-3}$ mL/U.min. and $k_2=2.09 \cdot 10^{-3}$ min.⁻¹. For 45%, 60% and 100% of crude broth of the solution, the film coefficient (K_s) of $5.03 \cdot 10^{-2}$, $5.03 \cdot 10^{-4}$, $5.03 \cdot 10^{-4}$ cm/s and the effective diffusion coefficient (Def) of $1.105 \cdot 10^{-6}$, $6.58 \cdot 10^{-7}$, $3.25 \cdot 10^{-7}$ cm²/s were determined using the experimental results and mathematical modeling

The trials on expanded bed with crude broth were carried out to determine the Richardson – Zaki exponent (5.3) and terminal settling velocity (17.6 cm/min.). The studies of inulinase adsorption performance were used to obtain the breakthrough curves and established the best degree of bed expansion for enzyme recuperation. The inulinase was purified directly from an unclarified broth in 74% with a purification factor of 10.4 for elution step.

1 INTRODUÇÃO

A modificação de alimentos e outros materiais por enzimas tem ocorrido espontânea e deliberadamente por gerações. Atualmente, a tecnologia enzimática ocupa um lugar preponderante em biotecnologia e destacando-se no setor alimentício. Ao redor de 65% das enzimas que se produzem industrialmente estão relacionadas com a indústria alimentar. O tamanho do mercado das enzimas é difícil de estimar, primeiramente por razões de índole puramente comercial e também porque em vários processos as enzimas são produzidas e consumidas pela mesma empresa. A figura 1.1 mostra a situação do mercado internacional quanto à distribuição de produção de enzimas microbianas. A Dinamarca ocupa quase metade do mercado com a companhia NOVO. No Japão a produção de enzimas é uma das áreas mais avançadas, sendo praticamente as empresas japonesas as líderes na produção de enzimas em meio sólido (Garibay *et alii*, 1993).

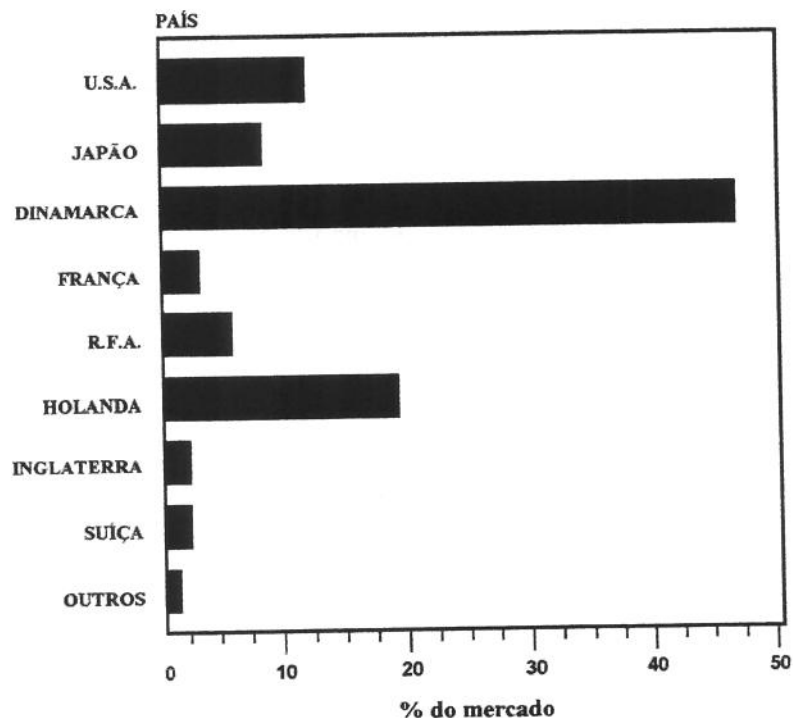


Figura 1.1: Distribuição do mercado ocidental de produção de enzimas microbianas (Garibay *et alii*, 1993).

Em função da facilidade de produção, muitas enzimas são obtidas a partir de fermentações microbianas, suplantando a produção de origem animal e vegetal. Isto se deve ao fato de exigirem em geral um tempo curto de produção, poderem ser obtidas em qualquer época do ano e utilizarem substratos normalmente de baixo custo. Neste contexto se encontram as inulinases, enzimas usualmente classificadas como 2,1 β -D-frutano frutohidrolase (EC 3.2.1.7). Estas enzimas são potencialmente úteis na produção de xaropes com alto teor de frutose (Ettalibi & Baratti, 1987) e na produção de oligossacarídeos (Kim *et alii*, 1997).

O processo de produção de frutose por hidrólise da inulina é mais desejável comparado com o processo convencional no qual frutose é produzida a partir de amido. Frutose pode ser obtida por ação da inulinase através de uma reação enzimática simples, na qual são formados produtos com 95% de frutose. Por outro lado, a produção convencional de frutose a partir do amido precisa de três etapas enzimáticas incluindo a ação da α -amilase, amiloglicosidase e glicose isomerase, produzindo soluções com apenas 45% de frutose no melhor caso, pois o equilíbrio termodinâmico entre glicose e frutose é próximo de 50% de glicose e 50% de frutose (Kim & Rhee, 1989).

Os oligossacarídeos são carboidratos formados de 3 a 10 unidades de monômeros de hexoses que podem ser encontrados em produtos vegetais (frutas e legumes), em leite e mel na forma livre ou combinada. Sua utilização como alimentos funcionais é proposta desde 1980, sendo que sua importância consiste no estímulo da produção de bifidobactérias. Em função disso são denominados como agentes “probióticos”.

Os frutooligossacarídeos representam um dos principais oligossacarídeos da classe dos bifidogênicos, em termos de produção. Normalmente são produzidos por dois processos, que não apresentam diferenças significativas no produto final. No primeiro processo, a sacarose é utilizada como substrato, obtendo como produto frutooligossacarídeos de 2 a 4 unidades fructosil com ligações β -(2-1), com um resíduo α -D-glicosil terminal, conhecidos como kestose, nistose e 1-frutosilnistose. O segundo

processo constitui-se na hidrólise enzimática da inulina, através das enzimas denominadas inulinases, produzindo frutooligossacarídeos de cadeia longa (Crittenden & Playne, 1996).

As inulinases podem ser obtidas de tubérculos e raízes de plantas que contêm inulina, ou através de microrganismos como bactérias, fungos e leveduras. Dentre as leveduras, aquelas pertencentes ao gênero *Kluyveromyces* têm despertado grande interesse industrial devido às suas características fisiológicas, reconhecidas como seguras e aceitas pela FDA (“Food and Drug Administration”).

Na produção de enzimas através de processos biotecnológicos, após a fermentação, dependendo da aplicação, 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, e o estudo de sua otimização, de modo a se obter um bioproduto comercialmente viável.

O caldo proveniente do fermentador é composto por uma mistura aquosa de células, produtos extra e intracelulares e ainda substratos e componentes não convertidos. A recuperação e purificação de proteínas envolve em sua maioria operações de separação sólido-líquido, como centrifugação e filtração, clarificando o caldo bruto, que é posteriormente passado em uma coluna cromatográfica.

O desenvolvimento de métodos que levem à eliminação destas etapas de clarificação tem sido estudado, pois estes reduziriam o tempo global de processamento, com aumento da produtividade. O aumento do número de etapas de purificação aumenta igualmente o custo e decresce o rendimento de recuperação do produto (figura 1.2) (Garibay *et alii*, 1993). Além disso, uma recuperação primária rápida poderia separar a proteína de interesse de condições prejudiciais do processo à sua estabilidade, como ação de proteases e outras enzimas ou fatores oxidantes. Industrialmente, a eliminação de etapas no processo de purificação pode vir a viabilizar não só tecnicamente, mas economicamente a introdução de um produto no mercado.

Um processo que vem recebendo atenção ultimamente é a adsorção de proteínas na presença de biomassa através do uso de leito fluidizado, particularmente o uso de leito expandido.

A adsorção em leito expandido envolve etapas de clarificação, concentração e purificação em uma única operação. O uso de adsorvente com densidade controlada permite obter um leito estável, com cada partícula mantendo uma posição discreta no leito com um pequeno movimento circular. Deste modo, este processo, comparado com o leito fluidizado, apresenta uma maior capacidade de adsorção, com o leito expandido se comportando como um reator tubular durante a aplicação da alimentação (Snow, 1994).

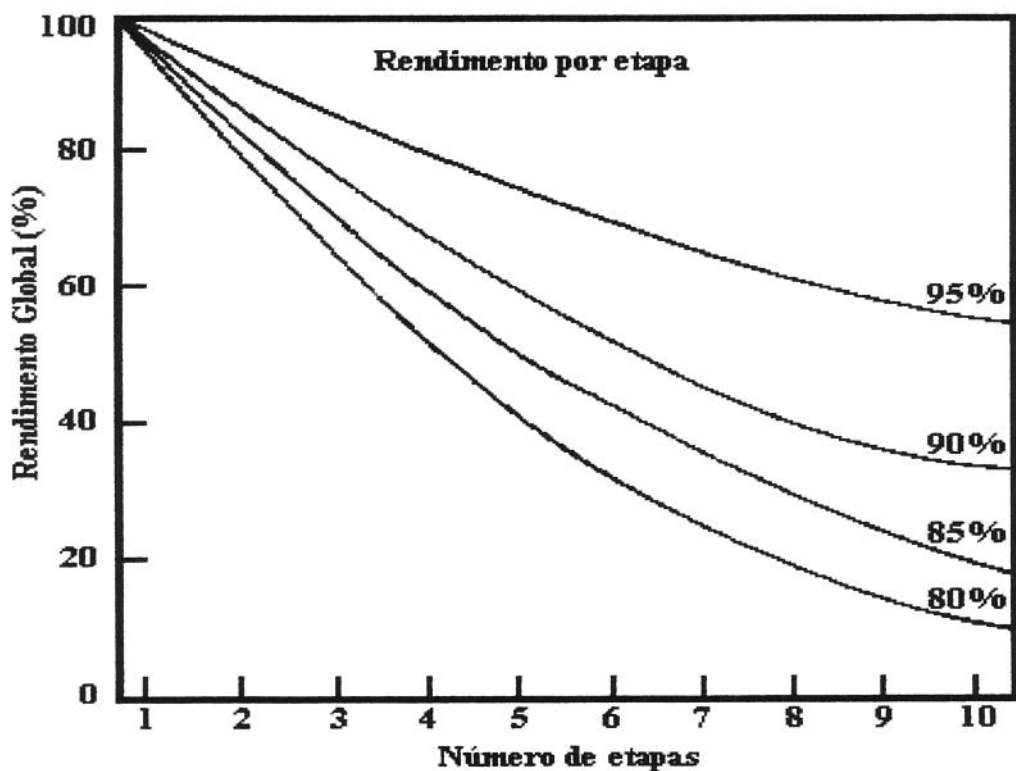


Figura 1.2: Relação entre o número de passos de um processo de purificação, o rendimento por etapa e o rendimento global do processo (Garibay *et alii*, 1993).

No presente trabalho, as seguintes etapas foram realizadas:

- 1) Otimização das condições de fermentação em frascos agitados: para este estudo foram realizados 2 planejamentos fatoriais, sendo o primeiro um fracionário para avaliar os efeitos das concentrações de sacarose, de extrato de levedura, de peptona, de K_2HPO_4 e do pH. No segundo planejamento foi realizado um fatorial completo para definir as concentrações de sacarose, peptona e extrato de levedura e assim otimizar a produção enzimática.
- 2) Otimização das condições de atuação da enzima: utilizou-se para tanto dois planejamentos experimentais de primeira ordem e dois planejamentos de segunda ordem. Nos dois primeiros foram avaliados os efeitos da concentração de substrato (sacarose ou inulina), do pH e da temperatura na atividade enzimática. Nos planejamentos completos de segunda ordem foram avaliados os efeitos do pH e da temperatura, sendo que em um planejamento utilizou-se sacarose (2% m/v) como substrato e em outro inulina (2%), de modo a otimizar as condições de atuação da enzima.
- 3) Determinação experimental dos parâmetros cinéticos de adsorção e determinação da isoterma de equilíbrio. Obteve-se a isoterma que mais convenientemente descreve a adsorção da inulinase a partir do caldo bruto clarificado e determinaram-se os parâmetros cinéticos (k_1 e k_2) e os de transporte de massa (D_{ef} e K_s).
- 4) Escolha das condições de eluição utilizando leito fixo. A enzima inulinase foi purificada através de uma coluna de leito fixo contendo resina Streamline SP, onde foram estudados na eluição, a influência da velocidade de alimentação, o pH do tampão salino, a concentração salina empregada e o tipo de eluição (gradiente linear crescente e degrau).
- 5) A coluna cromatográfica de leito expandido foi colocada em operação para estudo do comportamento hidrodinâmico. Foram investigadas as características de expansão do leito utilizando-se caldo bruto não clarificado como líquido de fluidização, determinando-se o coeficiente de Richardson – Zaki e a velocidade terminal.

- 6) Obtenção das curvas de ruptura operando a coluna de leito expandido para verificação da influência do grau de expansão, da presença de células e da atividade inicial na adsorção da enzima.
- 7) Operação do leito expandido, com as condições estabelecidas, para purificação da inulinase diretamente do caldo fermentado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Inulina

Inulina é o mais conhecido dos gluco-frutosanos. Estes são polímeros de D-frutose os quais possuem um resíduo de D-glicose em uma de suas extremidades. Na inulina as unidades de frutose são unidas por ligações β 2,1 formando uma cadeia linear conforme apresentado na figura 2.1. Aproximadamente 30 unidades de frutose formam uma cadeia, porém o comprimento médio varia em função da planta e da estação do ano (Vandamme & Derycke, 1983).

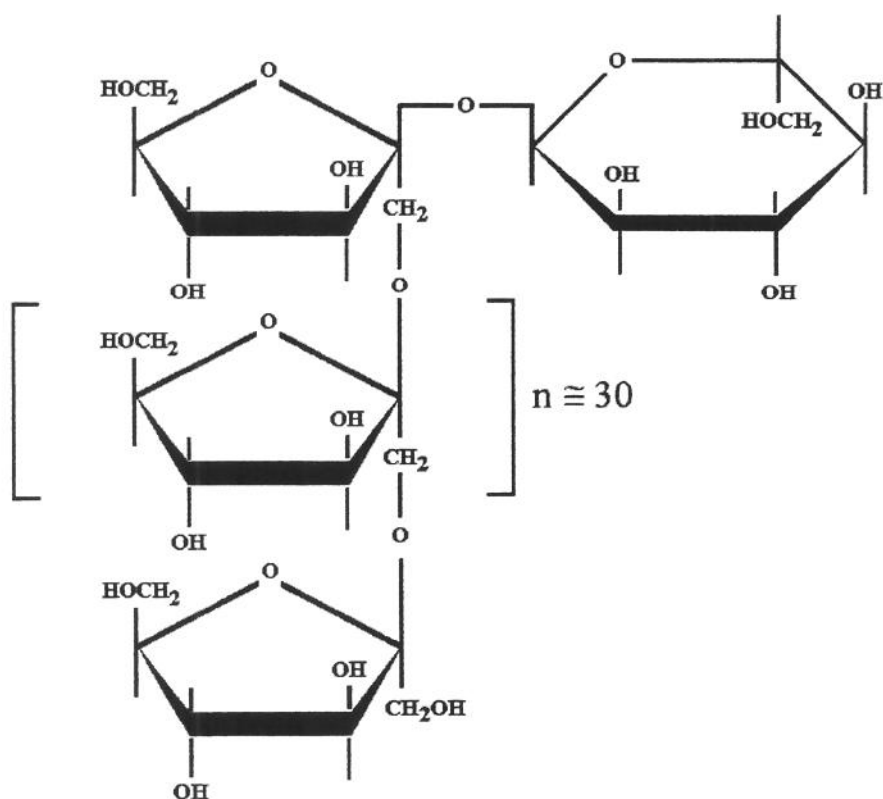


Figura 2.1: Fórmula estrutural da molécula de inulina (Vandamme & Derycke, 1983).

Uma fonte interessante de inulina é a alcachofra de Jerusalém, a qual contém um polifrutano (aproximadamente 75 – 80% massa seca) com um grau de polimerização de 3 – 30 unidades (Manzoni & Cavazzoni, 1992). Inulina também é abundante em raízes de chicória e dália (Elyachoui *et alii*, 1992).

Inulina pura é insolúvel em água fria, mas pode ser dissolvida em água quente (Zittan, 1981). Na água à temperatura de 55 °C é 5% solúvel. Seu peso molecular varia geralmente entre 3500 e 5500 Da (Vandamme & Derycke, 1983), podendo alcançar 6000 Da (Zittan, 1981), diferenças estas provenientes da variação no comprimento da cadeia. A hidrólise da inulina pode ser feita em meio ácido (pH 1-2), à temperatura de 80 a 100°C. No entanto, a estas condições de pH e temperatura, a frutose liberada é facilmente degradada, com a formação de subprodutos na forma de anidrido e coloração indesejada, que reduzem a qualidade do produto. A hidrólise enzimática é uma alternativa muito mais interessante, podendo ser realizada em condições mais brandas de pH e temperatura, porém leva mais tempo para uma hidrólise completa (Barthomeuf *et alii*, 1991).

2.2 Inulinases

Enzimas microbianas podem ser classificadas em três maiores campos de aplicação: aquelas que podem ser utilizadas na síntese de compostos úteis; outras que podem estereoespecificamente realizar importantes reações de bioconversão; e algumas que hidrolisam polímeros em monômeros de interesse (Vandamme & Derycke, 1983).

As enzimas apresentam diversas propriedades que as tornam interessantes para uso como biocatalisadores. Entre elas, o fato de poderem atuar em condições brandas e de uma maneira estereo-seletiva. Neste contexto se encontram as inulinases que podem ser utilizadas em processos de hidrólise da inulina e na síntese de oligossacarídeos.

Diversas inulinases microbianas têm sido parcialmente purificadas e suas propriedades foram revisadas por Vandamme & Derycke (1983). Em contraste com as enzimas de plantas, inulinases microbianas apresentam atividade sobre a sacarose, bem como

sobre a inulina. Usualmente, inulinases são classificadas como 2,1 - β - D frutano frutohidrolase (EC 3.2.1.7), mas a diferença com invertase (EC 3.2.1.26) não é clara para enzima microbiana. É geralmente aceito que a taxa de atividade sobre a sacarose em relação à inulina (S/I) caracteriza a enzima: para uma inulinase a taxa S/I é menor do que 100 (Ettalibi & Baratti, 1987).

2.2.1 Microrganismos produtores de inulinase

As inulinases podem ser obtidas a partir de tubérculos e raízes de plantas que contêm inulina (Vandamme & Derycke, 1983) ou através de microrganismos como fungos (Barthomeuf *et alii*, 1991; Poorna & Kulkarni, 1995), bactérias (Efsthathiou *et alii*, 1986 e Belamri *et alii*, 1994) e leveduras (Grootwassink & Fleming, 1980; Manzoni & Cavazzoni, 1988; Rouwenhorst *et alii*, 1990; Hensing *et alii*, 1994; Gupta *et alii*, 1994 e Santos, 1998). Dentre os microrganismos, as leveduras têm sido muito estudadas para a produção de inulinase, pois oferecem vantagens sobre os fungos no processo de fermentação devido a sua natureza unicelular. As do gênero *Kluyveromyces* possuem o “GRAS” (“generally regarded as safe”) (Spiegel *et alii*, 1994) que as faz aceitar pela FDA (Food and Drug Administration) para a produção de compostos farmacêuticos e alimentícios (Hensing *et alii*, 1994).

2.2.2 Produção de inulinase

Grootwassink & Fleming (1980) produziram inulinase a partir de fermentação com *Kluyveromyces fragilis* ATCC 12424 . Utilizaram meio complexo, contendo uma fonte de carbono, dália ou sacarose, e extrato de levedura, como fonte de nitrogênio, vitaminas e nutrientes inorgânicos. Escolheram para fermentações em batelada e contínuas uma temperatura de 30 °C. Na fermentação em batelada a produção de inulinase total atingiu um máximo de aproximadamente 40.000 $\mu\text{g/ min. mL}$ de hexose, após 17 horas. O meio consistiu de 2 % de inulina e 1% de extrato de levedura, com uma aeração de 2 ml/min e

500 rpm, o pH se manteve em valores favoráveis de 5,5 a 6,5. A utilização de sacarose levou a uma produção 80% menor de inulinase.

Rouwenhorst *et alii* (1988) utilizaram *K. marxianus* var. *marxianus* CBS 6556 para obtenção de inulinase. Utilizaram para tal, um meio sintético, onde testaram diferentes fontes de carbono (glicose, frutose, lactose, sacarose, inulina e glicerol) que foram adicionadas para fornecer ao final 2,5 g/l. Os cultivos foram a 40°C, 50 a 70% de ar saturado e pH 4,5. Em culturas contínuas, os maiores rendimentos de inulinase total foram obtidos utilizando-se sacarose ou inulina como substrato limitante. Os níveis de inulinase em culturas no quimiostato, em condições de limitação de sacarose, foram altamente dependentes da taxa de diluição (D). Os valores decresceram de um máximo de 52 U/mg cel. seca a $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$ para 2 U/mg a $D = 0,8 \text{ h}^{-1}$.

Gupta *et alii* (1994) produziram inulinase de *Kluyveromyces fragilis* (NCIM 3217), sendo que a máxima atividade foi atingida após 36 horas de fermentação, em um meio contendo 1% de inulina como fonte de carbono, a 25-27°C. Após estudos do crescimento em meios contendo diferentes fontes de carbono: 1% de frutano, 1% de sacarose, 1% de frutose ou 1% de glicose, verificaram que a máxima produção de inulinase foi com o meio contendo 1% de frutano, seguido daquele contendo sacarose. Em testes feitos com meios contendo diferentes fontes de nitrogênio, observaram que peptona forneceu os melhores resultados. No estudo do efeito da adição de fosfatos inorgânicos, observaram que a adição de NaH_2PO_4 (0,25% (m/v)) e de KH_2PO_4 (0,25% (m/v)) em meio contendo 1% de inulina, conduziu a um aumento significativo na produção de inulina extracelular. A máxima atividade observada sobre a inulina foi de 7 unidades/ cm^3 , com 36 horas de crescimento, havendo após um declínio deste valor, devido provavelmente à desnaturação da enzima presente no meio por proteases secretadas pelo microrganismo.

Na produção contínua de inulinase por *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16046, em meio com limitação de carbono, Kushi *et alii* (1996) verificaram que, à medida em que a taxa de diluição aumenta, as frações de enzima encontradas no sobrenadante e ligadas à célula diminuem, com um consequente aumento da fração ligada à parede celular. A atividade total diminui com o incremento da taxa de diluição. Este fato sugere que a síntese

de inulinase em fermentação contínua é regulada pela concentração de açúcar residual no meio de cultura.

Schneider (1996) estudou a produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 e constatou que a faixa de temperatura de 32-37°C foi a que proporcionou melhor crescimento celular e atividade enzimática total. O controle de pH do meio em 4,5 foi favorável comparado ao meio sem controle. A influência da concentração inicial de substrato foi estudada entre 10 e 60 g/L. Os resultados mostraram que concentrações de inulina acima de 20 g/L não são favoráveis à produção de enzima. A utilização de bacto peptona não foi imprescindível à formação de enzima. No entanto, a presença de extrato de levedura é fundamental para o crescimento e, também no processo de formação da enzima. Concentrações crescentes de uréia ou sulfato de amônio ocasionaram uma diminuição na formação de células e na síntese de inulinase. Valores crescentes do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (21 a 89 h⁻¹) foram favoráveis à formação de biomassa e à síntese de inulinase.

Santos (1998) trabalhou com três meios distintos, para obtenção de inulinase a partir de fermentação com *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045. Optou pelo que continha 30 g/L de sacarose, 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 5,0 g/L de K₂HPO₄, sendo o pH inicial de 3,5. Obteve uma atividade final de 7,54 UI/mL e boa reprodutibilidade quando comparado ao meio que continha água de maceração de milho e melaço, apesar deste último em algumas fermentações atingir maior atividade. As condições da fermentação foram temperatura de 30°C, aeração 0,2-0,3 vvm, agitação moderada e tempo de fermentação de 18 horas.

Assim, são encontrados na literatura estudos de várias variáveis como fonte de carbono, nitrogênio, sais, pH, temperatura, aeração e agitação dentre outros, como fatores importantes na produção de inulinase. No entanto, em nenhum destes estudos foi realizado um planejamento fatorial levando-se em consideração várias variáveis ao mesmo tempo. A análise multivariável permite avaliar efeitos sinérgicos e antagônicos entre elas e conseqüentemente as melhores condições que levem a otimização da produção dentro das condições estudadas.

2.2.3 Caracterização da inulinase

Segundo Vandamme & Derycke (1983), a temperatura média ótima para a atividade de inulinase é de 50°C. A temperatura de 60°C parece favorável industrialmente, por combater contaminação dos reatores e aumentar a solubilidade da inulina. Considerando a estabilidade da enzima como uma função da temperatura, tem-se observado uma rápida desnaturação quando se passa do valor ótimo. Com respeito ao pH ótimo para a atividade da inulinase, este está por volta de 4,5-5,0. A inulinase é aparentemente estável a um pH de 4,0-6,0.

Com respeito ao peso molecular, Gupta *et alii* (1994) determinaram um valor de 250 $\pm$ 10 kDa para a inulinase de *Kluyveromyces fragilis* (NCIM 3217). A enzima apresentou máxima hidrólise da inulina a 55°C e na forma purificada apresentou um ótimo de hidrólise da sacarose a 55°C também. Os preparados de inulinase na forma crua, purificada e imobilizada apresentaram um pH ótimo de hidrólise a 5,5, sendo que a forma purificada apresentou máxima atividade hidrolítica sobre a sacarose em um pH de 4,5. Para a temperatura de 50°C, os tempos de meia vida para as formas crua, imobilizada e purificada foram 34 h, 36 h e 10-12 horas, respectivamente, e para a temperatura de 60°C, os tempos de meia vida foram de 17 min, 5 min e 3-4 minutos, respectivamente.

Kushi *et alii* (1996) caracterizaram a enzima obtida de *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16046 e verificaram um valor de 30,1 kDa para o peso molecular e um pH ótimo de 4,6 para hidrólise da sacarose.

Guerrero *et alii* (1995) caracterizaram a inulinase obtida de *K. marxianus* CDBB-L-278 com respeito à atividade sobre a inulina e a sacarose e observaram que o pH ótimo foi de 5,0 para ambos os substratos e a temperatura ótima foi 50°C para a inulina e 70°C para a sacarose. Quanto à estabilidade, a enzima foi estável a 50°C, porém o mesmo não ocorreu a 60 e 70°C.

Segundo Schneider (1996) a enzima produzida por *K. marxianus* ATCC 36907 apresentou uma atividade ótima sobre a inulina em temperaturas de 50-60°C e pH de 4,5 a

6,0. Estes valores baixos de pH são atrativos para a indústria pois diminuem o risco de contaminação microbiana. Quanto à estabilidade, a enzima extracelular foi estável em temperaturas inferiores a 55°C e na faixa de pH entre 3,0 e 7,0, enquanto a enzima periplasmática mostrou-se mais sensível à influência da temperatura, começando a perder atividade acima de 45°C.

Rouwenhorst *et alii* (1988) trabalhando com inulinase de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 verificaram que a enzima apresenta uma temperatura ótima para a atividade de 70°C atuando sobre a sacarose e 50°C sobre a inulina, e um pH de 3,5 para a sacarose e 5,0 para a inulina. Quanto à estabilidade, nenhuma perda de atividade foi observada quando preparados de inulinase foram incubados por 8 horas a 50°C, porém a 60°C, o tempo de meia vida foi de 30 minutos.

Costa (1986) trabalhando com *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045 caracterizou a enzima produzida, até então denominada invertase. Estudos posteriores (Santos, 1998) mostraram que esta enzima também atuava sobre a inulina com valores de S/I baixos e que poderia ser denominada inulinase. O pH e temperaturas ótimos de atuação da enzima sobre a sacarose foram ao redor de 4,0 e 50-60°C, respectivamente. Quanto à estabilidade, a enzima perde rapidamente atividade acima de 60°C e tem um pH ótimo ao redor de 5,0, sendo que entre 4,0 e 8,0 conservou 95% da atividade após 6 horas de incubação.

Conforme se verifica, as condições de temperatura de atuação da enzima inulinase são diferentes conforme o substrato utilizado. Quando sacarose é utilizada a temperatura ótima (cerca de 70 °C) é superior à quando se utiliza inulina (50 a 55 °C) como substrato. Valores reportados de pH ótimo estão principalmente entre 4,5 e 5,5. Quanto à estabilidade, a enzima perde atividade rapidamente acima de 60°C. Como pode ser verificado é importante um estudo sistemático destes parâmetros para avaliar o efeito de interação existente entre elas para melhor avaliação da atuação da enzima com que se trabalha para poder obter uma maior eficiência em sua aplicação, seja atuando sobre a sacarose ou sobre a inulina.

2.3 Purificação

As vendas estimadas de produtos biotecnológicos em 1991 foram de US\$ 9 bilhões nos Estados Unidos, Alemanha, França e Inglaterra. É estimado que no ano 2000 as vendas no mundo de produtos biotecnológicos serão de US\$ 100 bilhões (Burril & Roberts, 1992).

Conforme Knight (1989), os custos de biosseparação têm representado 50 a 80% do custo de produção, sendo a cromatografia freqüentemente o processo mais caro no protocolo de separação. Spalding (1991) também salienta que os custos do processo de recuperação e purificação representam pelo menos metade do custo total de produção de uma droga, proteína ou produto biológico.

Para se reduzir custos de produção é necessário melhoras nos equipamentos do processo de recuperação e purificação. Precisa-se analisar melhor e entender as diferentes particularidades envolvidas no processo (Sadana & Beelaram, 1994).

Segundo Bailey & Ollis (1986) a seqüência de operações típicas para obter um produto altamente purificado é a seguinte:

- a) Remoção de particulados: através de operações como filtração, centrifugação, ou ainda sedimentação e decantação.
- b) Isolamento primário: utiliza-se métodos como extração por solvente, precipitação, sorção, ultrafiltração. Esta etapa pode resultar em considerável aumento da concentração de produto, o que facilita as etapas seguintes de purificação.
- c) Purificação: estes processos são mais seletivos e incluem precipitação fracionada, cromatografia e adsorção.
- d) Isolamento do produto final: este último passo deve fornecer o produto desejado na forma que se deseja comercializar. Pode-se ter nesta etapa centrifugação e subsequente secagem de produto cristalizado, liofilização, “spray drying” ou ainda remoção por solvente orgânico.

O item de remoção de particulados pode não ser necessário caso a etapa cromatográfica possa operar com o caldo bruto proveniente dos bioreatores sem prejuízos ao processo. Este é o caso dos processos com leite expandido.

2.3.1 Métodos cromatográficos

Em biotecnologia, a operação cromatográfica significa freqüentemente selecionar uma proteína ou peptídeo a partir de uma alimentação complexa, tal como caldo proveniente da fermentação. Os métodos cromatográficos são diversos, e a maioria pode ser modificada para ajustar um objetivo particular. As proteínas podem ser separadas da solução devido ao tamanho, forma, grupos hidrofóbicos e solubilidade. Proteínas também podem ser purificadas através de interações de superfície bioespecíficas. A cromatografia por afinidade, baseada neste fenômeno de superfície fornece uma purificação muito específica (Knight, 1989).

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra move-se através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes (Collins, 1995).

Na cromatografia, o fluido com múltiplos componentes é separado em soluções de soluto puro (ou aproximadamente). Moléculas, tais como proteínas, têm tendência variada de serem adsorvidas em materiais como amido, terra diatomácea e gel de poliacrilamida. Cada proteína move-se a uma velocidade efetiva que irá diminuir à medida em que a propensão da proteína ser adsorvida aumenta (Bailey & Ollis, 1986).

Chase (1984 b) coloca que, se a ligação do produto desejado (adsorbato) no suporte (adsorvente) é suficientemente forte, os demais compostos da mistura de alimentação podem

ser lavados sem perda de adsorbato. Ao alterar-se as condições físico-químicas, o adsorbato pode ser subsequenteiramente removido do adsorvente. Este estágio é conhecido como eluição ou dessorção. Após a eluição, o adsorvente pode ser regenerado e usado em outro ciclo de operação.

2.3.1.1 Classificações da cromatografia

A classificação mais importante segundo Collins (1995), baseia-se nos mecanismos de separação, que podem ser físicos, químicos ou mecânicos.

- a) Físicos: sorção (adsorção ou absorção). Baseados em atrações eletrostáticas ou dipolares (forças de Van der Waals), incluindo pontes de hidrogênio.
- b) Químicos: cromatografia de troca iônica e de afinidade. No primeiro caso, tem-se trocadores aniônicos com sítios ativos carregados positivamente, retendo ânions, e os trocadores catiônicos, com sítios ativos carregados negativamente que retêm cátions. No segundo caso, tem-se grupos com especificidade biológica, quimicamente ligados às matrizes.
- c) Mecânico: cromatografia por exclusão. A fase estacionária é uma matriz de composição inerte. As moléculas são separadas porque as menores penetram nos poros da fase estacionária.

Exemplos dos mecanismos citados podem ser vistos na figura 2.2.

Conforme Freitag & Horváth (1995), a cromatografia de adsorção é baseada na distribuição de cada substância entre a fase estacionária e a fase móvel devido a interações entre os componentes e a superfície cromatográfica.

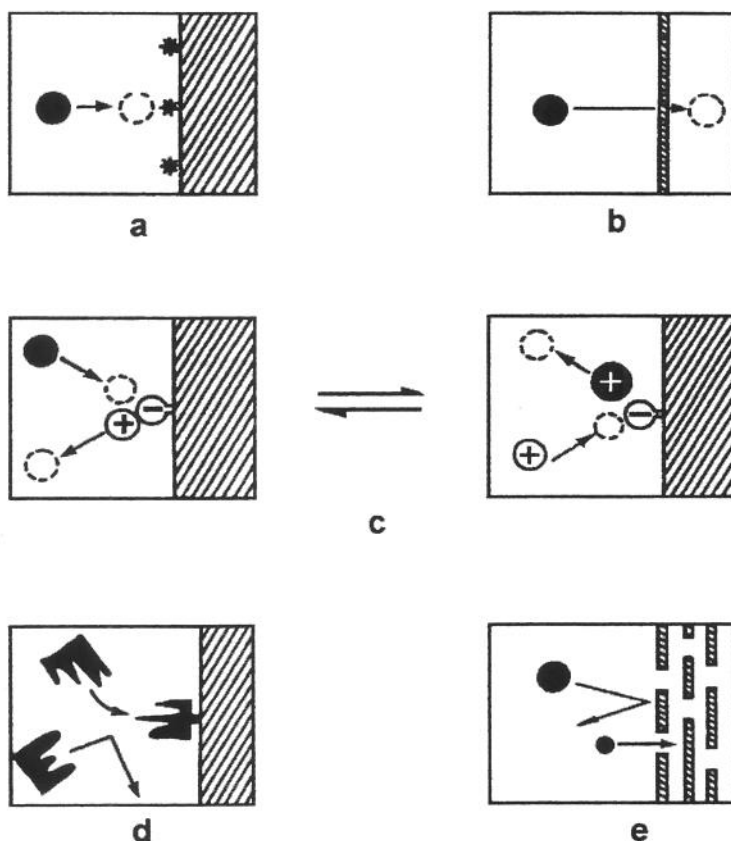


Figura 2.2: Esquema dos mecanismos de a: adsorção, b: partição, c: troca iônica, d: bioafinidade e e: exclusão (Collins, 1995).

A cromatografia de adsorção é baseada na interação do composto com a superfície por forças de Van der Waals. Este método é frequentemente usado para isolamento e purificação de produtos de fermentação lipofílicos ou hidrofílicos (Voser, 1982).

Quando a fase estacionária é um líquido espalhado na superfície de um suporte sólido e inerte, ou nas paredes do tubo cromatográfico, o processo é intrafacial, ocorrendo por absorção, ou partição, e que se baseia nas diferentes solubilidades dos componentes da amostra na fase estacionária. A volta dos componentes à fase móvel depende de sua volatilidade (fase móvel gasosa) ou de sua solubilidade nesta fase (fase móvel líquida) (Collins, 1995).

Na cromatografia por troca iônica, a solução com o composto desejado passa através de uma coluna contendo a resina de troca iônica. A resina pode ser catiônica ou aniônica. A proteína ficará ligada à resina através de forças eletrostáticas. Após, a coluna é

lavada com um tampão de maior força iônica, o que causa primeiro a liberação de proteínas fracamente ligadas, seguido da liberação das moléculas firmemente ligadas, o que permite separá-las. Os efluentes (eluentes) obtidos por lavagem são então coletados em pequenas frações sob diferentes condições (Bailey & Ollis, 1986).

A base da cromatografia por afinidade é uma interação entre grupos ligados à fase sólida, chamada ligante, e à molécula que se deseja purificar. O ligante é fixado covalentemente à fase sólida ou matriz. Quando a mistura de componentes passa através da coluna, somente o composto que possui afinidade biológica ao ligante imobilizado será fixado; os contaminantes, sem afinidade, são lavados da coluna (Singh & Singh, 1996).

Conforme reportado por Bjurstrom (1985), a cromatografia de exclusão é uma técnica que separa proteínas moleculares com base no tamanho. O método foi usado inicialmente durante os anos 50. A técnica é baseada no princípio de que pequenas moléculas irão penetrar a estrutura porosa do meio gel em maior extensão do que moléculas maiores, tendo desta forma um tempo de retenção mais longo.

Dentre os vários métodos cromatográficos de purificação Blanch & Clark (1997) apresentam algumas características e aplicações na purificação de produtos biológicos (tabela 2.1)

2.3.2 Cromatografia por troca iônica

Na cromatografia por troca iônica, a fase estacionária é altamente carregada, sendo que solutos com cargas de sinal contrário a esta são seletivamente adsorvidos da fase móvel. Os solutos adsorvidos podem ser subsequentelemente eluídos, por deslocamentos com outros íons, com o mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação com a fase estacionária (Collins, 1995).

Tabela 2.1: Métodos cromatográficos para a purificação de produtos biológicos (adaptado de Blanch & Clark, 1997)

Mecanismo de separação	Tipo de cromatografia	Características	Aplicação
Carga	Troca iônica	A resolução pode ser alta Capacidade é elevada Velocidade pode ser alta dependendo da matriz	É o método mais largamente utilizado. É mais efetivo nos estágios iniciais quando largos volumes são manuseados. Pode ser utilizado em modo batelada.
Interações de Van der Waals	Interação hidrofóbica	Resolução é boa Capacidade é boa Velocidade é alta	Pode ser aplicado em qualquer estágio, mas é mais aplicado quando a força iônica é alta (após troca iônica ou precipitação salina). Possibilidade de alguma desnaturação. Pode envolver orgânicos durante a eluição.
Tamanho e forma	Filtração em gel	Resolução moderada para fracionamento. Bom para troca de tampão e dessalinização. Capacidade relativamente baixa, mas é possível altas vazões com alguns tipos de empacotamento.	Fracionamento é melhor para os últimos estágios de purificação quando a alimentação é menor. Tampão pode ser trocado em qualquer momento.
Afinidade biológica	Afinidade	Seletividade pode ser alta. Capacidade pode ser alta dependendo do ligante. Velocidade é alta	Pode ser utilizado em qualquer estágio, mas os materiais são caros; melhor é utilizar quando as proteínas alimentadas e as substâncias que entopem tenham sido previamente reduzidas por métodos mais econômicos.

Na maioria dos processos, o passo inicial para purificação de proteínas envolve cromatografia de troca iônica. As condições de eluição são brandas, geralmente gradiente salino a pH neutro na presença de detergente não iônico, que preservam a atividade biológica do componente sujeito à cromatografia de troca iônica (Knight, 1989).

Freitag & Horváth (1995) colocam que a cromatografia de troca iônica é a tecnologia mais largamente utilizada no preparo de proteínas seja em escala de laboratório ou de produção. A recuperação da atividade biológica é usualmente excelente. Na eluição, o controle do pH da fase móvel é muito importante visto que tanto a carga líquida da proteína como a carga superficial dos trocadores iônicos fracos são dependentes do pH.

2.3.2.1 Matriz e grupos trocadores

A matriz de um trocador é constituída de um material poroso, natural ou sintético, insolúvel em água e em solventes orgânicos, apresentando ligações covalentes a grupos trocadores iônicos. As matrizes, quanto ao material que as formam, são classificadas em inorgânicas e orgânicas, sendo naturais ou sintéticas.

Os tipos de grupos ligados à matriz classificam os trocadores iônicos em fortes, médios e fracos. Os trocadores iônicos fortes são aqueles completamente ionizados em grande faixa de pH. A tabela 2.2 apresenta alguns tipos de trocadores baseados em polímeros naturais (Collins, 1995).

Hjorth *et alii* (1995) testaram a resina STREAMLINE® DEAE e STREAMLINE SP da Pharmacia em um leito expandido e compararam com um adsorvente convencional à base de agarose (SP Sepharose® Fast Flow). A resina STREAMLINE foi desenvolvida para utilização em leito expandido. A base da matriz é agarose e quartzo cristalino, cuja vantagem é a alta biocompatibilidade da agarose e seus derivados e o aumento necessário da densidade para o uso eficiente em leito expandido. Com o adsorvente STREAMLINE, obtiveram menor expansão do leito comparado ao adsorvente de agarose, com o mesmo

tamanho de partícula (100-300 μm) e conteúdo de agarose (6%), permitindo assim o uso de maiores vazões.

Tabela 2.2: Exemplos de trocadores baseados em polímeros naturais. (Fonte: adaptada de Collins, 1995)

Tipo	Sigla	Denominação	Estrutura	Matriz	Exemplo	Fabricante
Ácido forte	SP	Sulfopropil	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-\text{H}^+$	Dextrano	SP-Sephadex	Pharmacia
Ácido fraco	CM	Carboximetil	$-\text{CH}_2-\text{COO}^-\text{H}^+$	Dextrano Celulose	CM-Sephadex Cellex-CM	Pharmacia Bio-Rad
Base forte	QAE	Diethyl-(2-hidroxi-3-propil) aminoetil	$-\text{C}_2\text{H}_4-\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{CH}_3\text{Cl}^-$	Dextrano Celulose	QAE-Sephadex Cellex-QAE	Pharmacia Bio-Rad
Base intermediária		Dimetilaminoetil e dimetilamino - hidroxietil	$-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ e $-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{C}_2\text{H}_4\text{OHCl}^-$	Epoxipoliamina	Bio-Rex5	Bio-Rad
Base fraca	DEAE	Diethylaminoetil	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{H}-(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{OH}^-$	Dextrano Agarose Agarose Celulose Celulose	DEAE-Sephadex DEAE-Sepharose DEAE-BioGelA DEAE-Sepharcel Cellex-D	Pharmacia Pharmacia Bio-Rad Pharmacia Bio-Rad
	ECTEOLA	Trietanolamina e outras aminas ligado à celulose através de cadeias poliglicóis	$-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_4\text{OH})_3\text{OH}^-$ e outros	Celulose	Cellex-E	Bio-Rad

As características das resinas STREAMLINE DEAE e STREAMLINE SP são apresentadas nas tabelas 2.3 e 2.4, respectivamente.

Tabela 2.3: Características da resina STREAMLINE DEAE. (Fonte: adaptada de Pharmacia Biotech, 1996)

Produto	Descrição
Tipo de troca	Fracamente aniônica
Grupo funcional	-O-CH ₂ CH ₂ -N ⁺ (C ₂ H ₅) ₂ H
Capacidade iônica	0,13 -0,21 mmol Cl ⁻ /ml de adsorvente
Porosidade	4 x 10 ⁶ daltons (proteínas globulares)
Matriz	Macroporosa, ligação cruzada, 6% de agarose e contendo quartzo cristalino central.
Forma da partícula	esférica, 100-300 µm
Tamanho médio da partícula	200 µm
Densidade média da partícula	aprox. 1,2 g/mL
Grau de expansão a 300 cm/h	2-3
pH de estabilidade	2-13
Faixa de trabalho	
Faixa de limpeza	
Estabilidade química	Todos os tampões aquosos normalmente utilizados -NaOH 1M -etanol 70% -solventes orgânicos Evitar -agentes oxidantes
Estabilidade física	a geração de finos em operação normal do leito expandido é desprezível. Evitar operações cisalhantes de drenagem, escoamento.
Capacidade de adsorção*	no mínimo 40 mg BSA/ml adsorvente
Estocagem	etanol 20%

*capacidade de ruptura; 15 cm de altura de leito sedimentado, 300 cm/h de fluxo, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5.

Tabela 2.4: Características da resina STREAMLINE SP. (Fonte: adaptada de Pharmacia Biotech, 1996)

Produto	Descrição
Tipo de troca	Fortemente catiônica
Grupo funcional	$-O-CH_2CHOHCH_2O-CH_2CH_2CH_2SO_3^-$
Capacidade iônica	0,17 -0,24 mmol H^+ /ml de adsorvente
Porosidade	4×10^6 daltons (proteínas globulares)
Matriz	macroporosa, ligação cruzada, 6% de agarose e contendo quartzo cristalino central.
Forma da partícula	esférica, 100-300 μm
Tamanho médio da partícula	200 μm
Densidade média da partícula	aprox. 1,2 g/ml
Grau de expansão a 300 cm/h	2-3
pH de estabilidade	3-13
Faixa de trabalho	
Faixa de limpeza	
Estabilidade química	Todos os tampões aquosos normalmente utilizados -NaOH 1M -etanol 70% -solventes orgânicos Evitar -agentes oxidantes -exposição longa (1semana, 20°C) a pH<4
Estabilidade física	a geração de finos em operação normal do leito expandido é desprezível. Evitar operações cisalhantes de drenagem, escoamento.
Capacidade de adsorção*	no mínimo 60 mg lisozima/ml adsorvente
Estocagem	acetato de sódio 0,2M em etanol 20%

*capacidade de ruptura; 15 cm de altura de leito sedimentado, 300 cm/h de fluxo, 50 mM fosfato de sódio, pH 7,5.

2.3.2.2 Purificação de inulinase

Kushi *et alii* (1996) obtiveram inulinase a partir de fermentação com *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16046. A enzima foi inicialmente dialisada e liofilizada, obtendo-se um fator de purificação de 10,2 vezes. Após a amostra passar por resina DEAE-Trisacryl, a

mesma foi novamente dialisada e liofilizada, com um fator final de purificação de 34 vezes. O tampão utilizado na cromatografia foi fosfato de sódio 5 mM e a eluição foi feita com gradiente salino de 0,3M.

Guerrero *et alii* (1995) produziram inulinase por fermentação com *K. marxianus* CDBB-L-278, em meio contendo 1% de inulina. As células foram separadas por centrifugação (3500 rpm, 10 min). A inulinase extracelular foi recuperada do sobrenadante por precipitação com acetona a 0°C, adicionando-se o solvente lentamente a 44% (v/v). O precipitado foi filtrado através de filtro de papel e então suspenso em tampão acetato (0,01 M, pH 5,0) e dialisado contra o mesmo tampão por 24 horas a 4°C.

A inulinase produzida por Gupta *et alii* (1994) foi obtida através de *K. fragilis* (NCIM 3217). O meio após fermentação foi centrifugado a 4°C e ao sobrenadante frio, foram adicionados 2 volumes de etanol (95%). O precipitado foi coletado por centrifugação e então dissolvido em tampão acetato de sódio 50 mmol/dm³ (pH 5,4). A inulinase foi posteriormente purificada em Sephadex G 200, DEAE - celulose e CM - celulose. Após a precipitação com etanol e passagem nas colunas, o fator de purificação foi de 26,5 vezes para a inulinase. A enzima da coluna contendo DEAE - celulose foi eluída com 0,1 mol/dm³ de tampão acetato de sódio (pH 5,4).

Pessoa *et alii* (1996) purificaram inulinase, obtida por fermentação com *Candida kefyr*, em coluna contendo STREAMLINE DEAE. Verificaram que o pH mais apropriado foi entre 6,5 e 7,5; utilizando tampão Tris - HCl (20 mM). A eluição foi realizada com NaCl 0,5 M em tampão. Nos testes em leite expandido, obtiveram uma purificação de 5,8 vezes.

A inulinase obtida por fermentação com *Kluyveromyces fragilis* ATCC 12424 foi purificada por Grootwassink & Fleming (1980) através de autólise (13h, 50°C, pH 5-6), seguido de ultrafiltração e precipitação com acetona, obtendo 83% de rendimento e um fator de purificação de 6 vezes.

Santos (1998) trabalhando com inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus* purificou a enzima através de precipitação em etanol 70%, ressuspensão do precipitado em tampão fosfato 0,05 M, pH 5,2 e posterior passagem da amostra em coluna de troca aniônica Q-

Sepharose Fast Flow. A eluição da enzima foi feita com gradiente salino em tampão fosfato 0,05M pH 7,5. Ao final, o fator de purificação foi de 9,2 vezes e a recuperação da enzima de 52%.

Através da análise dos trabalhos relatados na literatura sobre a purificação de inulinase, observou-se que na maioria deles, várias etapas de recuperação e purificação são realizadas para a obtenção da enzima purificada, processos estes que encarecem o valor do produto final. Assim, alternativas como o uso de leito expandido, que elimina etapas preliminares pela utilização direta do caldo bruto, possui um apelo industrial muito promissor e atraente, pois reduz o tempo total de processo (ganhos de produtividade), bem como conduz a um aumento da eficiência global.

2.3.3 Adsorção em coluna de leito expandido

2.3.3.1 Generalidades

Adsorção em leito expandido é uma operação unitária de recuperação de bioprodutos presentes em caldos brutos não clarificados. Em processos em que o produto é extra celular, esta operação ocorre logo após a fermentação, e no caso de intracelular logo após a ruptura das células (Snow, 1994).

Tradicionalmente, a adsorção de proteínas a partir de meios fermentados é feita em leito fixo (adsorção), onde o líquido precisa passar por um tratamento prévio para remoção de particulados. A aplicação de uma alimentação contendo particulados em leitos fixos convencionais de adsorvente, resulta em severos problemas operacionais como resultado da retenção de particulados no leito. Estes problemas proporcionam um aumento na queda de pressão através do leito e a formação de uma torta na entrada. No caso da utilização de leitos expandidos, o caldo bruto resultante da fermentação pode ser utilizado diretamente, sem clarificação prévia, com o material particulado passando através do leito sem ser retido, conforme pode ser observado na figura 2.3 (Chase & Draeger, 1992). Além disto, este

processo resulta em um número menor de passos e pode conduzir a menores perdas do produto desejado.

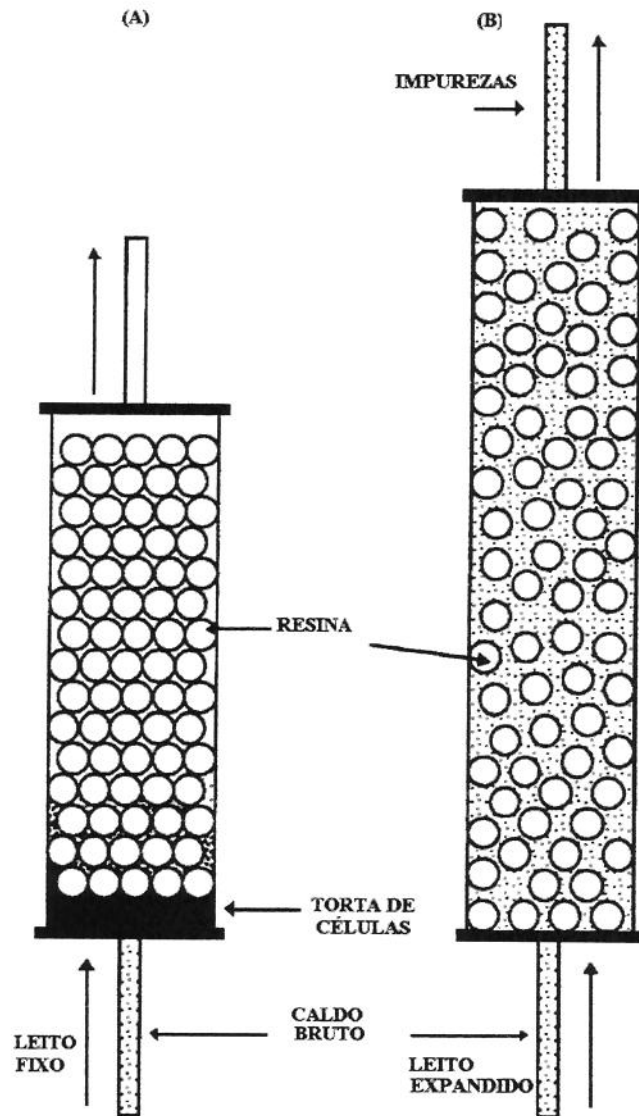


Figura 2.3: Princípio do uso de leito expandido para adsorção de proteínas na presença de particulados. O esquema mostra a formação de torta de células quando se trabalha com leito fixo (A) e a ausência de tal problema quando leito expandido é utilizado (B) (adaptado de Chase & Draeger, 1992).

2.3.3.2 Processo de adsorção em leito expandido

Conforme exposto por Chang *et alii* (1993), a sequência de eventos na operação de um leito fixo e de um processo de purificação utilizando leito expandido são similares. Primeiramente, há um estágio de contato entre adsorvente e adsorbato. Se isto ocorre em um leito expandido, é importante determinar as características de expansão do leito: como a altura do leito varia com a vazão do líquido de entrada e como esta expansão é afetada quando soluções contendo particulados são usadas. Em segundo lugar, existe o questionamento se o processo de adsorção difere quando ocorre em um leito expandido. Este aspecto é convenientemente abordado determinando-se a curva de ruptura. Num terceiro momento, verifica-se como o processo de adsorção ocorre na presença de células.

A figura 2.4 (adaptada de Frej *et alii*, 1994) apresenta o princípio básico de adsorção em leito expandido. O leito é primeiramente estabilizado com uma solução tampão, quando isto ocorre, passa-se o caldo bruto, não clarificado, na mesma vazão que permitiu a estabilização. Segue-se então uma lavagem com tampão até que a leitura a 280 nm retorne a linha base, a bomba é então desligada permitindo que o adsorvente assente. O adaptador é empurrado até o topo do leito e a eluição é iniciada.

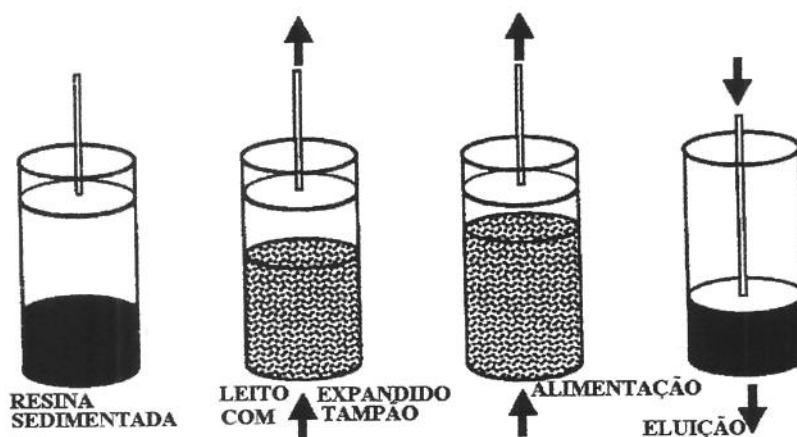


Figura 2.4: Princípio básico da adsorção em leito expandido. As quatro colunas mostram os diferentes estágios de operação. A seta indica a direção do escoamento (adaptado de Frej *et alii*, 1994).

Chang *et alii* (1993) reportam que é melhor utilizar, para a etapa de lavagem, o tampão juntamente com 25% de glicerol, o que promove a retirada de células sem desestabilizar o leito. Os experimentos foram feitos em leito expandido de “Protein A Sepharose Fast Flow” para remoção de células de levedura.

Chang & Chase (1996) relatam que é vantajosa a operação do leito expandido a um constante grau de expansão quando se trabalha com uma alimentação viscosa, ao invés de manter a alta velocidade constante (300 cm/h), o que levaria a um grau de expansão de 4 a 6 vezes. As razões apresentadas são:

- a) Aumento da capacidade dinâmica. O procedimento de adsorção irá permitir maior captura da proteína desejada.
- b) No processo real, a alta concentração de sólidos é mais compatível com este procedimento.

Johansson *et alii* (1996) ressaltam que, para um processo efetivo, ou seja, à formação de um leito expandido estável, diversos fatores são importantes, como viscosidade, força iônica, conteúdo de sólidos, pH e vazão de alimentação.

2.3.3.3 Estudos de adsorção em leito expandido

Chase & Draeger (1992) estudaram o desempenho de um leito expandido utilizando sistema de adsorção por afinidade, com e sem a presença de células. O sistema consiste na adsorção de imunoglobina G (hIgG) em “Protein A Sepharose Fast Flow”. Para verificar o efeito da presença de células, utilizaram *Saccharomyces cerevisiae*. Realizaram também experimentos com adsorção de albumina de soro bovino (BSA) em Q-Sepharose Fast Flow, para demonstrar o benefício de usar um sistema altamente seletivo de modo a minimizar a interferência pelas células no desempenho de adsorção.

Os autores acima citados verificaram pouca diferença nas isotermas de adsorção para hIgG na presença ou não de células. O mesmo não ocorreu no sistema menos seletivo, para adsorção de BSA, pois os resultados mostraram uma menor capacidade de adsorção na

presença de células. As isothermas para adsorção de proteína foram, nestes casos, adequadamente descritas pela isoterma do tipo de Langmuir. A presença de células, em testes batelada, também teve pouco efeito no coeficiente de transferência de massa e na difusividade efetiva para o sistema seletivo, o mesmo não ocorrendo no sistema de troca iônica. Examinando a adsorção de imunoglobina G (hIgG) em “Protein A Sepharose Fast Flow” em uma coluna de 2 cm de diâmetro, verificaram que, usando uma expansão de 3 a 4 vezes em relação ao volume sedimentado, há pouca ou nenhuma diferença na adsorção de proteína comparando com o sistema de leito fixo com curvas de ruptura praticamente idênticas. Isto sugere que modelos para predizer o desempenho da fase de adsorção em leito fixo, podem ser utilizados para a adsorção em leito expandido, desde que levada em conta a maior porosidade. Medidas de curvas de ruptura na presença de células indicaram que a adsorção de hIgG decresceu um pouco em eficiência conforme aumentava a concentração celular.

O estudo da adsorção em leito expandido para recuperação de Annexin V recombinante de homogêneo de *Escherichia coli* não clarificado foi realizado por Frej *et alii* (1994), através de testes de otimização em escala laboratorial, utilizando resina STREAMLINE® DEAE. A avaliação da eficiência de recuperação de annexin V foi feita através do rendimento, expresso como uma percentagem de annexin V na eluição pelo produto na alimentação. Os autores obtiveram um rendimento maior que 95%. As células foram separadas após a fermentação, estocadas a -70°C e ressuspensas na concentração desejada e só então homogeneizadas. Os autores estudaram o efeito da concentração celular e da viscosidade no desempenho de expansão do leito. Os melhores resultados foram obtidos com massa seca de até 5% e viscosidade na ordem de 10cP (taxa de cisalhamento de 1s^{-1}), podendo-se porém trabalhar com massa seca de até 7-8% e viscosidade de 50 cP (s^{-1}). No entanto, o fluxo teve que ser invertido em alguns momentos para evitar obstrução do adaptador.

Thömmes *et alii* (1995) trabalharam na purificação de anticorpo monoclonal. Previamente aos testes com leito expandido, determinaram os dados iniciais de capacidade do material adsorvente utilizando um modo fluidizado com reciclo (sistema batelada) e com o meio livre de células. Primeiramente determinaram o pH ótimo para adsorção do

anticorpo monoclonal, que foi 5,5 para a resina STREAMLINE-SP. Obtiveram a capacidade de anticorpo eluída por mililitro de adsorvente usado. Já nos testes com o meio contendo células e com o processo no modo frontal foram testados meios diluídos para verificar o efeito do decréscimo da força iônica na capacidade de adsorção. Verificaram que, para a resina STREAMLINE, é recomendada uma diluição (1:2) no pH ótimo. Utilizando 3 litros de meio contendo 60 mg de IgG2a total, diluído 1:2, obtiveram um eluente clarificado com o produto desejado a um fator de purificação de 8 vezes.

Uma técnica de purificação por afinidade de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) a partir de meio homogêneo de células de levedura não clarificado foi desenvolvida por Chang *et alii* (1995). Os autores utilizaram leito expandido de STREAMLINE Red H-7B. Verificaram o pH 6,0 como ótimo para operação, a partir de testes usando um leito fixo, num volume de 6,6 ml. Realizaram testes de eluição, utilizando diferentes concentrações de cloreto de sódio, constatando que 0,1M de NaCl poderia ser utilizado sem perda de G6PDH adsorvido. Usando β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato em eluição bioespecífica, escolheram como volume ótimo 15% do volume da coluna de 10 mM NADP em tampão. Em testes realizados numa coluna STREAMLINE 50 de leito expandido, utilizando material não clarificado, obtiveram 99% de rendimento e um fator de purificação médio de 103 vezes.

Johansson *et alii* (1996) trabalharam na purificação de proteína recombinante periplasmática. Verificaram que o processo com leito expandido utilizando resina STREAMLINE® DEAE foi 3 vezes mais rápido e não foi necessário clarificação em comparação com o processo convencional de leito fixo usando DEAE Sepharose Fast Flow. Além disso, a solução com proteína recuperada apresentou concentração 3 vezes maior e rendimento levemente superior. Durante o processo de adsorção o leito expandiu 5 vezes.

O estudo de purificação de β -galactosidase de *Scopulariopsis* foi realizado por Pereira *et alii* (1998) em coluna de leito fixo e de leito expandido utilizando resina Acell Plus QMA. No caso do leito expandido foi utilizado um grau de expansão de aproximadamente 3,0. Os autores obtiveram um rendimento de 92,4% e 83% e um fator de purificação de 3,2 e 2,2 para os leitos fixo e expandido respectivamente.

A purificação de inulinase, obtida de fermentação por *Candida kefyr*, em leito expandido foi estudada por Pessoa *et alii* (1996). Constataram que a adsorção na resina STREAMLINE® segue a equação de Langmuir. Não encontraram problemas com a passagem de células, e o leito não perdeu a estabilidade com a presença de sólidos. Obtiveram uma recuperação de 93% e um fator de purificação de 5,8 vezes. A capacidade dinâmica foi 62% do valor da máxima capacidade de adsorção.

2.3.3.4 Hidrodinâmica do leito

Quando se tem uma partícula adsorvente em uma coluna cromatográfica, para haver uma fluidização estável, as forças de interação partícula-fluido devem balancear o peso da partícula. Esta condição é encontrada, se a velocidade do líquido excede um valor mínimo, chamado velocidade mínima de fluidização. Neste caso, o estado estacionário é atingido quando a velocidade do líquido não aumenta acima da velocidade terminal da partícula fluidizada (u_t), ponto onde as forças excedem o peso da partícula e esta é lavada da coluna. A faixa de vazões que pode ser usada é dependente das propriedades da partícula fluidizada e do líquido fluidizante (Thömmes, 1997).

O conhecimento do comportamento do leito em função das propriedades físicas das partículas e do fluido é de fundamental importância para as operações usando leito expandido. Essa caracterização ocorre principalmente medindo-se a expansão do leito em função da velocidade do fluido. Usualmente, esta correlação é feita utilizando-se a equação de Richardson & Zaki (1954).

Para partículas esféricas rígidas homogêneas, estes autores propuseram que a relação entre a velocidade superficial do líquido (u) e a velocidade terminal (u_t) é dado pela equação abaixo:

$$\frac{u}{u_t} = \varepsilon^n \quad (2.1)$$

Onde:

ϵ é a porosidade do leito.

n é o coeficiente de Richardson-Zaki.

Pode-se determinar experimentalmente a velocidade terminal de uma partícula isolada (u_t) e o coeficiente de Richardson-Zaki (n) para um dado leito, se forem conhecidos os valores da porosidade para uma dada velocidade do fluido. Linearizando-se a equação 2.1 obtém-se uma relação entre a velocidade superficial do fluido (u) e a porosidade do leito (ϵ) na forma:

$$\log u = \text{Log } u_t + n \text{ Log } \epsilon \quad (2.2)$$

sendo o coeficiente angular igual a n e o coeficiente linear igual ao logaritmo de u_t

O índice de expansão ou índice de Richardson-Zaki n é uma função do número de Reynolds terminal (Re_t) e da relação entre o diâmetro da partícula e da coluna. O valor de n pode ser obtido pelas equações abaixo em função do número de Reynolds, de dp e de D_c (Dasari *et alii*, 1993):

$$n = 4,65 + 20 (dp/D_c) \quad (Re_t < 0,2) \quad (2.3)$$

$$n = 4,4 + 18 (dp/D_c) Re_t^{-0,03} \quad (0,2 < Re_t < 1) \quad (2.4)$$

$$n = 4,4 + 18 (dp/D_c) Re_t^{-0,1} \quad (1 < Re_t < 200) \quad (2.5)$$

$$n = 4,4 Re_t^{-0,1} \quad (200 < Re_t < 500) \quad (2.6)$$

$$n = 2,4 \quad (Re_t > 500) \quad (2.7)$$

onde:

dp é o diâmetro da partícula

D_c é o diâmetro da coluna

E Re_t é o Reynolds terminal dado pela expressão:

$$Re_t = \frac{u_t \rho_l d_p}{\mu_l} \quad (2.8)$$

onde:

ρ_l é a densidade do líquido

μ_l é a viscosidade do líquido

Outra importante caracterização do leito expandido, é a determinação do seu grau de expansão, número adimensional, que consiste na medida relativa da altura do leito expandido, para uma determinada vazão, com a altura do leito fixo do adsorvente. A figura 2.5 ilustra um exemplo do cálculo do grau de expansão do leito.

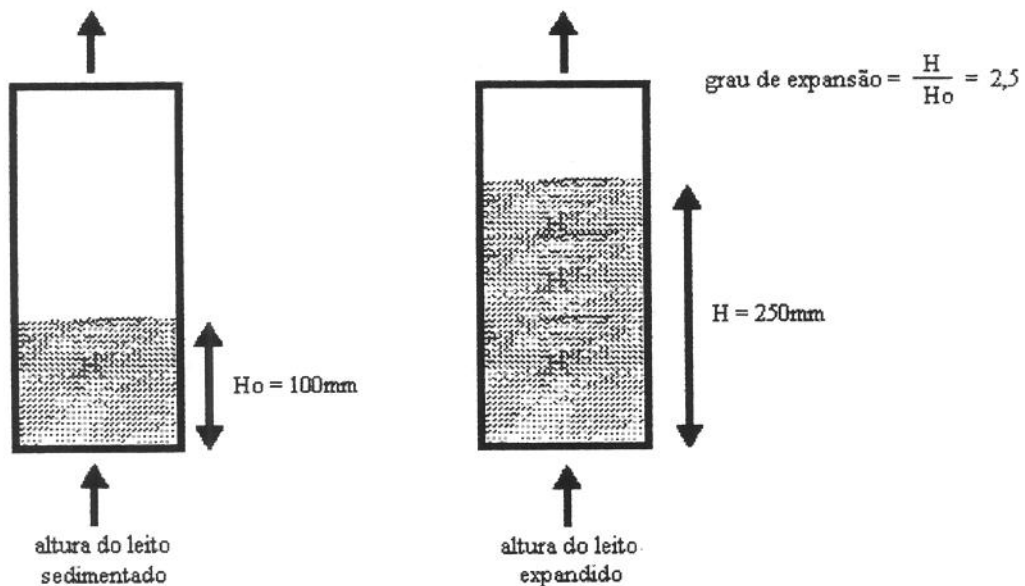


Figura 2.5: Definição do grau de expansão (adaptado de Pharmacia Biotech, 1996)

Logo o grau de expansão é dado pela seguinte equação:

$$\text{Grau de expansão} = \frac{H}{H_0} \quad (2.9)$$

Onde:

H é a altura de operação do leito expandido

H_0 é a altura do leito sedimentado

Em aplicações industriais, utilizando técnica de leito expandido, em caldos viscosos, pode ser desejável a aplicação de altas velocidades para minimizar o tempo de processamento (Chang & Chase, 1996). No entanto, deve-se avaliar a influência do grau de expansão, pois valor muito alto de H/H_0 conduz a uma menor capacidade de adsorção.

2.4 Teoria da adsorção

2.4.1 Processo de adsorção

Chase & Draeger (1992) salientam que, apesar das isotermas obtidas na adsorção de BSA na presença de célula, para um sistema de troca iônica, serem adequadamente descritas pelo tipo Langmuir, o mesmo pode não ocorrer na presença de multi-componentes.

Em cromatografia por troca iônica, a distribuição dos grupos iônicos na superfície do adsorvente é aleatória, e o sítio real de adsorção da proteína não é uma entidade única. Assim, o sítio de adsorção não pode ser tratado da mesma maneira como postulado para adsorção por afinidade. Entretanto, resultados experimentais de sistemas nos quais a proteína é adsorvida em um trocador iônico levam a uma isoterma que pode ser descrita como uma equação de Langmuir (Skidmore & Chase, 1990).

Conforme Thömmes (1997), as interações proteína-ligante devem ser independentes do espaço intersticial do leito adsorvente. Assim, a capacidade de equilíbrio de um adsorvente não será influenciada pela configuração experimental, como tanque agitado ou aplicação frontal para leito fixo ou fluidizado. A maior diferença provém do meio no qual a proteína é isolada. Os parâmetros operacionais que influenciam o equilíbrio de adsorção no

leito fluidizado são a concentração, a condutividade, o pH e a presença de partículas, como por exemplo as células.

2.4.2 Curva de ruptura

Yang & Tsao (1982) apresentam as três categorias em que a cromatografia é subdividida de acordo com a técnica usada no processo:

- a) Desenvolvimento de eluição: uma pequena quantidade de amostra é alimentada na coluna, então o eluente, que não tem afinidade com o adsorvente, é introduzido. A separação é atingida em forma de bandas. Esta técnica é a mais comumente usada para proposta analítica.
- b) Análise frontal: a amostra é continuamente alimentada na coluna até que a ruptura ocorre.
- c) Desenvolvimento de deslocamento: como na eluição, uma pequena amostra é alimentada na coluna então a eluição inicia. A única diferença com respeito ao item a) é que o eluente neste caso tem maior afinidade pelo adsorvente do que pela amostra. Componentes concentrados podem ser obtidos a partir de mistura diluída.

A determinação da concentração da solução efluente de um leito fixo ou fluidizado em função do volume de solução injetado ou da quantidade de proteína aplicada ao leito fornece curvas de ruptura (Cruz & Santana, 1996).

Segundo Belter *et alii* (1988), em uma coluna de adsorção o fluido contendo o soluto de interesse é passado através da mesma. Inicialmente, a maior parte do soluto é adsorvida, tal que a concentração na saída é baixa. Conforme a adsorção continua, a concentração na saída aumenta, vagarosamente no início, e então abruptamente, conforme se observa na figura 2.6. Quando esta ruptura ocorre, interrompe-se o fluxo. O material adsorvido é então eluído por lavagem do leito.

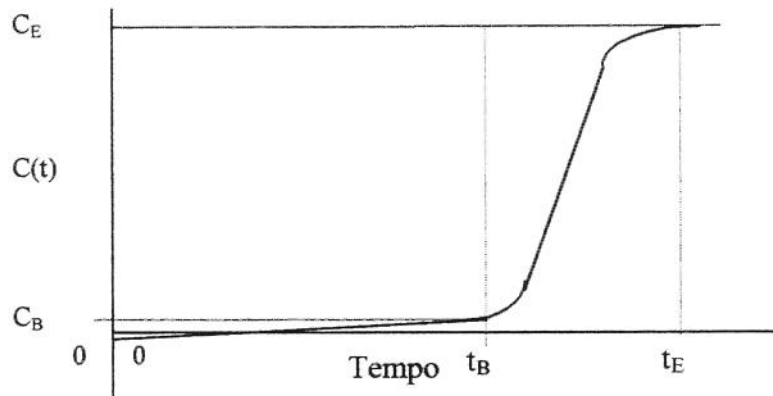


Figura 2.6: Curva de ruptura para adsorção em coluna de leito fixo (adaptado de Belter *et alii*, 1988)

onde:

C_B é a concentração de ruptura

C_E é a concentração de exaustão

C_B corresponde ao máximo que se pode descartar e C_E à concentração no eluente quando o leito é julgado ineficaz. Os autores sugerem C_B e C_E como 10 e 90 % da concentração de entrada.

Chase (1984a) afirma que é prática normal interromper a alimentação na coluna quando o nível de adsorbato na saída sobe acima de um certo nível. Se a alimentação continua, uma quantidade considerável do composto de interesse pode passar sem ser adsorvido. A quantidade de adsorbato que pode ser alimentada, antes que este nível exceda irá depender da forma da curva de ruptura. Pela figura 2.7 observa-se que dependendo das condições de operação, ter-se-á maior ou menor quantidade de material adsorvido.

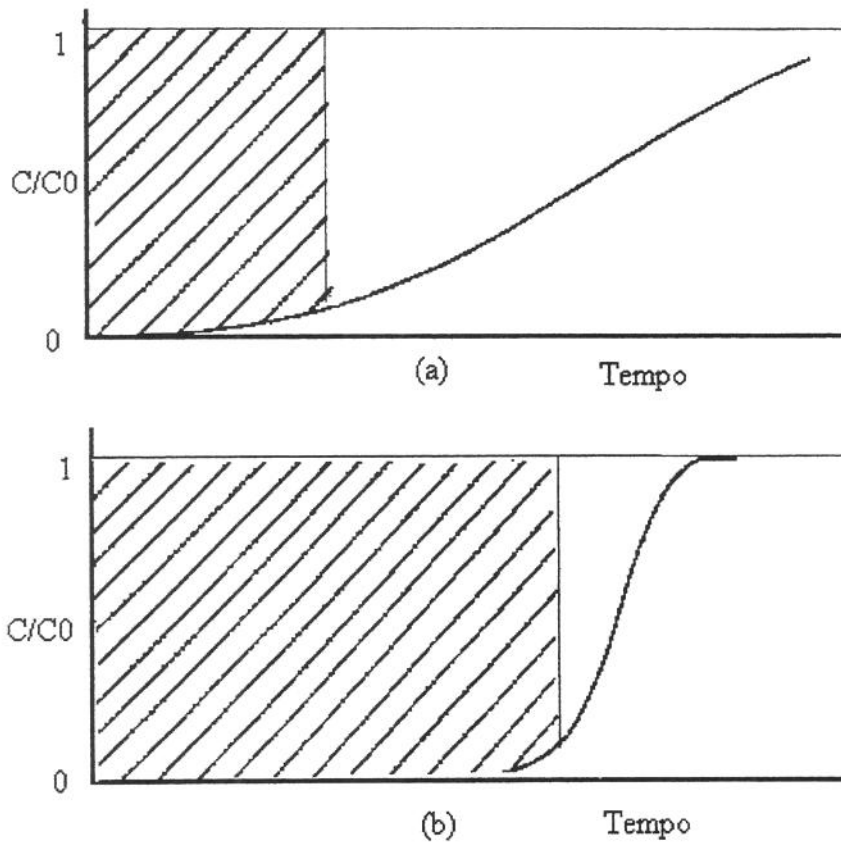


Figura 2.7: Influência da forma da curva de ruptura na performance de colunas de leito fixo. (a) curva que pode ser obtida em uma coluna (b) curva obtida na mesma coluna, com alteração das condições de operação. A área hachurada indica a quantidade de adsorbato que poderia estar ligada à coluna se a alimentação terminasse quando C/C_0 atingisse o valor de 0,1 (adaptado de Chase, 1984a).

Segundo Chase (1984b) o cálculo da eficiência do processo de adsorção é definido como:

$$\text{eficiência} = \frac{\text{quantidade adsorbato retido no leito} \times 100}{\text{quantidade adsorbato aplicado ao leito}} \quad (2.10)$$

Definindo-se o valor de ruptura quando a concentração de saída atinge 10% do valor inicial, tem-se verificado que a eficiência é maior quando:

- a) utiliza-se baixas vazões de alimentação;
- b) altas concentrações de adsorbato;
- c) maior capacidade total do leito; e
- d) menor densidade de ligante imobilizado.

2.5 Conclusão

Neste capítulo foram apresentados trabalhos referentes às etapas de produção, caracterização e purificação da enzima inulinase. Verificou-se que esta enzima tem merecido inúmeros estudos devido ao seu potencial de aplicação na indústria. Particularmente, o Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, vem trabalhando nesta linha de pesquisa há alguns anos, utilizando-se a enzima obtida do microrganismo *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045. No entanto, havia a necessidade de um estudo sistemático, como a metodologia do planejamento fatorial, para um incremento significativo na produção da enzima, cuja atividade enzimática estava na ordem de 9 a 13 U/mL para fermentações em batelada. Outra carência de estudos observada na literatura é a viabilidade de purificação da enzima inulinase diretamente do caldo bruto, em particular com o uso da resina STREAMLINE SP em leito expandido com potencial para aplicação industrial. Desta forma, neste trabalho procurou-se dar enfoque a estas necessidades, sendo a metodologia utilizada detalhada no capítulo a seguir.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são descritos os procedimentos utilizados para otimização da produção de inulinase e estudo da influência da concentração de substrato, pH e temperatura na atividade enzimática. Também são apresentadas as metodologias empregadas na purificação desta enzima, para tanto foram primeiramente determinados os parâmetros cinéticos em sistema batelada e condições de eluição em coluna de leito fixo, posteriormente a enzima foi purificada em coluna de leito expandido com resina de troca iônica. Todas as etapas desenvolvidas neste trabalho estão apresentadas na figura 3.1.

3.1 Otimização da produção da inulinase

Normalmente nas etapas de recuperação e purificação de uma enzima perde-se uma percentagem da atividade enzimática inicial. Assim, neste trabalho foi realizada uma etapa preliminar que consistiu na otimização da produção da inulinase e das condições ótimas de atuação da enzima (pH, temperatura e concentração de substrato). É importante relatar que, anteriormente à otimização do meio de cultura, a atividade enzimática estava ao redor de 10 U/mL e após a otimização este valor ficou entre 100 a 120 U/mL, conforme o lote da fermentação.

3.1.1 Preparo do inóculo

O microrganismo utilizado, *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045, anteriormente denominado *Kluyveromyces bulgaricus*, foi repicado de agar inclinado de extrato de malte e levedura para tubo de ensaio contendo caldo do mesmo meio, em um volume de 10mL. O meio foi incubado por 24 horas a 30°C. Cada tubo de ensaio serviu como pré-inóculo.

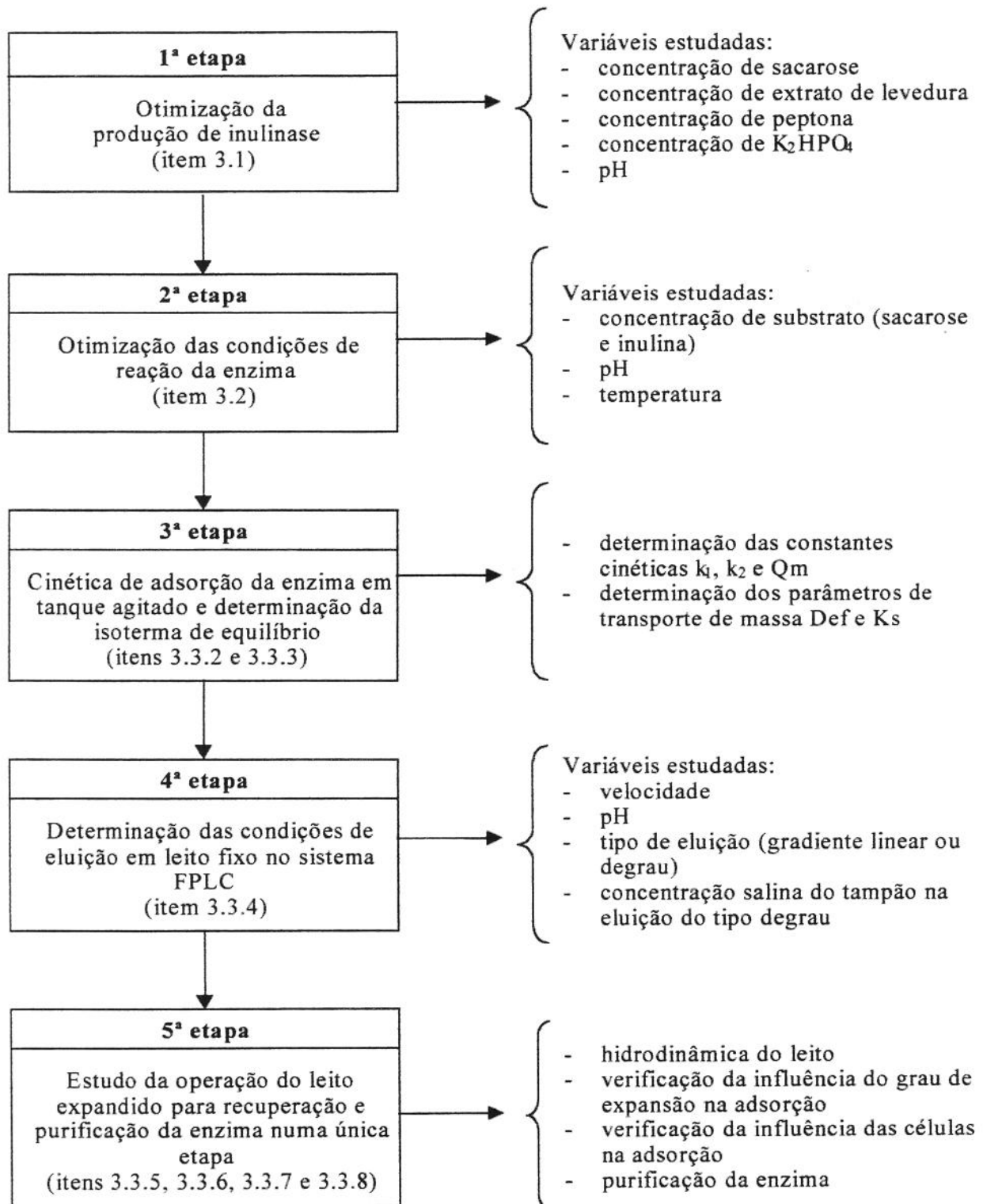


Figura 3.1 Fluxograma das etapas realizadas neste trabalho

A escolha deste microrganismo levou em consideração o fato do gênero *Kluyveromyces* possuir o “GRAS” (Generally Regarded Safe), que o faz aceito pelo FDA (Food and Drug Administration), sendo assim recomendável para utilização em alimentos (Hensing *et alii*, 1994). Além disto, o microrganismo já havia sido testado por Costa (1986) juntamente com outras doze leveduras, tendo apresentado a maior atividade enzimática, e por Santos (1998) com outras duas espécies do mesmo gênero, tendo o *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 apresentado a maior atividade enzimática e cuja enzima forneceu maior produtividade na formação de oligossacarídeos.

O meio para obtenção do inóculo é apresentado na tabela 3.1.

Tabela 3.1: Meio utilizado para obtenção do inóculo

Componente	Quantidade (g/l)
Sacarose	20
Extrato de levedura	5
K ₂ HPO ₄	5
NH ₄ Cl	1,5
KCl	1,15
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,65
Santos (1998)	

O pH do meio foi ajustado para 6,5 e preparados erlenmeyers aletados de 500ml contendo 100ml do mosto. A esterilização foi feita a 121°C por 15 minutos. Foram adicionados a cada frasco 10mL de pré-inóculo, e posteriormente o meio foi incubado por 24 horas a 30°C e 150 rpm.

3.1.2 Planejamento experimental

Em processos bioquímicos geralmente se observa a influência de multivariáveis, onde a importância de cada variável deve ser determinada. Portanto, a otimização é uma

ferramenta útil de trabalho para a melhor compreensão do sistema, permitindo a análise individual do efeito de cada variável na resposta desejada.

Até a última década, o termo otimização de processo consistia no estudo de uma variável (estudo univariável) por vez mantendo as outras constantes, dificultando grandemente a discussão dos resultados, além do tempo gasto, material, e principalmente da falta de conclusão baseada numa metodologia científica. A maior falta de informação no estudo univariável relacionou-se ao efeito sinérgico ou antagônico entre as variáveis, que só puderam ser obtidas pela determinação dos efeitos de interação entre as variáveis através de um planejamento fatorial. Uma outra vantagem do planejamento fatorial foi a possibilidade de otimizar várias respostas ao mesmo tempo.

Para se aplicar o método de análise de superfície de resposta é necessário primeiramente programar ensaios através de um planejamento fatorial. Esse método consiste na seleção de um número fixo de níveis para cada um dos fatores ou variáveis de entrada e então executar experimentos com todas as combinações possíveis. Como primeira etapa, é usual um planejamento fatorial com dois níveis (nível -1 e nível +1) para cada variável. Assim, para “s” variáveis envolvidas no estudo, o número de experimentos que deve ser realizado para investigar todas as combinações possíveis é igual a 2^s (Box *et alii*, 1978).

Com os resultados obtidos do planejamento, é possível avaliar os efeitos principais e de interações das variáveis sobre a resposta, determinar quais são os efeitos mais significativos e ajustar empiricamente um modelo linear ou de 1ª ordem, correlacionando as variáveis com a resposta.

Se o modelo de 1ª ordem não apresentar uma boa correlação com os dados experimentais, é possível completar o planejamento fatorial inicial realizando-se mais 2 s ensaios segundo configuração “estrela”, obtendo-se assim um modelo quadrático ou de 2ª ordem.

Uma particularidade muito importante em processos bioquímicos é o grande número de variáveis envolvidas. Nesse caso, poder-se-ia optar por um “screening” de variáveis,

antes do planejamento completo, através de um planejamento fatorial fracionado. No caso de 5 variáveis, é interessante a execução de um 2^{5-1} , ou seja, 16 ensaios, mais os pontos centrais. O planejamento é reduzido pela metade quando comparado com o completo, sendo possível avaliar a importância das variáveis na resposta. Assim, este procedimento é muito interessante em termos qualitativos, mas não se deve, a partir de um planejamento fracionado, otimizar o processo. Isto porque os efeitos principais, na verdade “contrastes”, estão confundidos com interações de 2ª ou 3ª ordem ou superiores, conforme o tipo de resolução do fracional (Rodrigues *et alii*, 1998).

3.1.2.1 Planejamento fatorial fracionado

Neste trabalho foi realizado um planejamento fracionado envolvendo 5 variáveis (2^{5-1} ensaios mais 3 pontos centrais), obtendo-se como resposta a atividade de inulinase. As variáveis independentes foram: concentração de sacarose, de extrato de levedura, de peptona, de K_2HPO_4 e o pH (tabela 4.1 e 4.2). As variáveis selecionadas foram estudadas em um posterior planejamento fatorial completo.

Os ensaios foram realizados em frascos erlenmeyers aletados de 500ml com 100 ml do meio a ser estudado. A temperatura foi mantida em 30°C em shaker PSYCROTHERM (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, N.J.) com rotação de 150 rpm. A cada frasco foi adicionado 10% de inóculo. A resposta foi avaliada no tempo de 24 e 48 horas. As condições dos ensaios realizados e seus resultados estão no próximo capítulo, item 4.1.1.

3.1.2.2. Planejamento fatorial completo

Após a escolha das variáveis através do planejamento fatorial fracionado, foi realizado o planejamento fatorial completo (2^3 ensaios mais 6 pontos axiais e 3 pontos centrais), que definiu o meio a ser utilizado na produção de inulinase para posterior aplicação.

Tal planejamento envolveu 3 variáveis: concentração de sacarose, de extrato de levedura e de peptona (tabela 4.4 e 4.5). O K_2HPO_4 foi mantido na concentração constante de 1g/L e o pH permaneceu em 3,5.

Os ensaios foram realizados nas mesmas condições do planejamento fracionado. Além da atividade enzimática, nas 48 horas de fermentação foi verificada a concentração de sacarose e massa seca. As condições dos ensaios realizados e seus resultados estão no próximo capítulo, item 4.1.2.

3.1.3 Dinâmica de produção da inulinase

As condições otimizadas (sacarose, 14g/L; peptona, 20 g/L; extrato de levedura, 10 g/L, KH_2PO_4 , 1 g/L e pH 3,5), determinadas através do planejamento fatorial completo foram utilizadas para uma fermentação conduzida em triplicata. A atividade e o pH foram determinados ao longo do tempo, já que no planejamento fatorial fracional e completo foram realizados 19 e 17 ensaios simultâneos respectivamente, inviabilizando análises de atividade em períodos mais curtos do que 24 horas.

3.2 Estudo da influência da concentração de substrato, pH e temperatura na determinação da atividade enzimática da inulinase

3.2.1 Produção da enzima

Para produção da enzima utilizou-se as condições estabelecidas no item 3.1, trabalhando-se já com o meio otimizado.

3.2.2 Planejamento experimental

Inicialmente foram realizados dois planejamentos experimentais de 1ª ordem, 2³ e 3 pontos centrais (11 ensaios) para verificar o efeito na atividade enzimática da concentração de sacarose, pH e temperatura para o primeiro planejamento e da concentração de inulina, pH e temperatura para o segundo planejamento (tabelas 4.9, 4.10 e 4.12)

As variáveis pH e temperatura foram selecionadas para a realização de mais dois planejamentos completos (2² ensaios mais quatro pontos axiais e 3 pontos centrais) utilizando-se no terceiro a sacarose e no quarto a inulina como substrato (2% (m/v) de concentração) (tabelas 4.14 e 4.15).

As condições dos ensaios dos quatro planejamentos realizados e seus resultados estão no próximo capítulo, item 4.2.

3.3 Purificação da Inulinase

A enzima inulinase foi empregada para a realização de ensaios cinéticos e de equilíbrio utilizando-se resina de troca iônica. Através dos dados experimentais de adsorção e mediante modelagem matemática foram obtidos os parâmetros cinéticos (k_1 e k_2) e os de transporte, difusividade (Def) e coeficiente de transferência de massa (K_s). A purificação da enzima foi feita inicialmente em coluna de leito fixo, para estabelecer algumas condições de operação e, como etapa final, a purificação foi realizada em coluna de leito fluidizado utilizando o processo de operação cromatográfica frontal, onde foi realizada a medição de concentração do adsorbato na saída do leito em função do volume coletado.

3.3.1 Resina adsorvente

Em todos os ensaios foi utilizada a resina catiônica STREAMLINE SP da Pharmacia, acondicionada em etanol 20% com 0,2 M de acetato de sódio. Ao início de cada

teste a resina era lavada com água destilada e posteriormente com tampão acetato de sódio 0,02 M pH 3,5 até o equilíbrio.

Esta resina foi selecionada por ser apropriada para utilização em leito expandido (Hjorth *et alii*, 1995). A opção por uma resina catiônica se deu em função das células terem em geral uma carga líquida negativa não chegando a competir assim com a proteína de interesse (Thömmes, 1997). Outro ponto é que Pessoa *et alii* (1996), trabalhando na adsorção de inulinase, obteve, através de isothermas, uma quantidade máxima de enzima adsorvida (Q_m) superior para a resina STREAMLINE SP que para a resina aniônica STREAMLINE DEAE.

3.3.2 Cinética de adsorção

O sistema para obtenção das curvas cinéticas consistiu de um vaso encamisado acoplado a um banho de recirculação externa (banho Tecnal modelo TE-184) para controle de temperatura. A homogeneização da mistura no vaso foi feita através de um agitador mecânico.

Adicionou-se 5 mL da suspensão de resina em tampão acetato 0,02 M pH 3,5 (1:4) ao vaso encamisado contendo 50 mL de caldo fermentado clarificado, puro ou convenientemente diluído. O cronômetro foi imediatamente acionado. A mistura foi agitada mecanicamente a 175 rpm e mantida a 25°C através do banho de recirculação externo. Aliquotas da mistura foram periodicamente removidas do reator, imediatamente filtradas para retirar a resina e a seguir analisada a atividade da parte solúvel, construindo-se um gráfico de atividade final sobre inicial (C/C_0) em função do tempo. As amostras foram inicialmente retiradas em intervalos de tempo menores e estenderam-se até 150 minutos.

As condições de cada ensaio são descritas na tabela 3.2. Nos três ensaios utilizou-se o mesmo caldo. Após a fermentação, o meio foi centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos (centrífuga sorvall RC 26 plus da Dupont), separado em frascos de 100 mL e congelado a -18°C. Para utilização nos testes de obtenção das curvas cinéticas o caldo foi descongelado

sob refrigeração e posteriormente corrigido o pH com ácido acético 2M. O meio foi mantido em banho de gelo durante a correção do pH para minimizar a desnaturação da enzima.

Tabela 3.2: Condições dos ensaios cinéticos de adsorção

Conteúdo do reator	Ensaio		
	A	B	C
Caldo bruto clarificado pH 3,5	22,5 mL	30 mL	50 mL
Tampão acetato 0,02 M	27,5 mL	20 mL	-
Mistura 1:5 da resina Streamline SP e tampão acetato 0,02 M pH 3,5	5 mL	5 mL	5 mL
Atividade inicial do caldo	19,95 U/mL	28,57 U/mL	51,28 U/mL

3.3.3 Isotermas de adsorção

Para obtenção da isoterma de adsorção foram realizados ensaios em batelada. Inicialmente foram preparadas soluções com o caldo bruto clarificado para obtenção de diferentes atividades iniciais. Estas diluições foram feitas em tampão acetato 0,02 M pH 3,5 e medida a atividade resultante de cada uma. O caldo bruto utilizado para obtenção da isoterma foi o mesmo descrito no item 3.3.2.

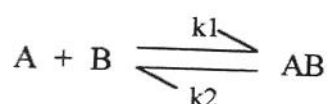
Em diferentes frascos distribuiu-se 1 mL da solução resina-tampão acetato 0,02 M pH 3,5 (1:4) e 10mL da solução enzimática convenientemente diluída. Os frascos foram selados e mantidos a 25°C e 175 rpm por duas horas, tempo necessário para o equilíbrio determinado no item anterior. Esta etapa foi realizada em shaker Psycrotherm da New Brunswick Scientific. Os ensaios foram feitos em duplicata para cada diluição. Foi também realizado um branco para cada diluição de modo a verificar se não ocorria desnaturação da enzima durante este processo. Ao branco não era adicionada resina.

Após o equilíbrio, a amostra foi filtrada e feita a análise de atividade da fase solúvel para cada frasco. A quantidade de enzima adsorvida foi encontrada através de balanço de massa.

Com os valores de concentração no equilíbrio, tanto para a fase solúvel como para a fase sólida, pôde-se determinar a isoterma que melhor descreve o processo e, conseqüentemente, suas constantes.

Para descrever os dados de equilíbrio de adsorção entre proteínas e adsorventes, a equação de Langmuir tem sido utilizada em diversas pesquisas como uma aproximação empírica necessária, com bom índice de ajuste. Para adsorção em resinas de troca iônica podemos mencionar os trabalhos de Lewus *et alii* (1998), Pessoa *et alii* (1996) e Silva *et alii* (1999).

Chase (1984a) descreve o processo de adsorção como uma reação reversível de segunda ordem, e o equilíbrio pode ser descrito pela isoterma de Langmuir:



Onde A é a proteína a ser adsorvida, B é o adsorvente, AB o complexo proteína-adsorvente, e k_1 e k_2 são as constantes cinéticas de adsorção.

A velocidade de reação da enzima adsorvida pode ser descrita por:

$$\frac{dQ}{dt} = k_1 C (Q_m - Q) - k_2 \cdot Q \quad (3.1)$$

Onde C é a concentração da enzima a ser adsorvida, em solução; Q é a concentração da enzima na fase sólida e Q_m é a capacidade máxima de adsorção do adsorvente.

No equilíbrio, $\frac{dQ}{dt} = 0$, obtendo-se assim:

$$Q^* = \frac{Q_m \cdot C^*}{k_d + C^*} \quad (3.2)$$

Onde k_d é a constante de dissociação (k_2/k_1) e o símbolo (*) representa o valor das variáveis no equilíbrio.

A equação 3.2 prediz que a isoterma de adsorção deve ser não linear e do tipo descrito por Langmuir. Como os dados se ajustaram bem a este tipo de isoterma, a obtenção de Q_m e K_d foi feita através do seguinte procedimento:.

Linearização da equação 3.2:

$$\frac{1}{Q^*} = \frac{1}{Q_m} + \left(\frac{k_2}{k_1}\right) \left(\frac{1}{Q_m}\right) \left(\frac{1}{C^*}\right) \quad (3.3)$$

Multiplicando-se a equação acima por C^* , obtém-se:

$$\frac{C^*}{Q^*} = \frac{C^*}{Q_m} + \left(\frac{k_2}{k_1}\right) \left(\frac{1}{Q_m}\right) C^* \quad (3.4)$$

Com os dados experimentais de C^* e Q^* , traça-se a curva (C^*/Q^*) versus C^* , sendo obtidos os valores dos coeficientes angular e linear.

$$\text{Coeficiente angular} = 1 / Q_m$$

$$\text{Coeficiente linear} = (k_2 / k_1) \cdot (1 / Q_m)$$

Utilizando-se os dados de k_d e Q_m calculados e o programa desenvolvido por Barboza (1998) que leva em conta a adsorção da enzima por uma resina porosa em um sistema em batelada, foram determinadas a partir do ajuste das curvas cinéticas de adsorção, as constantes cinéticas k_1 e k_2 , a difusividade efetiva (Def), o coeficiente de transferência de massa (K_s) e a porosidade da partícula (ϵ).

3.3.4 Seleção das condições de eluição da enzima

As condições de eluição foram estabelecidas inicialmente em um sistema de coluna de leito fixo. Os ensaios foram conduzidos no sistema FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) utilizando uma coluna HR 5/5 com adsorvente numa altura de 4 cm. A coluna foi lavada com tampão acetato pH 3,5 até zerar o espectrofotômetro (280 nm). Foi feita a seguir a alimentação de 3mL de caldo centrifugado, com pH 3,5, numa taxa de fluxo linear de 300 cm/h. Lavou-se então a coluna com tampão acetato pH 3,5 para retornar à linha base eliminando-se as proteínas não adsorvidas. A eluição foi realizada com NaCl em tampão, alimentado em pulsos de concentração linear crescente ou em degrau numa taxa linear que variou conforme o teste. Foram coletadas na saída da coluna frações de volume de 2 mL, analisada a absorbância (280 nm), atividade e proteína. Ao final foi determinado o fator de purificação para escolha das condições de eluição.

3.3.5 Recuperação e purificação da enzima na coluna de leito expandido Streamline 25

3.3.5.1 Sistema de trabalho

Para realização dos testes na coluna foi montado um sistema consistindo de:

- Coluna Streamline 25 da Pharmacia;
- Bomba peristáltica Masterflex modelo 7524-10;
- Bomba peristáltica Masterflex modelo 7518-10;
- Sistema de mangueiras e válvulas para permitir alimentação de água, tampão acetato e amostra;
- Vaso encamisado de 1000 mL acoplado a um banho com recirculação externa;
- Frascos de 500 mL;
- Provetas de 50, 100 e 500 mL;
- Agitador magnético Fisatom modelo 753 A.

Os testes de recuperação e purificação da enzima, numa única etapa através do leito expandido, foram realizadas na coluna Streamline 25 da Pharmacia. A figura 3.1 apresenta o esquema de trabalho podendo-se observar a montagem do sistema: coluna, bomba peristáltica, reator encamisado, agitador e outros acessórios.

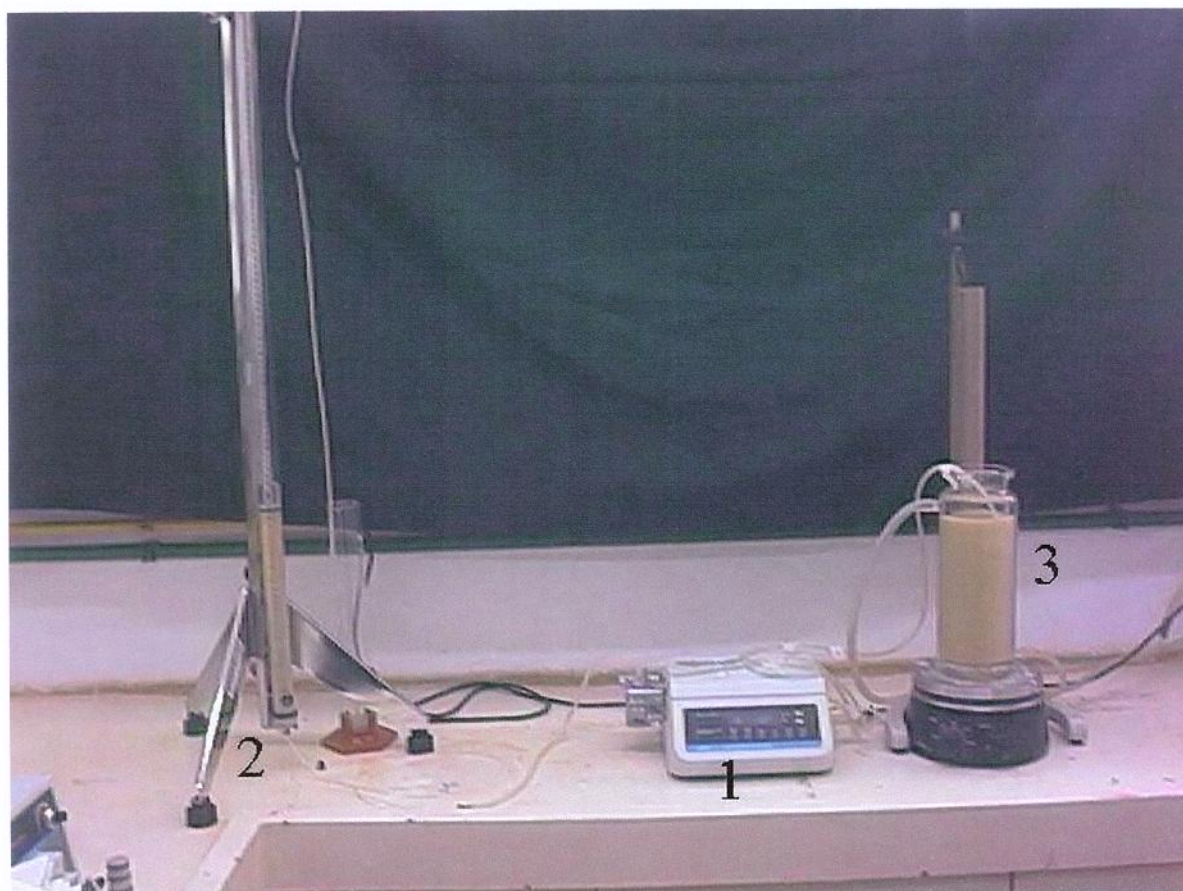


Figura 3.2: Fotografia da montagem do sistema de trabalho para adsorção da enzima inulinase em coluna de leito expandido

A bomba (1) foi ligada a uma conexão de quatro vias, três de alimentação e uma de saída para a coluna (2). A amostra ficou contida no vaso encamisado (3) de modo a manter a alimentação a 25°C, e sob constante agitação evitando a sedimentação das células. O frasco de tampão acetato foi mantido em banho com temperatura controlada a 25°C e a água em frasco sem controle de temperatura (ambos não apresentados na figura). A amostra foi bombeada pela parte inferior da coluna, expandindo o leito. O líquido passa internamente pelo adaptador, sendo coletado em proveta para análises futuras.

3.3.5.2 Preparo da coluna Streamline 25

Antes de cada teste a coluna deve ser preparada através do seguinte procedimento:

- Remover o adaptador da coluna;
- Encher com 2/3 de água destilada;
- Succionar até ± 5 cm de altura através de uma mangueira acoplada a uma bomba peristáltica (Masterflex modelo 7518-10) para retirada do ar que esteja sob o fundo, tendo o cuidado de passar a mangueira sobre toda a superfície;
- Adicionar a resina, já lavada com água destilada, para fornecer um leito de 10 cm de altura;
- Esperar a resina sedimentar;
- Retirar a resina que esteja flotando através de sucção;
- Deixar o nível de água 15 cm acima da altura máxima desejada de expansão do leito;
- Colocar o adaptador 5 cm acima da altura máxima a ser atingida;
- Encher as mangueiras de alimentação com sua solução respectiva, porém a mangueira de caldo deve ser preenchida com tampão para evitar sedimentação de células. Deve-se cuidar neste processo para que não fiquem retidas bolhas de ar;
- Marcar a altura do leito;
- Acoplar a mangueira de saída da bomba à coluna (Bomba peristáltica Masterflex modelo 7524-10);
- Abrir a válvula de água e iniciar a alimentação com 100 cm/h por 20 minutos;
- Aumentar a alimentação para 200 cm/h, ou no valor desejado, por 20 minutos;
- Abrir a válvula do tampão e fechar a de água;

- Permitir a passagem de tampão até equilibrar a resina, acompanhando pelo pH de saída;
- Ajustar a alimentação para que a expansão desejada seja mantida;
- Abrir a válvula que permite a passagem de caldo e fechar a válvula do tampão. Neste momento é cronometrado o início do teste e recolhidas as amostras para análise.

3.3.5.3 Estudo do comportamento hidrodinâmico

As características de expansão do leito foram medidas usando a coluna Streamline 25 da Pharmacia com um preenchimento de resina para fornecer um leito de 10 cm de altura. O líquido em estudo foi alimentado na coluna com uma vazão crescente até que a superfície do leito passasse a ficar difusa e instável. A alimentação foi então realizada a vazões sucessivamente menores até zero. Um intervalo de 20 minutos foi feito entre as alterações de vazão para permitir a estabilização. Foi feita assim a leitura da altura do leito que é expressa como uma função da velocidade linear. Ao plotar a velocidade superficial versus a expansão do leito, em formato log-log, a regressão linear permite determinar o coeficiente de Richardson-Zaki e a velocidade terminal.

Foram realizados dois ensaios com diferentes soluções de fluidização, uma sendo o caldo bruto contendo células e a outra tampão acetato 0,02 M pH 3,5.

3.3.5.4 Obtenção das curvas de ruptura

3.3.5.4.1 Comparação das curvas de ruptura

Para cada teste foi realizada uma nova fermentação para obtenção do meio necessário, onde o caldo resultante foi mantido com células e seu pH ajustado 3,5 com ácido acético 0,02 M, em banho de gelo. Para evitar desnaturação da inulinase, o meio foi mantido sob refrigeração (4°C -5°C) até o momento do uso, quando sua temperatura foi elevada para 25°C e assim conservada durante toda alimentação. Os testes foram realizados

utilizando a coluna STREAMLINE® 25 da Pharmacia. A altura do leito foi de 10 cm, com uma vazão de alimentação estabelecida de modo a obter a curva de ruptura no grau de expansão do leito desejado.

Tampão acetato 0,02 M pH 3,5 foi alimentado até equilibrar a resina. Posteriormente, a alimentação do tampão foi feita em vazão crescente até a estabilização do leito, quando foi introduzido o caldo com células na vazão estabelecida, com os ajustes necessários para manter o leito estável. A amostra de saída da coluna foi imediatamente refrigerada em banho de gelo para posterior análise de atividade.

3.3.5.4.2 Comparação dos graus de expansão

Foram realizados três ensaios de modo a obter curvas com expansão de 2,0, 2,5 e 3,0. A alimentação não foi realizada até a saturação completa da resina, mas sim até um volume que permitisse escolher a melhor expansão a ser empregada na purificação. De modo a verificar somente a influência do grau de expansão e não ter interferência de outras variáveis da fermentação, o caldo utilizado para os ensaios foi o proveniente da mesma fermentação. Os testes foram feitos em seqüência, praticamente sem intervalo de tempo de modo a evitar a desnaturação da enzima.

3.3.5.4.3 Curvas de ruptura para a mesma expansão e atividades diferentes

Foram realizados dois ensaios de modo a obter curvas de ruptura com diferentes atividades enzimáticas na alimentação. Conforme item 3.3.5.4.2, a alimentação não foi realizada até a saturação completa da resina. O caldo utilizado para os ensaios foi proveniente de fermentações diferentes, porém com o mesmo lote de matéria-prima.

3.3.5.4.4 Curvas de ruptura para a mesma expansão com e sem células

Foram realizados dois ensaios de modo a obter curvas com e sem células. A alimentação também não foi realizada até a saturação completa da resina. De modo a verificar somente a influência da presença de células, o caldo utilizado para os ensaios foi o proveniente da mesma fermentação, com a diferença de um meio ser centrifugado e o outro não.

3.3.5.5 Operação do leito expandido para purificação da enzima

A operação foi similar ao item 3.3.5.4.2 também sendo feita uma nova fermentação a cada ensaio. A diferença foi que ao final da alimentação iniciou-se a lavagem com tampão acetato 0,02 M, mantendo a expansão utilizada na alimentação, para retirada das proteínas não adsorvidas e células retidas na resina. Na saída da coluna, além da medida de atividade, foi realizada leitura de absorbância a 280 nm (espectrofotômetro Micronal B 382). Quando a leitura praticamente retornava a zero, iniciava-se a eluição.

Após a sedimentação da resina, o êmbolo foi então baixado até a altura do leito. A eluição foi realizada pela alimentação de uma solução salina em fluxo inverso do caldo e a uma velocidade linear de 100 cm/h. O controle de eluição foi feito através de análise de atividade, leitura de absorbância a 280 nm e, em alguns casos, determinação do pH da amostra de saída. Nas amostras que apresentavam atividade enzimática foi realizada a determinação de proteínas.

Para se realizar a eluição na forma de gradiente linear crescente, foi montado um sistema conforme a figura 3.2. A solução tampão acetato com NaCl (C1) foi bombeada continuamente para outro frasco, contendo inicialmente tampão acetato puro (C2). Este segundo frasco foi mantido sob agitação e dele retirada a solução para a coluna. A vazão do primeiro frasco (F1) foi mantida sempre a metade do segundo frasco (F2). A partir do balanço de massa do sistema foi possível determinar a concentração salina que estava sendo

aplicada no leito expandido. As soluções foram mantidas a temperaturas controladas no valor desejado.

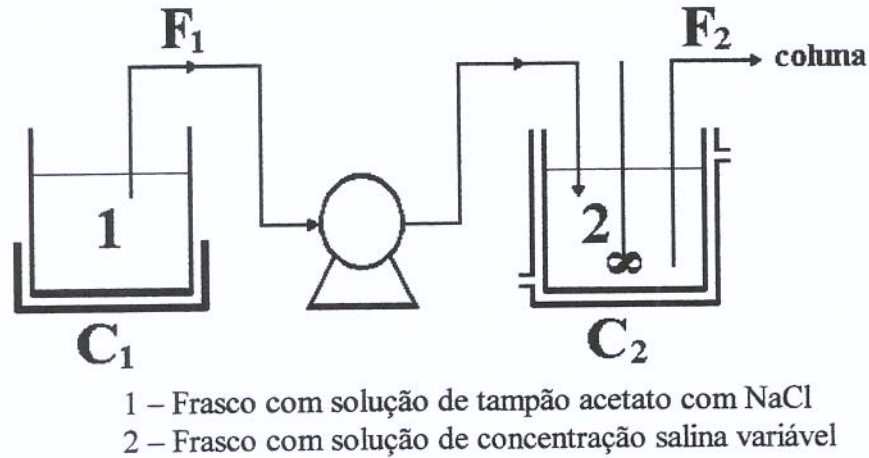


Figura 3.3: Sistema utilizado para obter o gradiente salino linear

Balanco de Massa no reator 2:

$$\frac{d(V_2 C_2)}{dt} = F_1 C_1 - F_2 C_2 \quad (3.5)$$

$$\text{Estabelecendo } F_1 = \frac{F_2}{2} \quad (3.6)$$

$$\frac{dC_2}{F_2 \left(\frac{C_1}{2} - \frac{C_2}{2} \right)} = \frac{dt}{\left(V_0 - \frac{F_2}{2} t \right)} \quad (3.7)$$

Considerando

$$B_1 = \frac{F_2 C_1}{2} \quad (3.8)$$

$$B_2 = \frac{F_2}{2} \quad (3.9)$$

$$B_3 = V_0 \quad (3.10)$$

$$B_4 = \frac{F_2}{2} \quad (3.11)$$

tem-se:

$$\int_0^{C_2} \frac{dC_2}{B_1 - B_2 C_2} = \int_0^t \frac{dt}{B_3 - B_4 t} \quad (3.12)$$

logo

$$\frac{1}{B_2} (\ln B_1 - \ln(B_1 - B_2 C_2)) = \frac{1}{B_4} (\ln B_3 - \ln(B_3 - B_4 t)) \quad (3.13)$$

Assim, C_2 é obtido da equação acima.

3.4 Metodologia analítica

3.4.1 Determinação da atividade enzimática

A determinação de atividade foi realizada pela medida da velocidade inicial da produção dos açúcares liberados em condições controladas. A reação ocorreu em um frasco sob agitação e controle de temperatura a 50°C, com auxílio de um banho recíproco (banho Tecnal, DUBNOFF, Modelo 145). No frasco adicionou-se 9,0mL de solução de sacarose ou inulina a 2% em tampão acetato 0,1 M pH 4,5 e 1,0 mL da amostra convenientemente diluída (Rouwenhorst *et alii*, 1998).

Foram retirados 1,0 mL de amostra em intervalos de tempo pré - determinados e analisou-se os açúcares redutores. Foi construída a curva de absorbância em função do tempo e, com auxílio da curva de calibração dos açúcares redutores, foi determinada a atividade enzimática. Uma unidade por mL de solução enzimática (U/mL) é definida como sendo a capacidade da enzima liberar 1μmol/mL de frutose por minuto.

3.4.2 Determinação de açúcares redutores

Os açúcares redutores foram determinados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959).

3.4.3 Determinação de açúcares redutores totais

Os açúcares redutores totais foram determinados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959) após hidrólise ácida da amostra (Costa, 1986).

3.4.4 Dosagem de proteína

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry *et alli* (1951), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão.

3.4.5 Massa seca

A determinação de massa seca (MS) na amostra foi feita por secagem em microondas até peso constante, segundo método de Hensing *et alli* (1994).

3.4.6 Condutividade

A determinação da condutividade foi feita no equipamento HANNA instruments HI 8733, com a amostra a 25°C sendo a leitura expressa em mS.

3.4.7. Densidade

Para determinação da densidade das amostras, foi utilizado o método do picnômetro, segundo as recomendações de Mohsenin (1970).

3.4.8 Viscosidade

A determinação da viscosidade cinemática das soluções foi feita utilizando-se viscosímetro capilar Cannon-Fenske N° 50. A temperatura foi mantida constante (25°C) colocando-se o viscosímetro em um banho de água.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização da produção da inulinase

4.1.1 Planejamento fatorial fracionado

O planejamento fracionário utilizado para avaliar as 5 variáveis estudadas (concentração de sacarose, de peptona, de extrato de levedura, de K_2PO_4 e pH) e os resultados de atividade enzimática estão apresentados na tabela 4.1 nas 24 e 48 horas de fermentação. A tabela 4.2 apresenta os valores decodificados de cada nível utilizado. Para melhor visualização dos resultados é apresentada a figura 4.1 com o acompanhamento da atividade enzimática em função do tempo de fermentação.

Os cálculos para verificar o efeito das variáveis na resposta foram feitos com o auxílio do programa computacional Statistica versão 5.0 (Microsoft, 1995).

Dentre os 19 ensaios realizados em condições distintas (tabela 4.1) observa-se que a atividade às 48 horas variou de 3,9 U/mL a 61,1 U/mL de acordo com as condições de fermentação. Isto mostra a importância de estabelecer condições adequadas na produção da enzima. Os melhores resultados atingidos foram nas corridas 7 e 8, com pH 3,5, extrato de levedura 10 g/L e peptona 20 g/L, sendo que a concentração de sacarose e K_2HPO_4 foram diferentes para cada teste. Observa-se porém que nas 24 horas a diferença entre o teste 7 e 8 era maior que nas 48 horas, isto provavelmente ocorreu porque no ensaio 8 havia maior concentração de sacarose, o que retardaria o início da produção enzimática, já que o substrato causa uma repressão catabólica.

Outros autores já haviam observado o mesmo comportamento quanto ao substrato. Gupta *et alii* (1994) trabalhando com *K. fragilis* e tendo inulina como substrato, verificaram que a máxima produção de inulinase extra celular foi observada em um meio contendo 15g/L de inulina e que acima desta concentração ocorria um decréscimo da atividade enzimática.

Grootwassink e Hewitt (1983), na produção com *Kluyveromyces fragilis* em frascos agitados, observaram que, no final da fase de crescimento, a produção de inulinase era

intensificada, num meio contendo açúcares como a glicose, frutose ou sacarose. Considerando-se que o crescimento foi realizado em condições de limitação pelo substrato, supõe-se que baixas concentrações de açúcar, que são observadas no final da fase de crescimento, sejam pré-requisitos para a síntese de inulinase. As concentrações elevadas de substrato provavelmente causaram repressão catabólica no meio.

Os ensaios onde o pH foi superior a 3,5 não apresentaram atividade maior que 19 U/mL. Costa (1986) trabalhando com a enzima produzida por *Kluyveromyces fragilis* em frascos agitados obteve também uma maior produtividade a pH 3,5.

Como pode ser observado na figura 4.1, em todos os ensaios ocorreu um incremento de atividade após 24 horas de fermentação. Como o objetivo foi obter um meio com alta atividade para ser usado em estudos posteriores de purificação, a avaliação dos efeitos das variáveis sobre as respostas foi feita com 48 horas de fermentação.

Tabela 4.1 Planejamento experimental fracionário com atividade de inulinase (AI) nas 24 e 48 horas de fermentação.

Ensaio	Sacarose	Ext. lev.	Peptona	Ph	K ₂ HPO ₄	AI 24 horas U/mL	AI 48 horas U/mL
1	-1	-1	-1	-1	+1	22,47	33,67
2	+1	-1	-1	-1	-1	5,08	8,85
3	-1	+1	-1	-1	-1	28,80	42,78
4	+1	+1	-1	-1	+1	8,15	11,84
5	-1	-1	+1	-1	-1	17,66	26,26
6	+1	-1	+1	-1	+1	20,74	31,58
7	-1	+1	+1	-1	+1	47,44	61,08
8	+1	+1	+1	-1	-1	40,92	59,47
9	-1	-1	-1	+1	-1	5,53	6,31
10	+1	-1	-1	+1	+1	3,07	4,15
11	-1	+1	-1	+1	+1	10,38	15,59
12	+1	+1	-1	+1	-1	2,63	3,88
13	-1	-1	+1	+1	+1	14,97	18,72
14	+1	-1	+1	+1	-1	3,90	5,08
15	-1	+1	+1	+1	-1	12,60	17,62
16	+1	+1	+1	+1	+1	9,38	16,20
17	0	0	0	0	0	6,82	10,36
18	0	0	0	0	0	6,23	9,43
19	0	0	0	0	0	6,27	10,44

Tabela 4.2: Valores utilizados no planejamento fatorial fracionado

Nível	-1	0	+1
Sacarose (g/L)	10	20	30
Extrato levedura(g/L)	4	7	10
Peptona(g/L)	8	14	20
pH	3,5	4,5	5,5
K ₂ HPO ₄ (g/L)	1	3	5

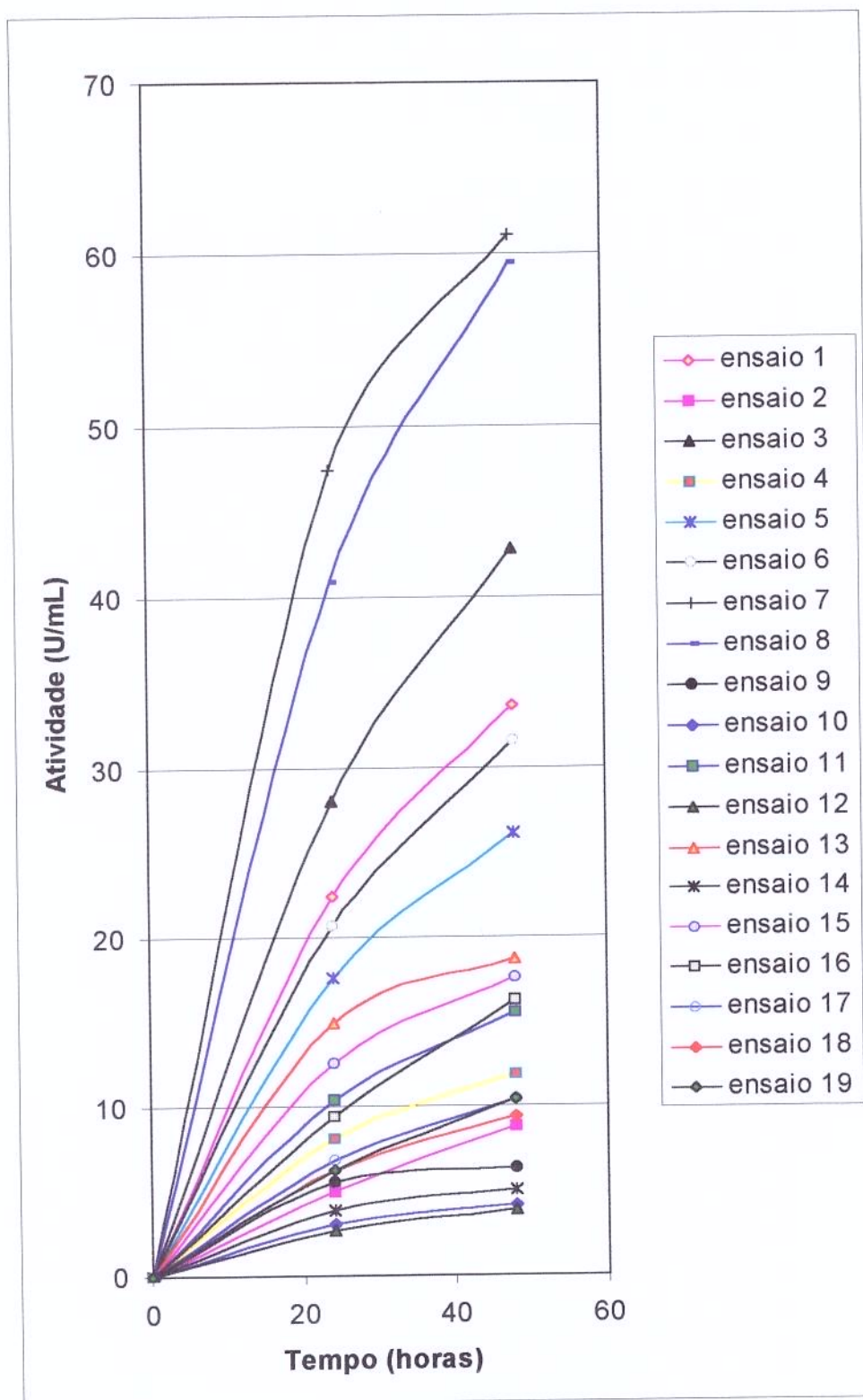


Figura 4.1: Acompanhamento da atividade das fermentações nas 24 e 48 horas de fermentação para o planejamento fatorial fracionado

A tabela 4.3 apresenta os efeitos das variáveis sobre a atividade. O efeito do K_2HPO_4 na atividade enzimática foi baixo embora estatisticamente significativo. Os resultados também mostraram que a produção de inulinase foi afetada mais significativamente (ao nível de significância de 0,05) pela sacarose, extrato de levedura, peptona e pH. Um incremento na concentração de sacarose e no pH (nível -1 para +1) conduziu a um decréscimo na atividade, enquanto que um incremento nas concentrações do extrato de levedura, da peptona e do K_2HPO_4 levaram a maiores produções de inulinase. O pH foi o efeito mais significativo estatisticamente, conforme se observa na figura 4.2, mostrando que seu valor deve ser mantido baixo. No entanto, pHs abaixo de 3,5 provocam perda de estabilidade e desnaturação da enzima (Costa, 1986). Assim, o pH foi fixado em 3,5 nos ensaios posteriores.

Tabela 4.3 Estimativa dos efeitos para a atividade de inulinase.

	Efeito	Desvio	t(2)	P	Lim. conf.	Lim. conf.
	U/mL	padrão			-95%	+95%
Média	20,70	0,13	159,96	0,00004	20,14	21,26
Sacarose (g/L)*	-10,12	0,28	-35,88	0,0008	-11,33	-8,91
Ext. lev. (g/L)*	11,73	0,28	41,59	0,0006	10,52	12,94
Peptona (g/L)*	13,62	0,28	48,29	0,0004	12,41	14,83
pH*	-23,50	0,28	-83,31	0,0001	-24,71	-22,28
K_2HPO_4 (g/L)*	2,82	0,28	9,99	0,01	1,61	4,03

*fatores estatisticamente significativos (95% nível de confiança).

Estudos realizados por Schneider (1996) para a produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* também mostraram a influência da quantidade de peptona na atividade enzimática. O autor verificou, que uma redução de bacto-peptona de 20 g/L para 10 g/L, 5 g/L e 0 g/L, levava a uma redução na atividade enzimática de aproximadamente 14%, 20% e 25%, respectivamente.

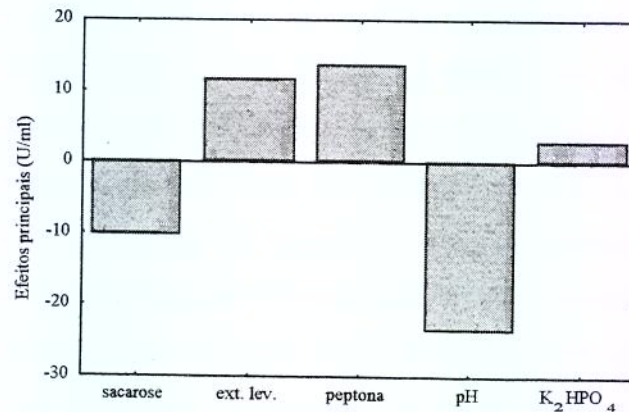


Figura 4.2 Efeito da sacarose, extrato de levedura, peptona, pH e K₂HPO₄ sobre a atividade enzimática

As concentrações de sacarose, extrato de levedura e peptona foram selecionadas e estudadas utilizando um planejamento fatorial completo e análise de superfície de resposta. O pH foi fixado em 3,5 por razões já comentadas anteriormente e a concentração de K₂PO₄ foi fixada em 1g/L (concentração mais baixa estudada), por razões econômicas, devido ao seu baixo efeito na atividade enzimática.

4.1.2 Planejamento fatorial completo

As corridas e seus resultados de atividade, massa seca e concentração de sacarose após 48 horas de fermentação estão apresentados na tabela 4.4. O melhor valor para a atividade ocorreu no ensaio 7 com sacarose no nível -1 e extrato de levedura e peptona no nível +1, observando-se que este resultado não está associado com maior quantidade de massa seca. No caso desta, quanto maior a quantidade de sacarose (ensaio 10), maior o crescimento celular. A tabela 4.5 apresenta os valores decodificados de cada nível utilizado.

Tabela 4.4 Planejamento fatorial completo para atividade da inulinase

Ensaio	Sacarose	Ext. lev.	Peptona	Atividade 48h (U/mL)	Massa seca 48h (g/Kg)	Sacarose 48h (g/L)
1	-1	-1	-1	33,93	5,76	0,29
2	+1	-1	-1	34,44	7,91	0,36
3	-1	+1	-1	48,27	6,24	0,42
4	+1	+1	-1	23,87	8,55	0,48
5	-1	-1	+1	54,28	6,04	0,35
6	+1	-1	+1	56,02	8,07	0,43
7	-1	+1	+1	75,19	6,85	0,43
8	+1	+1	+1	60,32	8,82	0,53
9	-1,68	0	0	40,67	4,96	0,29
10	+1,68	0	0	40,35	9,64	0,53
11	0	-1,68	0	43,36	5,95	0,38
12	0	+1,68	0	61,40	6,64	0,43
13	0	0	-1,68	36,79	6,52	0,35
14	0	0	+1,68	69,94	7,52	0,48
15	0	0	0	54,86	6,72	0,44
16	0	0	0	51,98	7,22	0,43
17	0	0	0	53,10	7,18	0,43

Tabela 4.5: Valores utilizados no planejamento fatorial completo

Nível	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Sacarose (g/L)	10	14,05	20	25,95	30
Extrato levedura (g/L)	4	5,21	7	8,79	10
Peptona (g/L)	8	10,43	14	17,57	20

Conforme já colocada por Kushi *et alii* (1996), provavelmente a síntese de inulinase é regulada pela concentração de açúcar residual no meio de cultura, e como podemos observar na tabela 4.4, a concentração de sacarose em todos os ensaios já estava muito baixa nas 48h, o que já era esperado, visto que houve produção de inulinase em todos os casos.

As tabelas 4.6 e 4.7 apresentam coeficiente de regressão, desvio padrão, o valor t, o valor p e os limites de confiança para a atividade de inulinase e a massa seca, respectivamente. Como pode ser observado na tabela 4.6 os termos quadráticos para o extrato de levedura e a peptona e os de interação entre sacarose e peptona e extrato de levedura e peptona não foram estatisticamente significativos a 95% de confiança. Na tabela 4.7 só foram significativos os termos lineares para a sacarose e o extrato de levedura a 95% de confiança e o termo linear para a peptona a 91% de confiança.

Tabela 4.6: Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão, valor t, valor p e limites de confiança, provenientes do planejamento fatorial completo, para a atividade de inulinase

	Coef. de regressão	Desvio padrão	t(7)	p	Lim. de conf. -95%	Lim. de conf. +95%
Média	53,32	2,45	21,73	0,000	47,52	59,13
(1)Sac (L)*	-2,75	1,15	-2,39	0,048	-5,48	-0,03
Sac (Q)*	-4,58	1,27	-3,60	0,009	-7,58	-1,57
(2)Ext. lev. (L)*	4,34	1,15	3,77	0,007	1,62	7,07
Ext. lev. (Q)	-0,37	1,27	-0,29	0,779	-3,37	2,63
(3)Pep. (L)*	11,80	1,15	10,23	0,000	9,07	14,52
Pep. (Q)	-0,02	1,27	-0,016	0,987	-3,02	2,98
1L x 2L*	-5,19	1,50	-3,44	0,011	-8,75	-1,63
1L x 3L	1,34	1,50	0,89	0,401	-2,22	4,90
2L x 3L	2,68	1,50	1,78	0,118	-0,88	6,24

*fatores estatisticamente significativos (95% nível de confiança).

Tabela 4.7: Resultados do coeficiente de regressão, desvio padrão, valor t, valor p e limites de confiança, provenientes do planejamento fatorial completo, para a massa seca

	Coef. de regres.	Desvio padrão	t(7)	p	Lim. De conf. -95%	Lim. de conf. +95%
Média	7,01	0,24	29,34	0,000	6,45	7,58
(1)Sac (L)*	1,20	0,11	10,65	0,000	0,93	1,46
Sac (Q)	0,18	0,12	1,50	0,177	-0,11	0,48
(2)Ext. lev. (L)*	0,28	0,11	2,50	0,041	0,016	0,55
Ext. lev. (Q)	-0,17	0,12	-1,38	0,210	-0,46	0,12
(3)Pep. (L)**	0,22	0,11	1,96	0,091	-0,04	0,48
Pep. (Q)	0,09	0,12	0,70	0,507	-0,21	0,38
1L x 2L	0,01	0,15	0,08	0,934	-0,33	0,36
1L x 3L	-0,06	0,15	-0,39	0,707	-0,40	0,29
2L x 3L	0,06	0,15	0,37	0,719	-0,29	0,40

*fatores estatisticamente significativos (95% nível de confiança).

**fator estatisticamente significativo (91% nível de confiança).

A tabela 4.8 apresenta a análise de variância (ANOVA) para a atividade e massa seca. O coeficiente de correlação (0.965 para atividade de inulinase (AI) e 0.949 para a massa seca (MS)) e o teste F foram muito bons (9.4 e 9.9 vezes maior, respectivamente, que o valor tabelado) a 95% de confiança. Assim, é possível obter um modelo codificado que descreva as respostas (AI e MS) em função das variáveis analisadas. Para a atividade enzimática (AI) obteve-se um modelo de segunda ordem e para a massa seca (MS) de primeira ordem linear. Os parâmetros estatisticamente não significativos foram eliminados do modelo e adicionados à falta de ajuste. Os modelos foram adequados para descrever as superfícies de resposta de produção de inulinase (Equação 4.1) e da massa seca (Equação 4.2) de acordo com Box *et alii.* (1978).

$$\text{Atividade} = 52,94 - 2,75.\text{Sacarose} - 4,49.\text{Sacarose}^2 + 4,34.\text{Ext. lev.} + 11,8.\text{Peptona} - 5,19.\text{Sacarose}.\text{Ext. lev.} \quad (4.1)$$

$$\text{Massa Seca} = 7,01 + 1,19.\text{Sacarose} + 0,28 \text{ Ext. lev.} + 0,22 .\text{Peptona} \quad (4.2)$$

Sendo o princípio do planejamento fatorial uma análise multivariável, se existir interação entre elas será possível a sua quantificação. Isto significa que ao variar, por exemplo, a sacarose de -1 para +1, a mudança na resposta pode não ser a mesma dependendo assim da variação dos outros fatores. No estudo em questão, isto pode ser verificado através do efeito de interação significativo entre a sacarose e o extrato de levedura (Equação 4.1).

Tabela 4.8: Análise de variância para a Atividade de Inulinase (AI) e Massa Seca (MS)

Fonte de Variação	Soma Quadrática		Graus de liberdade		Média quadrática		Teste F	
	AI	MS	AI	MS	AI	MS	AI ^a	MS ^b
Regressão	2737,2	21,3	5	3	547,4	7,1	30,0	35,5
Resíduo	200,6	2,3	11	13	18,2	0,2		
Falta de ajuste	196,4	2,2	9	11				
Erro puro	4,2	0,1	2	2				
Total	2937,8	23,6	16	16				

Coeficiente de correlação: R=0,965 (AI) e R=0,949 (MS)

^aF_{0,95;5;11}=3,2 ^bF_{0,95;3;13}=3,6

Assim, o modelo para a atividade foi utilizado para construir as superfícies de resposta para a atividade enzimática. Através da análise das figuras 4.3 (a) e (b), verifica-se que, quando a concentração de sacarose é baixa, a atividade é mais sensível a variações na concentração do extrato de levedura. Através das figuras 4.3 (c) e (d) observa-se que se a concentração de peptona é baixa (nível -1,68), a atividade permanece ao redor de 18 U/mL para toda faixa de concentração de sacarose. As figuras 4.3 (e) e (f) mostram os efeitos do extrato de levedura e da peptona na atividade enzimática. A produção de inulinase é maior

a altas concentrações de peptona e extrato de levedura. Quando o meio de cultura contém 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura, a produção de inulinase pode ser superior a 75 U/mL. As superfícies indicam que o ótimo para o meio de cultura é alta concentração de peptona e de extrato de levedura e baixa concentração de sacarose.

Com base neste estudo, foram fixadas as condições do meio de cultura: sacarose 14 g/L, extrato de levedura 10 g/L, peptona 20 g/L, K_2HPO_4 1 g/L e pH 3,5. Era esperado através do modelo uma atividade de 87 U/mL. A atividade experimental após 48 de fermentação foi de 91 U/mL, a qual está bem próxima da predita pelo modelo. A análise da atividade enzimática sobre a inulina nestas condições foi de 6,7 U/mL com uma taxa de S/I de 13,8. Esta taxa é comparável à encontrada por Rouwenhorst *et alii.* (1990) e a produção de inulinase de 6,7 U/mL foi muito similar à reportada por Gupta *et alii.* (1994) em um meio contendo 1% de frutano. No caso da massa seca, o valor esperado era de 6,7 g/kg e o obtido experimentalmente foi de 6,9 g/kg, apenas 3% acima do valor calculado pelo modelo.

O modelo da Equação 4.2 foi utilizado para construir as superfícies de resposta para a massa seca, as quais podem ser vistas na figura 4.4.

Conforme pode ser observado pelas figuras 4.4 (a) e (b) o aumento do extrato de levedura e da peptona conduzem a maiores valores finais de massa seca, porém este efeito é bem inferior ao da concentração de sacarose, como verificado nas figuras 4.4 (c), (d), (e) e (f). Ao aumentar a concentração do substrato na faixa estudada, a massa seca praticamente dobra. Salienta-se novamente que o comportamento quanto ao substrato não é o mesmo para a atividade, ou seja, a produção de inulinase não está associada ao crescimento na faixa estudada.

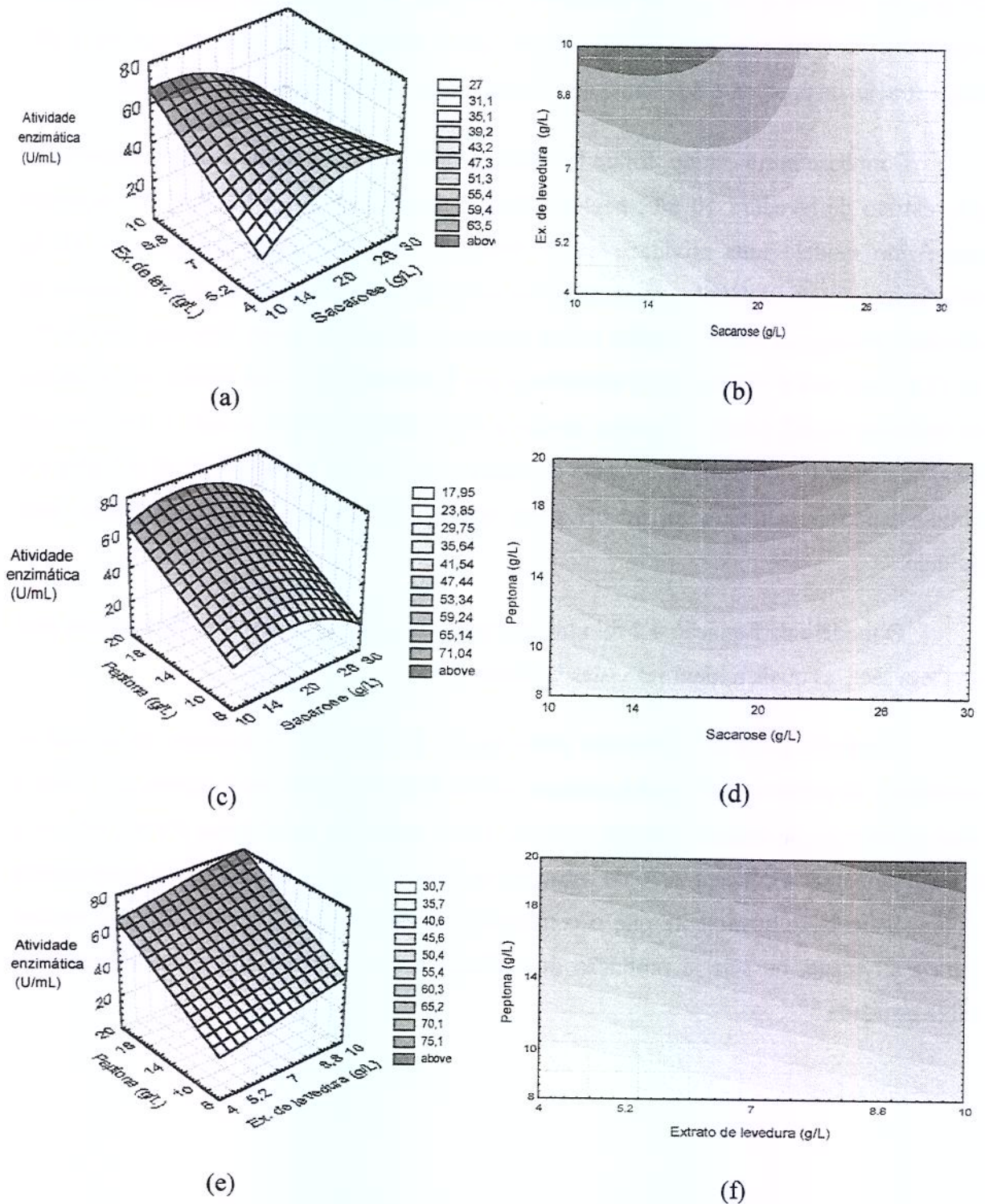
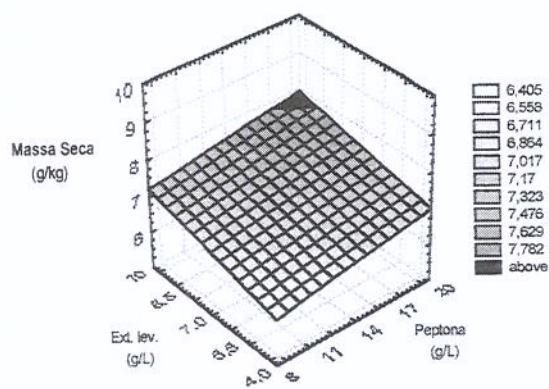
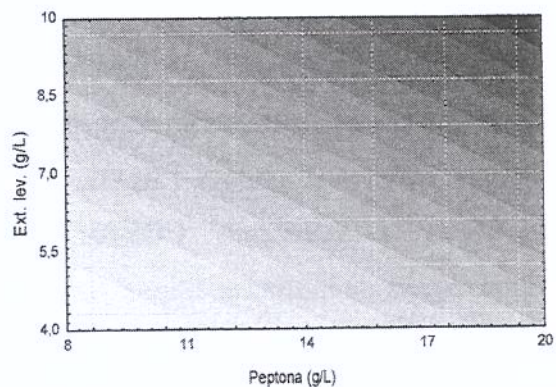


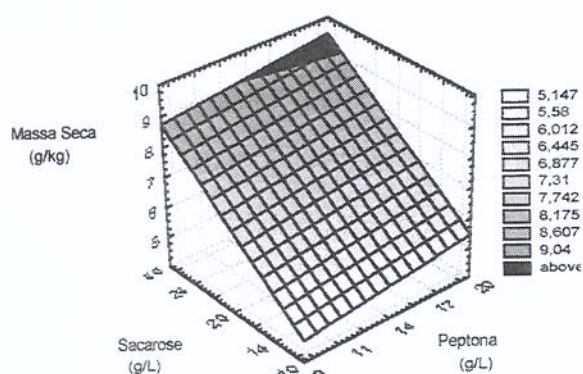
Figura 4.3: : Superfícies de resposta e curvas de contorno para a atividade de inulinase como uma função da concentração: (a) e (b) do extrato de levedura e sacarose; (c) e (d) da peptona e sacarose e (e) e (f) do extrato de levedura e peptona.



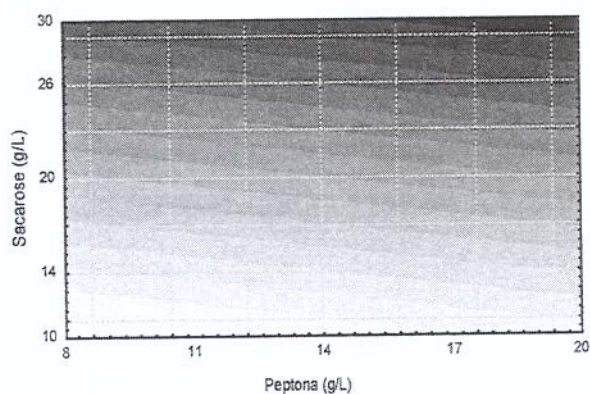
(a)



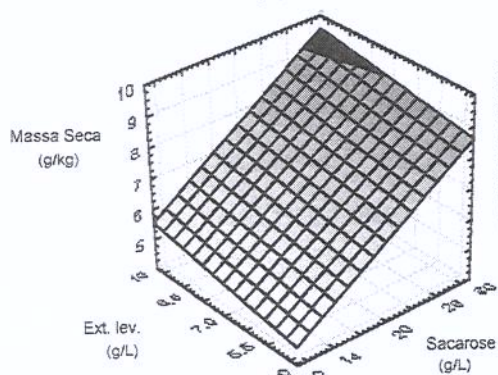
(b)



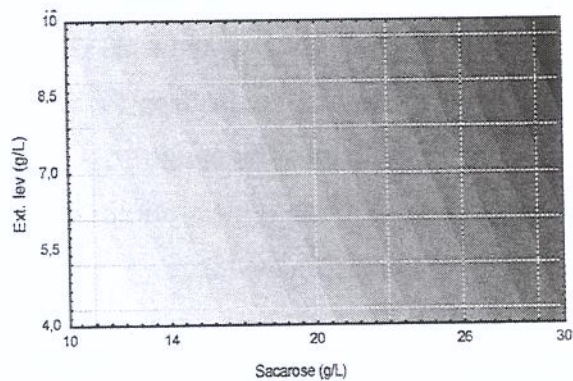
(c)



(d)



(e)



(f)

Figura 4.4: Superfícies de resposta e curvas de contorno para a massa seca como uma função da concentração: (a) e (b) do extrato de levedura e peptona; (c) e (d) da peptona e sacarose e (e) e (f) do extrato de levedura e sacarose.

Um ponto importante deste trabalho, além da otimização da atividade enzimática, é a utilização da sacarose como substrato, alternativa economicamente mais viável que a inulina. Quando comparadas as duas substâncias a sacarose tem um custo em torno de 25 a 30 vezes inferior à inulina (Sigma, 1999). Guerrero *et alii* (1995) trabalhando com *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L 278, cepa denominada pelos autores como hiperprodutora de inulinase, conseguiram uma produção total da enzima de 18,56 U/mg de células e produção extracelular de 6,17 U/mg, quando utilizaram no meio 1% de inulina. No caso, os autores definem uma unidade de atividade como a quantidade total de açúcares redutores liberados por minuto, logo isto representa uma atividade total de 9,28 U/mg de biomassa e uma atividade extracelular de 3,09 U/mg considerando somente os μ mol de frutose liberados por minuto. No presente trabalho obteve-se 91 U/mL, ou seja, uma atividade de inulinase extracelular de 13,19 U/mg de células, um valor superior ao dos referidos autores e utilizando-se sacarose como substrato.

4.1.3 Dinâmica de produção da inulinase

No planejamento experimental os ensaios foram realizados simultaneamente, para evitar interferência nos resultados de variáveis como concentração de inóculo, temperatura, etc. Como o número de análises foi alto, isto impossibilitaria a medida de atividade ao longo do tempo para cada ensaio. Assim, de modo a verificar a dinâmica de produção de inulinase foi escolhido o meio otimizado através do planejamento experimental e realizado o acompanhamento da atividade e pH da fermentação durante 62 horas.

A figura 4.5 apresenta os resultados de uma fermentação conduzida em triplicata, usando as condições otimizadas para a atividade, a 30°C e 150 rpm. A atividade e o pH tiveram o mesmo comportamento, aumentando até 42 horas de fermentação. Após este período ambas as variáveis tornaram-se praticamente estáveis. A máxima atividade foi ao redor de 127 U/mL. Este resultado foi superior ao encontrado anteriormente (último planejamento), provavelmente porque já não se estava utilizando o mesmo lote de matérias-primas e o microrganismo, já estava bem mais ativado.

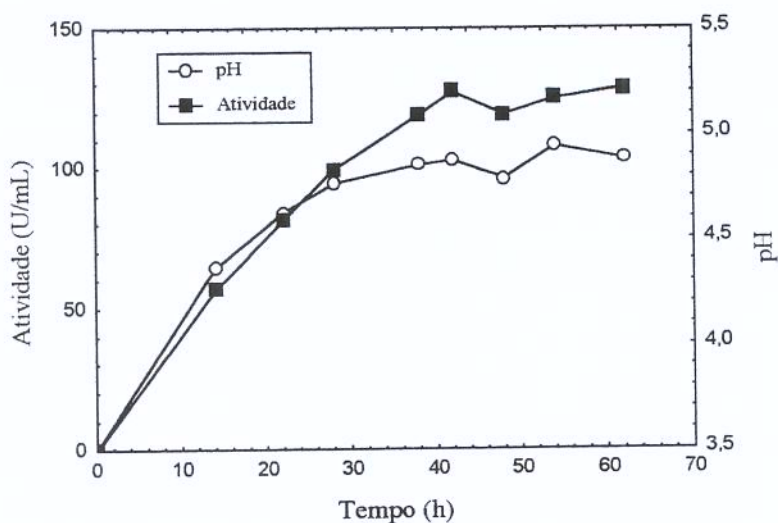


Figura 4.5 Dinâmica da produção de inulinase por *K. marxianus* no meio otimizado (sacarose 14 g/L, peptona 20 g/L, extrato de levedura 10 g/L, K_2HPO_4 1 g/L e pH 3,5)

4.2 Estudo da influência da concentração de substrato, pH e temperatura na determinação da atividade enzimática

Uma vez otimizadas as condições de produção da enzima, é muito importante o estudo da concentração de substrato, pH e temperatura na determinação da atividade enzimática para verificar as melhores condições de atuação da enzima. Assim, neste item são apresentados os resultados dos quatro planejamentos realizados para este fim. A faixa de valores das variáveis estudadas foi escolhida segundo a literatura.

A tabela 4.9 apresenta os ensaios realizados no primeiro planejamento experimental. Como pode ser observado a atividade enzimática pode variar drasticamente, de 3 a 100 U/mL, conforme a condição experimental utilizada. Os piores resultados ocorreram nos ensaios 7 e 8 quando o pH e temperatura eram elevados (nível +1, ou seja, pH 5,5 e temperatura 70°C). A tabela 4.10 apresenta a faixa de valores estudados para cada variável.

Tabela 4.9: Primeiro planejamento experimental: estudo da concentração de sacarose, pH e temperatura na atividade enzimática.

Ensaio	% Sacarose	pH	Temperatura (°C)	Atividade (U/mL)
1	-1	-1	-1	98,82
2	1	-1	-1	102,57
3	-1	1	-1	70,83
4	1	1	-1	71,55
5	-1	-1	1	46,82
6	1	-1	1	53,57
7	-1	1	1	3,62
8	1	1	1	7,42
9	0	0	0	100,75
10	0	0	0	94,84
11	0	0	0	103,17

Tabela 4.10: Valores utilizados no primeiro e segundo planejamento experimental

Nível	-1	0	+1
Sacarose (%)	2	3,5	5,0
pH	4,5	5,0	5,5
Temperatura (°C)	50	60	70

Na tabela 4.11 e na figura 4.6 pode-se observar os efeitos de cada variável, bem como os de interação sobre a atividade enzimática.

Tabela 4.11: Resultados dos efeitos, desvio padrão, valor t, valor p e limites de confiança, provenientes do primeiro planejamento

	Efeito	Desvio padrão	t(2)	p	Lim. Conf. -95%	Lim. conf. 95%
Média	68,54	1,29	53,05	0,000355	62,98	74,10
Sac (1)	3,75	3,03	1,24	0,34	-9,28	16,79
pH (2)*	-37,09	3,03	-12,24	0,006608	-50,13	-24,05
Temp (3)*	-58,08	3,03	-19,17	0,002710	-71,12	-45,05
1 x 2	-1,50	3,03	-0,49	0,670590	-14,53	11,54
1 x 3	1,52	3,03	0,50	0,665693	-11,52	14,56
2 x 3**	-7,58	3,03	-2,50	0,129336	-20,62	5,45

* $p < 0,05$ (estatisticamente significativo a 95 % de confiança)

** $p < 0,15$ (estatisticamente significativo a 85 % de confiança)

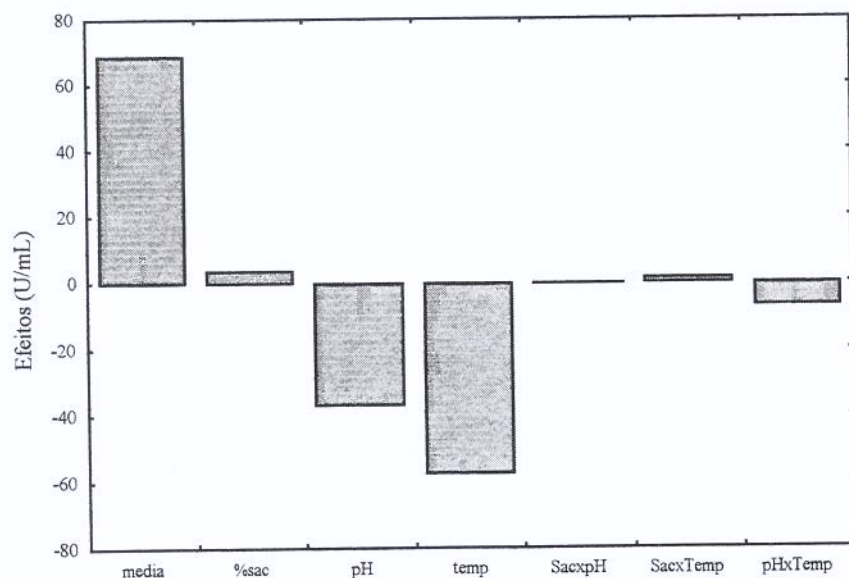


Figura 4.6: Resultado dos efeitos da concentração de sacarose, pH, temperatura e suas interações na atividade enzimática.

A partir deste primeiro planejamento, observa-se que a concentração de substrato, bem como as interações entre as variáveis não influenciaram significativamente na atividade da enzima, dentro das faixas estudadas. No entanto, o efeito do pH e da temperatura foram estatisticamente significativos a 95% de confiança, onde um incremento nestas variáveis pode acarretar em uma diminuição drástica na atividade enzimática.

O mesmo trabalho foi feito utilizando inulina como substrato. Os resultados do segundo planejamento são mostrados na tabela 4.12. A atividade variou de 0,5 a 7,3 U/mL, com os piores valores de atividade correspondendo a elevada temperatura, independentemente do nível em que se encontrava a concentração de inulina e o valor do pH.

Tabela 4.12: Segundo planejamento fatorial: estudo da influência da concentração de inulina, pH e temperatura na atividade de inulinase

Ensaio	% Inulina	pH	Temperatura (°C)	Atividade (U/mL)
1	-1	-1	-1	3,88
2	1	-1	-1	6,16
3	-1	1	-1	5,65
4	1	1	-1	7,09
5	-1	-1	1	0,52
6	1	-1	1	1,00
7	-1	1	1	0,76
8	1	1	1	0,79
9	0	0	0	7,19
10	0	0	0	7,30
11	0	0	0	7,28

Na tabela 4.13 são observados os efeitos das variáveis do segundo planejamento sobre a atividade enzimática. Apesar de todas as variáveis serem significativas a 95% de confiança, isto ocorreu devido ao desvio padrão ser muito baixo através da análise do erro puro, sendo que a variável de maior importância é a temperatura, com seu incremento conduzindo a um decréscimo na atividade enzimática.

Tabela 4.13: Resultados dos efeitos, desvio padrão, valor t, valor p e limites de confiança, provenientes segundo planejamento fatorial

	Efeito (U/mL)	Desvio padrão	t(2)	p	Lim. Conf. -95%	Lim. conf. 95%
Média.	4,33	0,02	271,40	0,000014	4,26	4,40
(1)Sac (L)*	1,06	0,04	28,26	0,001250	0,90	1,22
(2)pH (L)*	0,68	0,04	18,24	0,002992	0,52	0,84
(3)Temp (L)*	-4,93	0,04	-131,69	0,000058	-5,09	-4,77
1L x 2L*	-0,32	0,04	-8,62	0,013195	-0,48	-0,16
1L x 3L*	-0,80	0,04	-21,45	0,002167	-0,96	-0,64
2L x 3L*	-0,67	0,04	-17,84	0,003127	-0,83	-0,51

*p<0,05 (estatisticamente significativo a 95 % de confiança)

Os resultados dos dois planejamentos permitem definir as variáveis que têm efeito significativo na resposta de interesse, sendo possível elaborar o planejamento completo e determinar a faixa ótima de operação para obter maior atividade.

Para a sacarose, a temperatura e o pH foram as variáveis mais importantes na atividade enzimática e estatisticamente significativas a um nível de 95% de confiança. No caso da inulina a temperatura foi a variável que mais afetou o valor da atividade enzimática, um incremento de 50°C a 70°C provocou em média uma queda de 4,93 U/mL. No entanto, para a realização dos dois planejamentos seguintes foram escolhidos a temperatura e o pH como variáveis a serem estudadas para ser possível a comparação dos resultados e consequentemente a relação S/I para cada ensaio.

A tabela 4.14 apresenta os ensaios do terceiro (substrato: sacarose a 2%) e quarto (substrato: inulina a 2%) planejamentos completos com as respectivas respostas de atividade enzimática sobre a sacarose (S) e a inulina (I), e a relação entre elas (S/I). Valores baixos (<100) indicam que a enzima está agindo como inulinase e altos como invertase (Ettalibi & Baratti, 1987). A tabela 4.15 apresenta os valores codificados e reais estudados

para os dois planejamentos. A figura 4.7 mostra a relação S/I para cada ensaio. Esta relação varia de 9,5 até 77,2, conforme a condição de pH e temperatura utilizados na reação.

Tabela 4.14: Terceiro e quarto planejamentos experimentais

Ensaio	pH	Temperatura	Atividade sobre a sacarose (U/mL)	Atividade sobre a inulina (U/mL)	S/I
1	-1	-1	61,54	5,7	9,47
2	1	-1	58,76	6,03	9,74
3	-1	1	131,83	1,54	71,64
4	1	1	105,82	2,85	37,13
5	-1,41	0	97,01	8,69	11,16
6	1,41	0	91,95	7,38	12,46
7	0	-1,41	57,44	5,6	10,26
8	0	1,41	81,81	1,06	77,18
9	0	0	109,92	7,48	14,69
10	0	0	113,79	6,52	17,45
11	0	0	109,2	6,28	17,39

Tabela 4.15: Valores utilizados no terceiro e quarto planejamento experimental

Nível	-1,41	-1	0	+1	1,41
pH	4,5	4,64	5	5,36	5,5
Temperatura (°C)	40	44,4	55	65,6	70

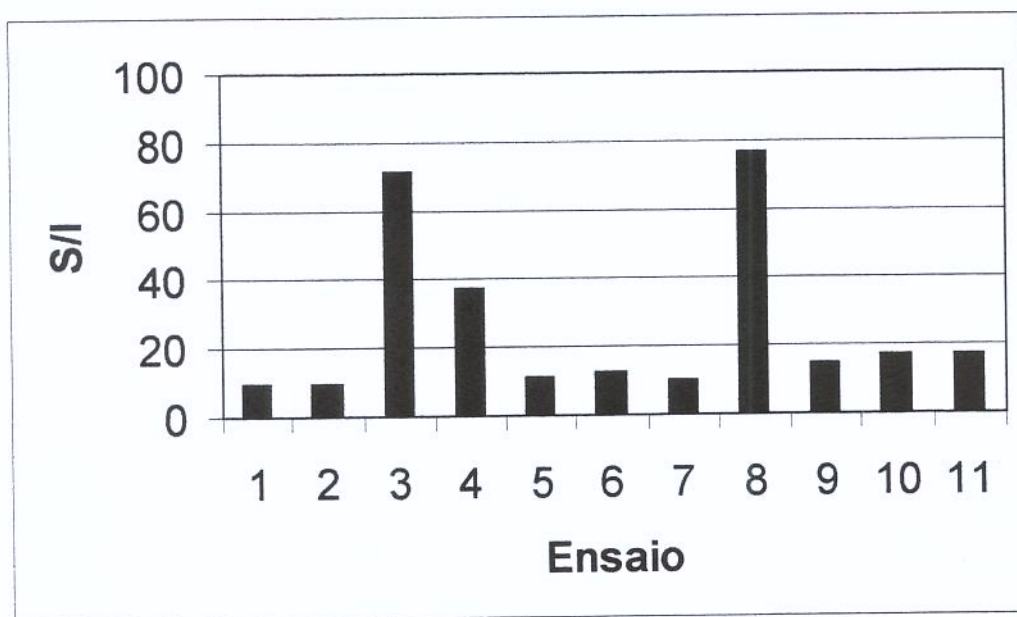


Figura 4.7: Histograma da relação S/I para cada ensaio realizado

Analisando-se a tabela 4.14 e o gráfico 4.7, verifica-se nos ensaios 3, 4 e 8, onde a temperatura foi mais elevada (condições +1(66°C) e +1,41(70°C)), uma baixa atividade sobre a inulina, embora a atividade sobre a sacarose permanecesse alta, resultando em um valor de S/I alto. Temperaturas mais baixas, como nos ensaios 1, 2 e 7 (condições -1(44°C) e -1,41(40°)), favoreceram principalmente a ação da enzima sobre a inulina, diminuindo então o valor de S/I. Desta forma, variando as condições do meio reacional, pode-se favorecer a atividade da enzima sobre a inulina ou a sacarose, conforme desejado.

Rouwenhorst *et alii.* (1990), trabalhando com inulinase de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, obtiveram uma taxa S/I de 13 para o sobrenadante do caldo fermentado. Os pesquisadores utilizaram pH 4,5 e 50°C. Neste trabalho, utilizando-se os mesmos valores de pH e temperatura nos modelos estabelecidos (equações 4.3 e 4.4) a relação encontrada foi de 13,1, ou seja, igual à dos referidos autores. O conhecimento da influência do pH e da temperatura na atividade enzimática permite comparar relações S/I obtidas em diferentes condições.

A tabela 4.16 apresenta os valores dos coeficientes de regressão, o desvio padrão, o valor t , p e dos limites de confiança superiores e inferiores para o terceiro planejamento,

com sacarose como substrato. Para valores de p obtidos, verifica-se que todos os parâmetros são estatisticamente significativos a 95% de confiança ($p < 0,05$).

Tabela 4.16: Tabela de coeficientes de regressão, desvio padrão, valor t, valor p e limites de confiança, utilizando a sacarose como substrato

	Coef. regres.	Desvio padrão	t(2)	p	Lim. Conf. -95%	Lim. conf. +95%
Média	110,94	1,42	77,84	,000165	104,81	117,07
(1) pH (L)*	-4,50	0,87	-5,15	,035660	-8,26	-0,74
pH (Q)*	-6,36	1,04	-6,10	,025810	-10,85	-1,88
(2)Temp (L)*	19,02	0,87	21,76	,002105	15,26	22,78
Temp (Q)*	-18,87	1,04	-18,09	,003042	-23,36	-14,38
1L x 2L*	-5,81	1,23	-4,70	,042324	-11,12	-0,50

* $p < 0,05$ (estatisticamente significativo a 95 % de confiança)

Analisando-se a tabela 4.17 de Análise de Variância (ANOVA) verifica-se que o modelo obtido apresenta um coeficiente de correlação de 91% e que o F calculado é superior ao F tabelado para 90% de confiança. Através da validação dos parâmetros de estudo, obteve-se o modelo quadrático (Equação 4.3) que representa o comportamento da atividade enzimática, utilizando-se sacarose como substrato, dentro de uma determinada faixa de pH e temperatura.

$$\text{Atividade (sacarose)} = 110,94 - 4,5 \cdot \text{pH} - 6,36 \cdot \text{pH}^2 + 19,02 \cdot \text{Temp} - 18,87 \cdot \text{Temp}^2 - 5,81 \cdot \text{pH} \cdot \text{Temp} \quad (4.3)$$

Tabela 4.17: ANOVA do terceiro planejamento utilizando sacarose como substrato

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Teste F
Regressão	5181,15	5	1036,23	4,98
Resíduos	1039,54	5	207,91	
Falta de ajuste	1027,35	3		
Erro puro	12,19	2		
Total	6220,69	10		

$$F_{0,90;5;5} = 3,45$$

Coeficiente de correlação: $R=0,91$

A tabela 4.18 apresenta os valores dos coeficientes de regressão, o desvio padrão, o valor t , p e dos limites de confiança superiores e inferiores para o quarto planejamento, com inulina como substrato. Para valores de p obtidos, verifica-se que a temperatura foi o único parâmetro estatisticamente significativo, a um nível de confiança de 95%.

Tabela 4.18: Tabela de coeficientes de regressão, desvio padrão, valor t , valor p e limites de confiança, utilizando a inulina como substrato.

	Coef. regres.	Desvio padrão	t(2)	p	Lim. Conf. -95%	Lim. conf. +95%
Média	6,76	0,37	18,34	0,003	5,17	8,35
(1) pH (L)	-,02	0,23	-0,11	0,919	-0,99	0,95
pH (Q)	0,22	0,27	0,84	0,491	-0,94	1,39
(2)Temp (L)*	-1,72	0,23	-7,62	0,017	-2,70	-0,75
Temp (Q)*	-2,14	0,27	-7,93	0,015	-3,30	-0,98
1L by 2L	0,24	0,32	0,77	0,523	-1,13	1,62

* $p<0,05$ (estatisticamente significativo a 95 % de confiança)

A Análise de Variância (tabela 4.19) indica um coeficiente de correlação de 93% e um F calculado aproximadamente 6 vezes maior que o tabelado ao nível de 95% de confiança. Assim, ignorando os efeitos não significativos na resposta final, o modelo quadrático obtido mostra que a atividade enzimática depende exclusivamente da

temperatura através de uma equação de segunda ordem (equação 4.4). A derivada desta equação indica que a temperatura que fornece maior atividade sobre a inulina está entre 50°C e 51°C.

$$\text{Atividade (inulina)} = 6,97 - 1,72 \cdot \text{Temp} - 2,21 \cdot \text{Temp}^2 \quad (4.4)$$

Tabela 4.19: ANOVA do quarto planejamento utilizando a inulina como substrato

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Teste F
Regressão	53,48	2	26,74	25,62
Resíduos	8,35	8	1,04	
Falta de ajuste	7,54	6		
Erro puro	0,81	2		
Total	61,83	10		

$F_{0,95;2;8}=4,46$

Coeficiente de correlação: $R=0,93$

A partir dos modelos foi possível gerar as superfícies de respostas que estão apresentadas nas figuras 4.8 e 4.9.

Observa-se que, quando utilizou-se sacarose como substrato (figura 4.8), obteve-se uma elevada atividade, ao redor de 110 U/mL, com valores de pH entre 4,5 e 5 e a temperatura de 60-68°C. Já quando foi utilizada a inulina como substrato (figura 4.9), a variação do pH não influenciou a atividade enzimática (não foi estatisticamente significativo), como pode ser verificado na superfície de resposta obtida, indicando uma temperatura ótima de reação para maximização da atividade entre 50-51°C, obtendo-se um valor de 7,3 U/mL.

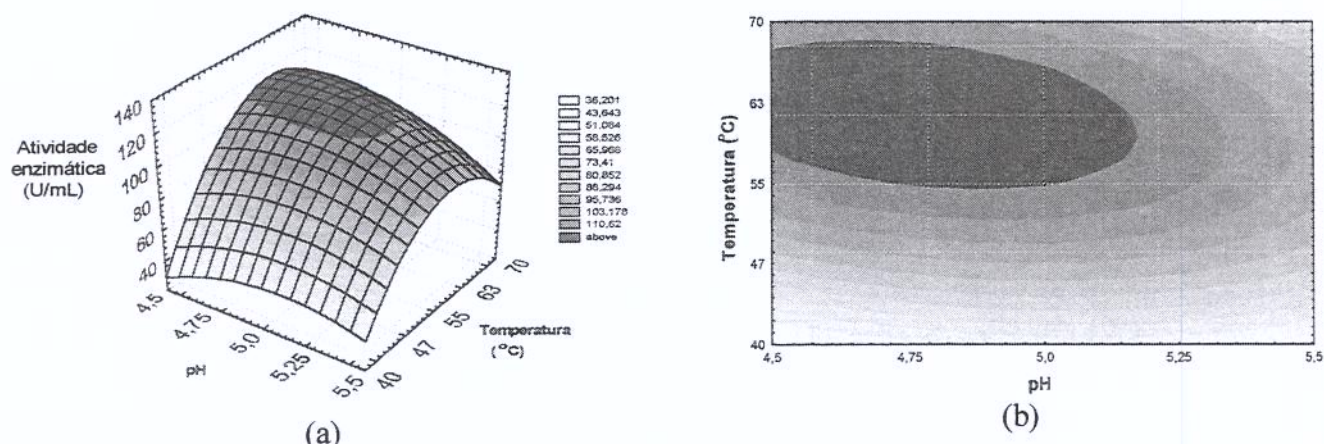


Figura 4.8: Superfícies de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a atividade da inulinase sobre a sacarose, em função do pH e da temperatura.

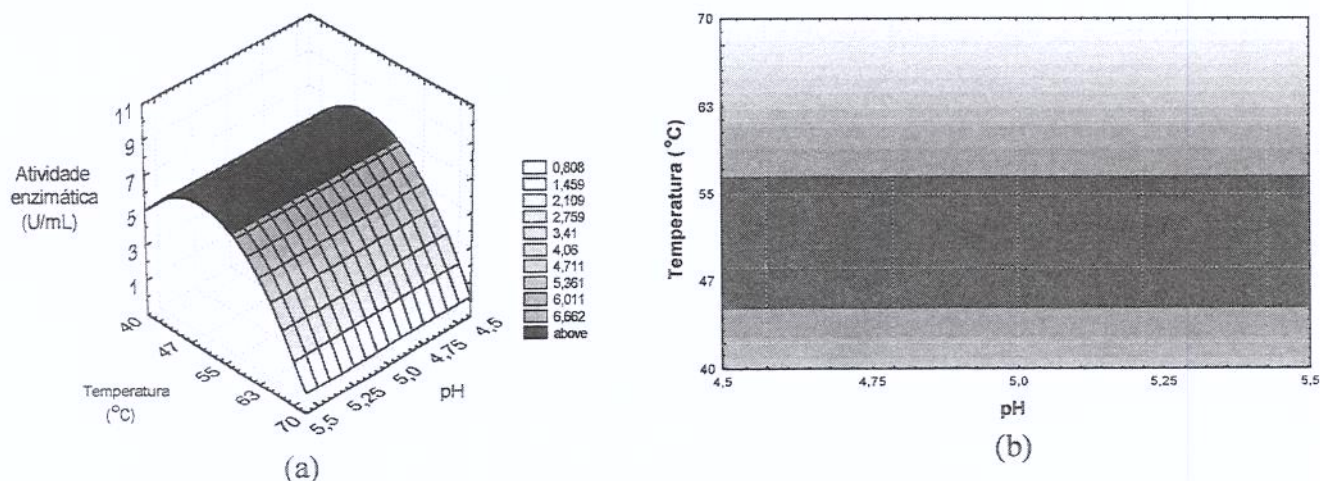


Figura 4.9: Superfícies de resposta (a) e curvas de contorno (b) para a atividade da inulinase sobre a inulina, em função do pH e da temperatura.

A temperatura ótima para hidrólise da sacarose foi maior do que para a inulina, sendo que Guerrero *et alii.* (1995) e Rouwenhorst *et alii.* (1988) reportaram o mesmo comportamento observado neste trabalho. Guerrero *et alii.* (1995) apresentaram também o perfil de pH. A variação de pH de 4 para 6 não mudou a atividade sobre a inulina, porém para a sacarose ocorreu um incremento com o pH ao redor de 5, sendo estes resultados similares para a inulinase obtida neste trabalho. Estas informações são muito interessantes ao nível de implantação industrial e de controle de processo, pois mostram que para uma boa faixa de temperatura (55 a 68°C para a sacarose e 45 a 55°C para a inulina) e pH (4,5 a 5,2 para a sacarose e 4,5 a 5,5 para a inulina) a atividade se mantém próxima da atividade ótima.

4.3 Resultados da etapa de recuperação e purificação da enzima

Neste item são apresentados os resultados de purificação, utilizando resina de troca iônica, da enzima inulinase obtida por fermentação com *Kluyveromyces marxianus*.

4.3.1 Cinética de adsorção

Os ensaios de adsorção a, b e c com atividade inicial de 19,95 U/mL, 28,57U/mL e 51,28 U/mL, respectivamente (tabela 3.2) são apresentados nas figuras 4.10, onde pode-se observar o perfil da enzima livre em solução ao longo do tempo.

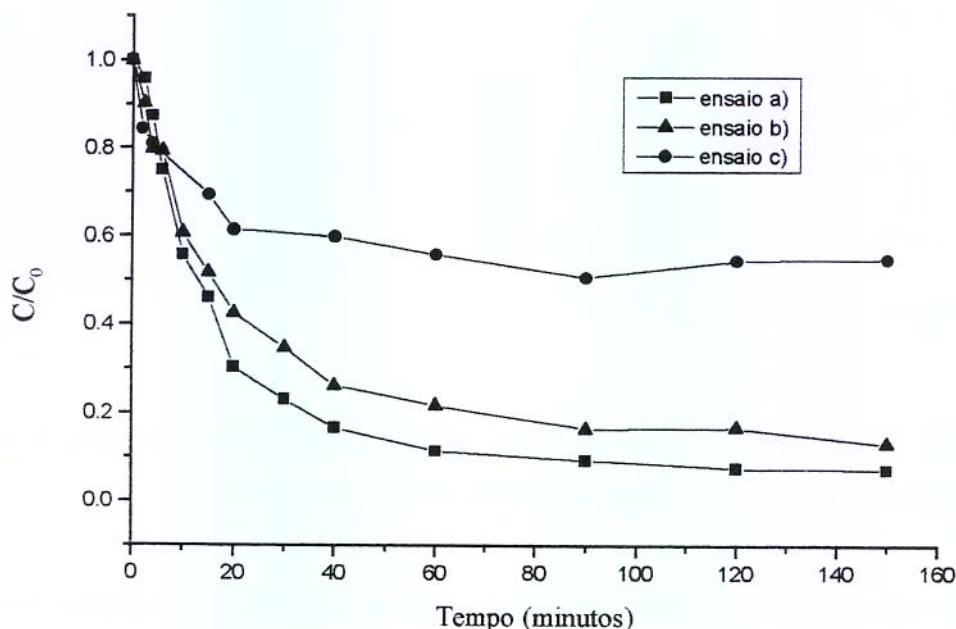


Figura 4.10: Curvas cinéticas para os testes com atividade inicial de 19,95 U/mL (a), 28,57U/mL (b) e 51,28 U/mL (c) (sistema: resina streamline SP, caldo bruto clarificado, puro ou diluído em tampão acetato, pH 3,5, temperatura de 25°C)

Conforme se verifica na figura 4.10, após 90 minutos já atingiu-se o equilíbrio para todas as curvas. Pode-se assim utilizar o tempo de 120 minutos (2 horas) para os testes subsequentes de obtenção da isoterma de adsorção. A quantidade de enzima

adsorvida em 120 minutos por mL de resina foi de 995,8 U/mL, o que corresponde a 92% da enzima adicionada ao reator para o teste a), 1284,7 U/mL de resina, o que corresponde a 83% da enzima adicionada ao reator para o teste b) e 1255 U/mL de resina, correspondendo a 45% da enzima utilizada no teste c).

Nos testes de atividade inicial de 28,57 e 51,28 U/mL (ensaios b e c) a capacidade de adsorção foi praticamente a mesma, o que indica que estes valores estão próximos do valor máximo de saturação.

4.3.2 Isoterma de adsorção

A tabela 4.20 apresenta os valores de atividade inicial (C_0 (U/mL)), a atividade em solução no equilíbrio (C^*) e a atividade adsorvida por mL de resina (Q^*), para os testes batelada de adsorção da enzima inulinase com a resina Streamline SP.

Tabela 4.20: Dados experimentais obtidos nos testes batelada de adsorção da enzima inulinase pela resina Streamline SP a 25°C

Ensaio	C_0 (U/mL)	C^* (U/mL)	Q^* (U/mL)
1A	50,3	23	1270,3
1B	50,3	23,5	1242,4
2A	39,5	15,3	1145,2
2B**		-	-
3A	36,4	11,6	1193,3
3B	36,4	11,6	1188
4A	33,6	9	1194,5
4B	33,6	8,1	1243,6
5A	28,1	3,3	1230,4
5B**		-	-
6A	23,7	1,9	1082,9
6B	23,7	1,8	1089,4
7A	20,6	1	976,6
7B	20,6	1,2	965,3
8A	19,6	1	925,9
8B	19,6	1	925,9

**dados não obtidos

O caldo utilizado para construção das isotermas está descrito no item 3.3.7.1.

A partir dos dados de C^* e Q^* foi obtida a isoterma de adsorção, conforme figura 4.11. Considerando que a isoterma se ajusta ao modelo de Langmuir, pode-se construir o gráfico $1/Q^*$ versus $1/C^*$ (figura 4.12) e obter Q_m e k_d , onde Q_m é igual a 1254 U/mL de resina e k_d 0,325 U/mL, com um coeficiente de correlação de 0,914.

Na obtenção destes dados cinéticos a maior dificuldade foi que, ao se trabalhar com uma resina com alta capacidade de adsorção, o volume de resina era pequeno para a quantidade de enzima. Portanto, qualquer diferença de análise dos valores de atividade inicial e final da solução, mesmo na ordem máxima de 5%, poderia conduzir a erros na ordem por exemplo de 100 U na adsorção por mL de resina, o que prejudicaria os resultados. Isto foi minimizado determinando-se os pontos da isoterma em duplicata. Através das análises dos brancos não foi verificada desnaturação da enzima durante este processo.

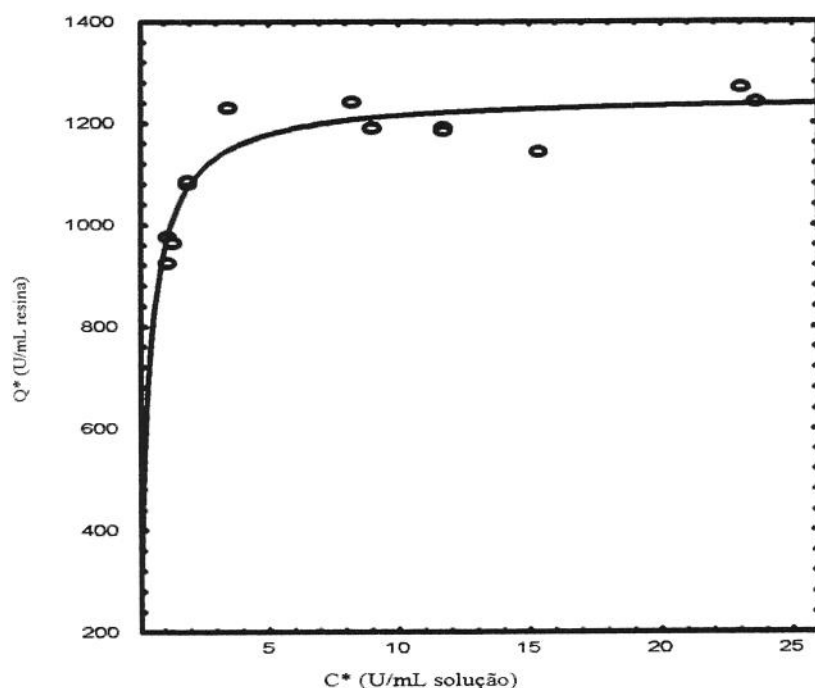


Figura 4.11: Dados experimentais de adsorção de inulinase (O) e ajuste ao modelo de Langmuir (—)

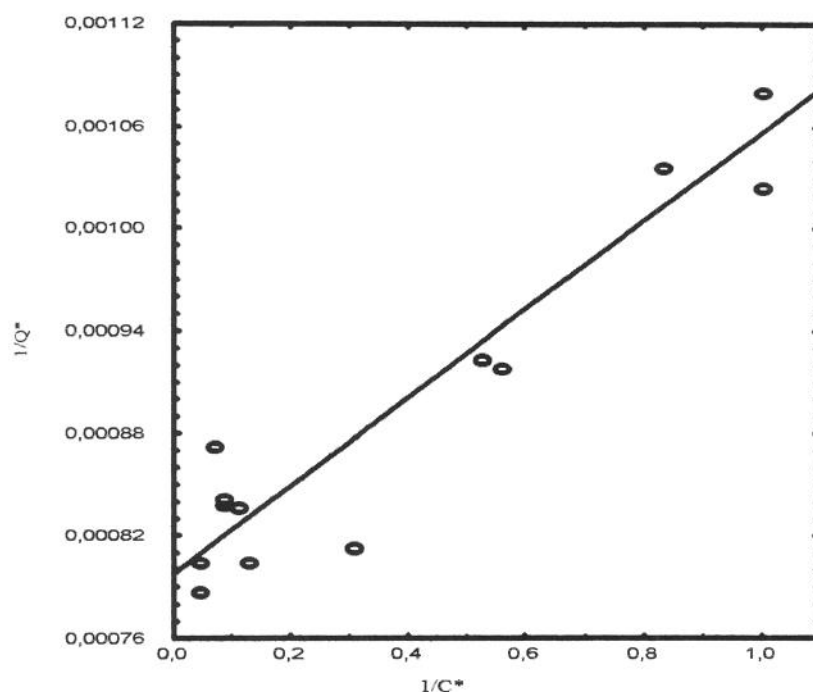


Figura 4.12: Linearização dos dados $1/q^*$ e $1/C^*$ para determinação de Q_m e k_d

4.3.3 Obtenção dos parâmetros cinéticos e de transporte de massa

Através da isoterma e dos dados de adsorção em tanque agitado, conhecendo-se Q_m , K_d e C_0 foi possível obter os valores dos parâmetros cinéticos intrínsecos (k_1 e k_2) e parâmetros de transporte de massa como difusividade efetiva (Def) e coeficiente de transferência de massa (K_s), para as três curvas de adsorção (figura 4.10), bem como a porosidade da partícula (ϵ_p), conforme apresentado na tabela 4.21.

Na tabela 4.21, o valor de k_2 foi obtido mediante a relação $K_d = k_2/k_1$ e o número de Biot foi calculado através da expressão $Bi = K_s.R/Def$

Tabela 4.21: Parâmetros obtidos no ajuste dos dados de adsorção

Parâmetros	45% de meio	60% de meio	Meio puro
$D_{ef} (cm^2/s)$	1,105 e-006	6,58 e-007	3,25e-007
$K_s (cm/s)$	5,03e-002	5,03e-004	5,03e-004
$k_1 (mL/U.min)$	6,52e-003	6,52e-003	6,52e-003
$k_2 (1/min)$	2,09e-003	2,09e-003	2,09e-003
Bi	455,2	7,6	15,5
$Q_m (U/mL resina)$	1254,1	1254,1	1254,1
$K_d (U/mL solução)$	0,32	0,32	0,32
$C_0 (U/mL)$	19,95	28,57	51,28
ε_p	0,51	0,51	0,51

A seguir estão apresentadas nas figuras 4.13, 4.14 e 4.15 as curvas cinéticas experimentais e as resultantes das simulações.

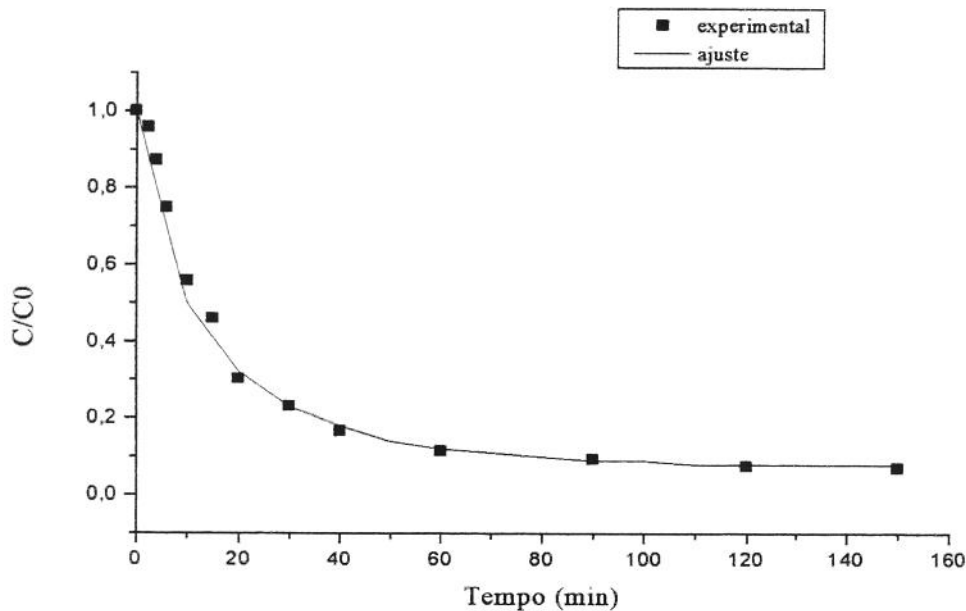


Figura 4.13: Ajuste dinâmico do ensaio com 45% de caldo bruto em tampão acetato pH 3,5, com 19,95 U/mL de atividade inicial

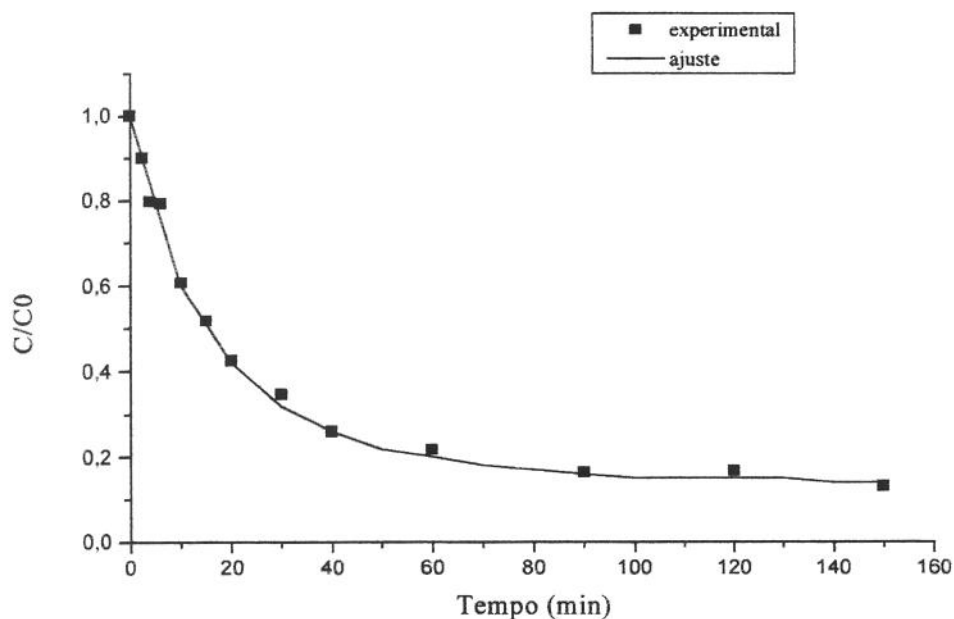


Figura 4.14: Ajuste dinâmico do ensaio com 60% de caldo bruto em tampão acetato pH 3,5, com 28,57 U/mL de atividade inicial

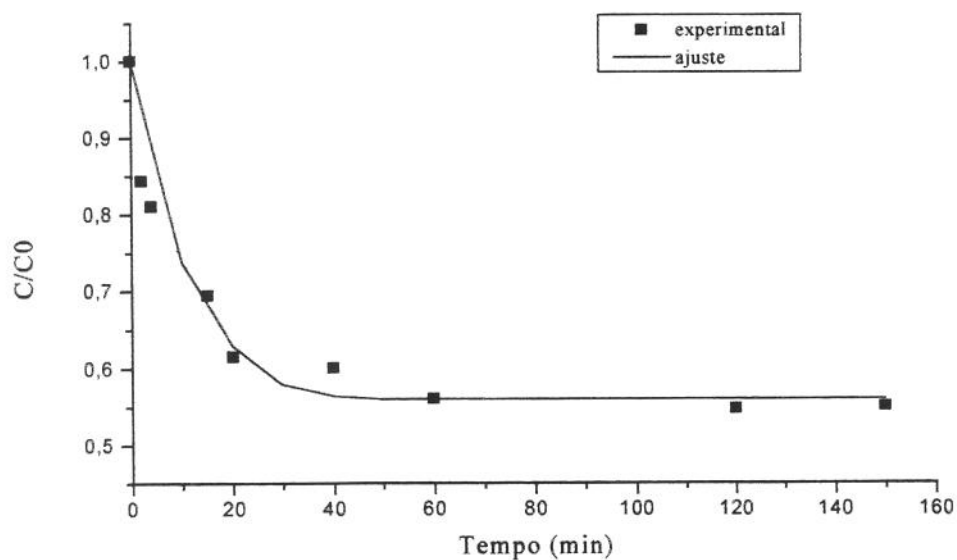


Figura 4.15: Ajuste dinâmico do ensaio com caldo bruto e 51,28 U/mL de atividade inicial

Os ensaios com 45 e 60% de caldo bruto apresentaram um ajuste muito bom com R^2 de 0,996 e 0,998 respectivamente (figuras 4.13 e 4.14). Observa-se através da Figura 4.15 que o ajuste com o caldo bruto sem diluição não foi tão bom quanto os demais (R^2 de 0,977). Isto era esperado em função da grande quantidade de interferentes presentes no meio, o que pode acarretar diferenças nas análises.

Os valores encontrados de k_1 , k_2 foram os mesmos para os três testes, indicando que a cinética de adsorção é sempre a mesma, independente da concentração de proteínas no meio (Tabela 4.21), na faixa estudada. O valor de Def aumenta conforme ocorre uma redução da concentração no meio. O valor de K_s aumenta quando a diluição do meio é de 55% (45% de meio).

Outros trabalhos já haviam relatado este mesmo comportamento. Chase & Draeger (1992), trabalhando com resina de troca iônica, observaram um aumento de Def e K_s com a redução da concentração celular do meio. Araújo (1996), trabalhando com a resina Acell Plus (troca iônica, porosidade 0,6), com adsorção de BSA em tampão Tris 0,02 mol/L pH 7,0, teve uma redução de K_s e da Def com o aumento da concentração inicial de BSA, na faixa de 1,5 a 4 mg/mL. A influência da concentração de lisozima foi estudada por Garke *et alii* (1999), onde os autores verificaram que a difusividade efetiva era dependente da concentração de proteínas do meio. A explicação dada por esses autores é que uma maior concentração de proteínas provavelmente conduz a um aumento das interações estéricas entre as moléculas e das moléculas com a parede do poro do adsorvente, o qual resultaria em uma difusão mais lenta.

4.3.4 Seleção das condições de eluição de coluna de leito fixo

A seguir são apresentados os ensaios de purificação realizados na coluna de leito fixo. A medida em que os resultados do ensaio eram obtidos, estabelecia-se os parâmetros de trabalho para o teste seguinte. A tabela 4.22 apresenta as condições utilizadas em cada ensaio.

Todos os ensaios foram realizados com uma velocidade de alimentação do meio de cultura de 300 cm/h.

Na tabela 4.23 são apresentados, para cada ensaio, para a amostra de alimentação (caldo bruto) e para a amostra de saída na eluição (Streamline SP) os dados de: volume alimentado e o coletado, atividade e proteínas totais e atividade específica (atividade por mg de proteína), bem como os resultados de recuperação e fator de purificação obtidos em cada teste. Cada um dos ensaios será discutido, isoladamente, a seguir.

Tabela 4.22: Condições utilizadas nos testes de purificação da inulinase em coluna de leito fixo.

Teste	Tipo de eluição	Veloc. na lavagem e eluição (cm/h)	Faixa de conc. salina utilizada	PH eluição
1	gradiente	150	0-1M	3,5
2	degrau	150	0,5-1M	3,5
3	degrau	100	0,5-1M	3,5
4	degrau	100	0,8-1M	3,5
5	degrau	100	1M	3,5
6	gradiente	100	0-1M	4,1
7	degrau	100	0,5-1M	4,1
8	gradiente	100	0-1M	4,5
9	gradiente	100	0-1M	5,0

Tabela 4.23: Resultados de purificação da inulinase para os ensaios realizados na coluna de leito fixo.

Teste	Frações	Vol (mL)	U total	P total (mg)	U/mg	FP*	Rec %**
1	Caldo Bruto	3	120	27	4,4	1	100
	Streamline SP	4	60,4	3,6	16,8	3,8	50,3
2	Caldo Bruto	3	119	27	4,4	1	100
	Streamline SP	6	54,7	3,9	14,1	3,2	46
3	Caldo Bruto	3	119	27	4,4	1	100
	Streamline SP	4	56,4	3,9	14,5	3,3	47
4	Caldo Bruto	3	116,7	24,6	4,7	1	100
	Streamline SP	4	35,3	2,8	12,6	2,7	30,3
5	Caldo Bruto	3	128,6	24,6	5,2	1	100
	Streamline SP	4	2,6	3,4	0,8	0,2	2,1
6	Caldo Bruto	3	120,9	26	4,6	1	100
	Streamline SP	4	81,6	2,6	30,4	6,6	67,5
7	Caldo Bruto	3	126	24,2	5,2	1	100
	Streamline SP	4	84,3	3,8	22,2	4,3	66,9
8	Caldo Bruto	3	178,3	25,3	7,0	1	100
	Streamline SP	4	9,2	2,5	3,7	0,5	5,2
9	Caldo Bruto	3	194,1	23,9	8,1	1	100
	Streamline SP	2	7,4	2,7	2,7	0,3	3,8

*FP - fator de purificação

** Rec % - percentual de recuperação

TESTE 1

O teste apresentado na figura 4.16 foi realizado com meio sem células, de atividade inicial de 40 U/mL. A resina foi equilibrada com tampão acetato pH 3,5 a 0,02 M, a seguir foram aplicados 3 mL de meio a uma velocidade linear de 300 cm/h (aproximadamente o que é utilizado quando se trabalha no leito expandido), seguidos de lavagem da resina, novamente com tampão acetato de mesma molaridade e pH empregados no equilíbrio, mantida a alimentação a 300 cm/h. A eluição foi realizada utilizando-se um gradiente linear salino, com velocidade de 150 cm/h. Conforme se observa, a enzima foi eluída com uma concentração de NaCl entre 0,8 e 0,9 M. Os resultados finais estão apresentados na tabela 4.23, onde se obteve uma recuperação de 50,3 % e um fator de purificação de 3,8 vezes.

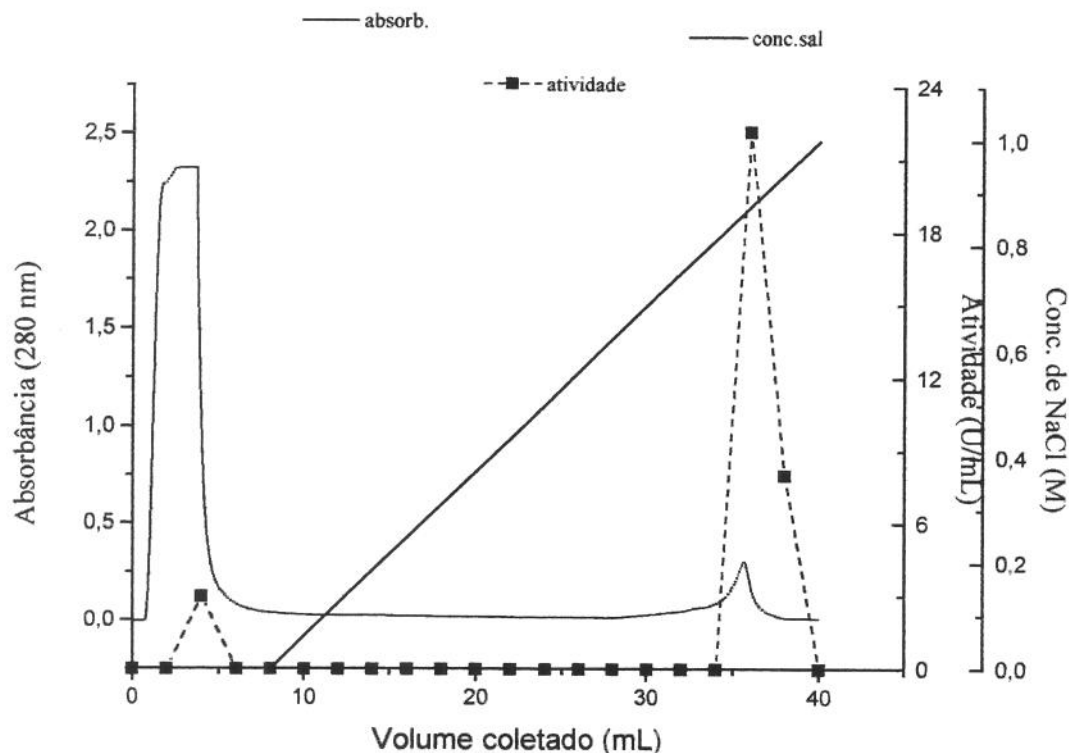


Figura 4.16: Histograma do teste 1 para purificação da enzima inulinase em coluna de leito fixo H/R 5/5 da Pharmacia preenchida com resina de troca iônica Streamline SP para leito de 4 cm de altura.

É difícil comparar os resultados obtidos com os da literatura, pois, em geral, estes têm passos preliminares antes da passagem na resina de troca iônica. AZHARI *et alii* (1989), trabalhando com inulinase fornecida pela NOVO Co. (enzima de *Aspergillus*), dialisaram inicialmente a enzima contra tampão acetato de sódio pH 4,1 e posteriormente liofilizaram a enzima. O pó foi dissolvido em água e passado em coluna catiônica CM-Sepharose. A eluição foi a pH 4,1 em acetato de sódio 0,01M e posteriormente com NaCl 0,3M em tampão. Após a coluna cromatográfica obtiveram 2 picos de atividade, com um rendimento total de 45,4% e um fator de purificação de 1,7 vezes.

TESTE 2

Em função da maior aplicabilidade em escala industrial de uma eluição do tipo degrau, foram realizados diversos ensaios para buscar reproduzir a condição do teste 1, porém com este novo tipo de eluição.

No teste 2, o procedimento foi idêntico ao teste 1 até a etapa de lavagem, porém a eluição foi feita com NaCl em tampão acetato 0,02 M pH 3,5 iniciando com concentração 0,5 M até 1M, na forma degrau, conforme se observa na figura 4.17. O caldo utilizado apresentava atividade de 40,8 U/mL. A enzima foi liberada quando a concentração de sal atingiu 1M. Os resultados finais deste teste podem ser verificados na tabela 4.23, a recuperação final sendo de 46 % e o fator de purificação de 3,2 vezes.

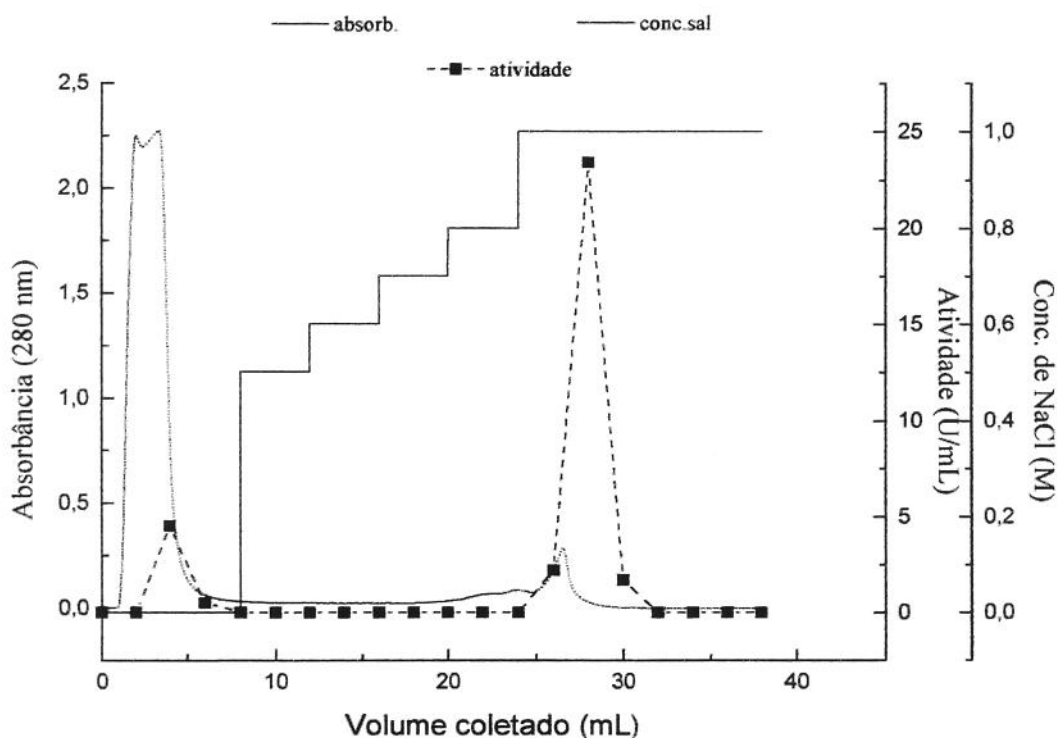


Figura 4.17: Histograma do teste 2 para purificação da enzima inulinase em coluna de leito fixo H/R 5/5 da Pharmacia preenchida com resina de troca iônica Streamline SP para leito de 4 cm de altura.

TESTE 3

O teste 3 diferiu do teste 2 somente pela velocidade empregada na eluição, que foi menor, 100 cm/h. O histograma pode ser observado na figura 4.18 e os resultados na tabela 4.23. A recuperação foi de 47 % e o fator de purificação de 3,3 vezes.

Os resultados encontrados no teste 2 e 3 foram praticamente idênticos, optando-se por trabalhar nos próximos testes com uma velocidade linear de 100 cm/h na eluição.

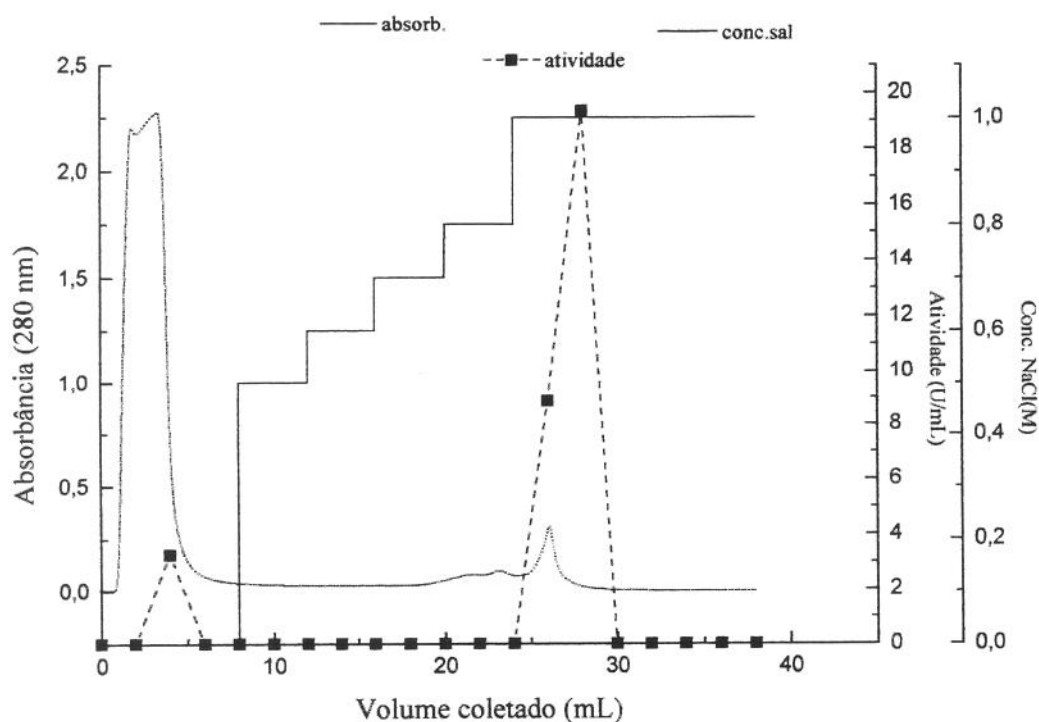


Figura 4.18: Histograma do teste 3 para purificação da enzima inulinase em coluna de leito fixo H/R 5/5 da Pharmacia preenchida com resina de troca iônica Streamline SP para leito de 4 cm de altura.

TESTE 4

No teste 4 apresentado na figura 4.19, optou-se por realizar uma eluição com menos passos alimentando diretamente com NaCl 0,8M em tampão acetato. A enzima eluiu ainda no 0,8 M e em menor quantidade que nos testes 2 e 3, com 30,3 % de recuperação somente (tabela 4.23).

Como pode ser visto nos testes anteriores do tipo degrau, a enzima eluiu somente com alta concentração salina. Uma hipótese seria a ocorrência da formação de um gradiente salino na superfície da resina e, somente quando no local da enzima o sal atinge uma determinada concentração, esta é liberada. Ao aplicar diretamente 0,8 M este gradiente seria formado mais rapidamente, promovendo a liberação da enzima mais cedo (menor volume aplicado na coluna).

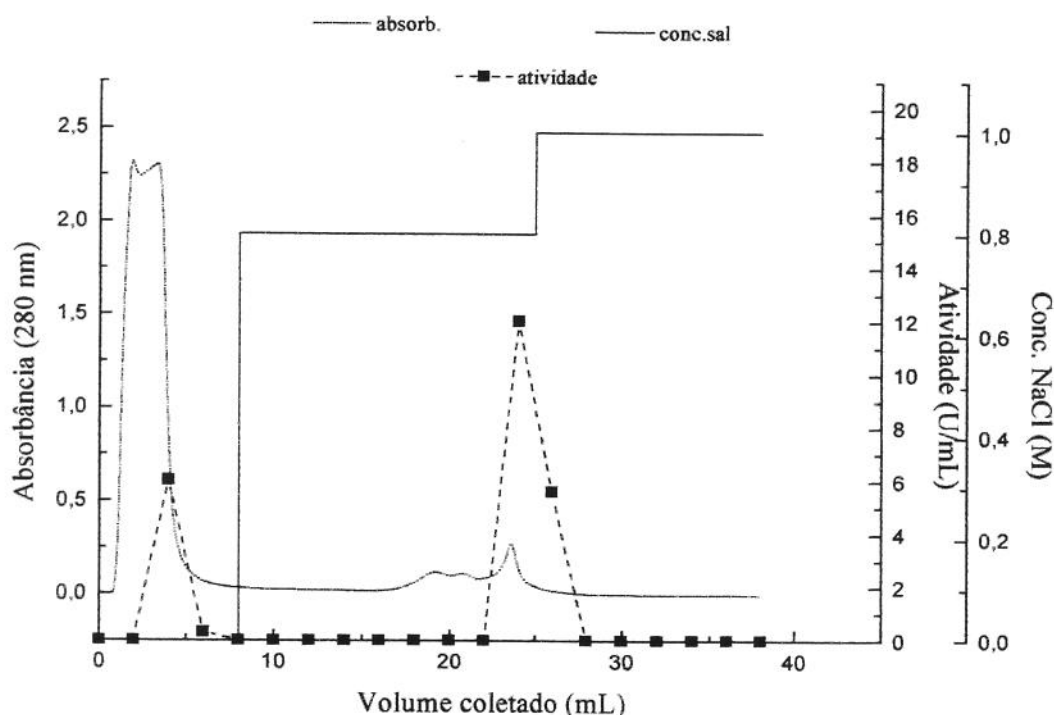


Figura 4.19: Histograma do teste 4 para purificação da enzima inulinase em coluna de leito fixo H/R 5/5 da Pharmacia preenchida com resina de troca iônica Streamline SP para leito de 4 cm de altura.

TESTE 5

Em função dos resultados encontrados optou-se por realizar um teste alimentando diretamente com 1 M (teste 5) esperando-se que, ao empregar diretamente alta molaridade, a enzima teria uma dessorção mais eficaz. Este teste está representado na figura 4.20. Apesar da elevada concentração de proteína de saída (figura 4.20), praticamente não se teve enzima na eluição (tabela 4.23), provavelmente esta se desnaturou. Este comportamento pode ter ocorrido em função do choque de contato diretamente com a alta molaridade do sal associado a um pH baixo (3,5).

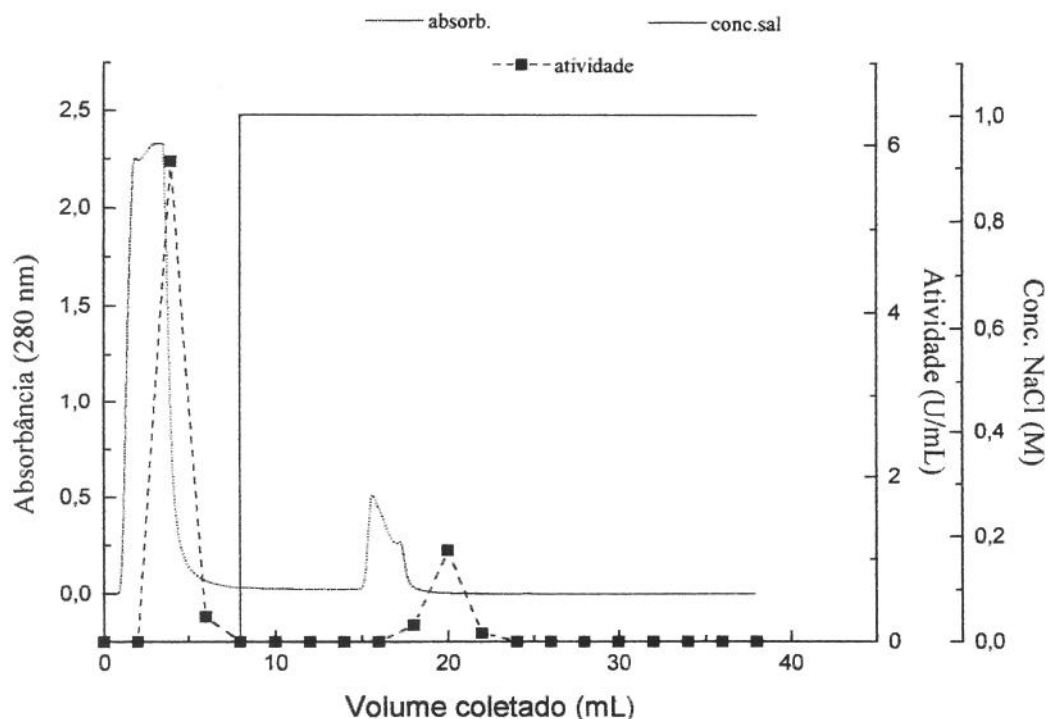


Figura 4.20: Histograma do teste 5 para purificação da enzima inulinase em coluna de leito fixo H/R 5/5 da Pharmacia preenchida com resina de troca iônica Streamline SP para leito de 4 cm de altura.

TESTE 6

Dando continuidade ao trabalho, optou-se por realizar um teste em que a eluição fosse feita a um pH acima de 3,5 de modo a buscar uma maior estabilização para a enzima. O teste 6 foi realizado conforme teste 1, que havia apresentado um bom resultado, sendo que a eluição foi feita com velocidade de 100 cm/h e com pH de 4,1. O ensaio está representado na figura 4.21.

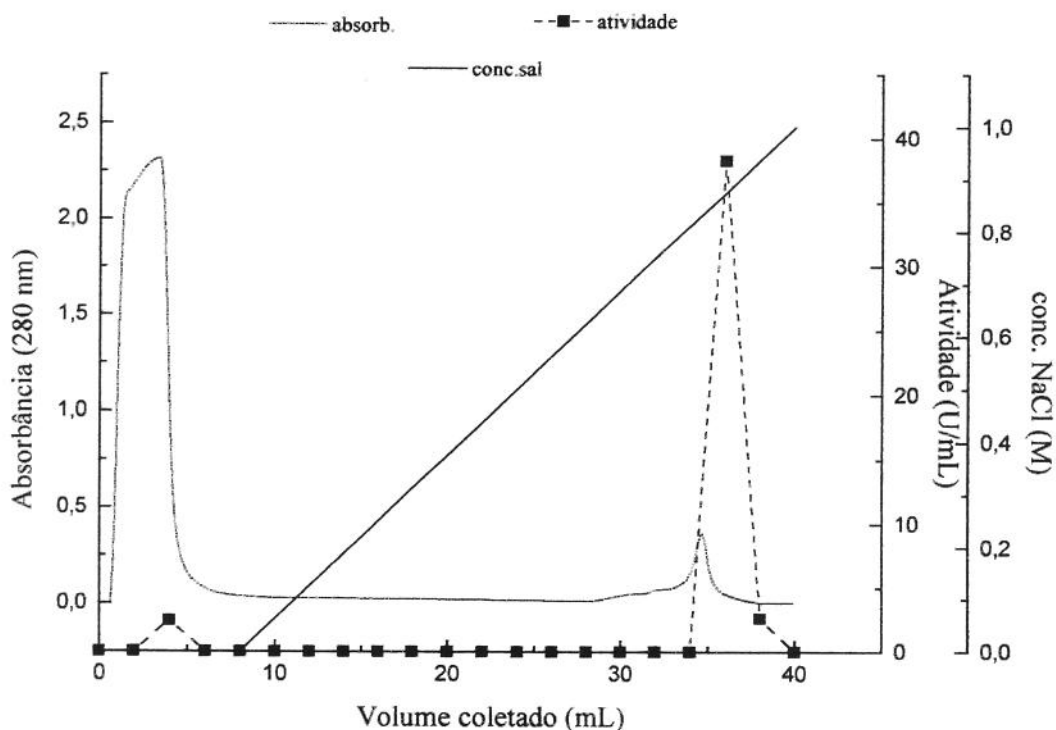


Figura 4.21: Histograma do teste 6 para purificação da enzima inulinase em coluna de leito fixo H/R 5/5 da Pharmacia preenchida com resina de troca iônica Streamline SP para leito de 4 cm de altura.

Os resultados do teste 6 estão apresentados na tabela 4.23. O comportamento neste teste foi o mesmo do teste 1, porém os resultados foram bem superiores, mostrando que um maior pH de eluição conduz a uma maior estabilização da enzima. Obteve-se uma recuperação de 67,5 % e um fator de purificação de 6,6 vezes.

TESTE 7

No teste 7 buscou-se obter o mesmo resultado do anterior porém com a eluição em degrau, conforme figura 4.22.

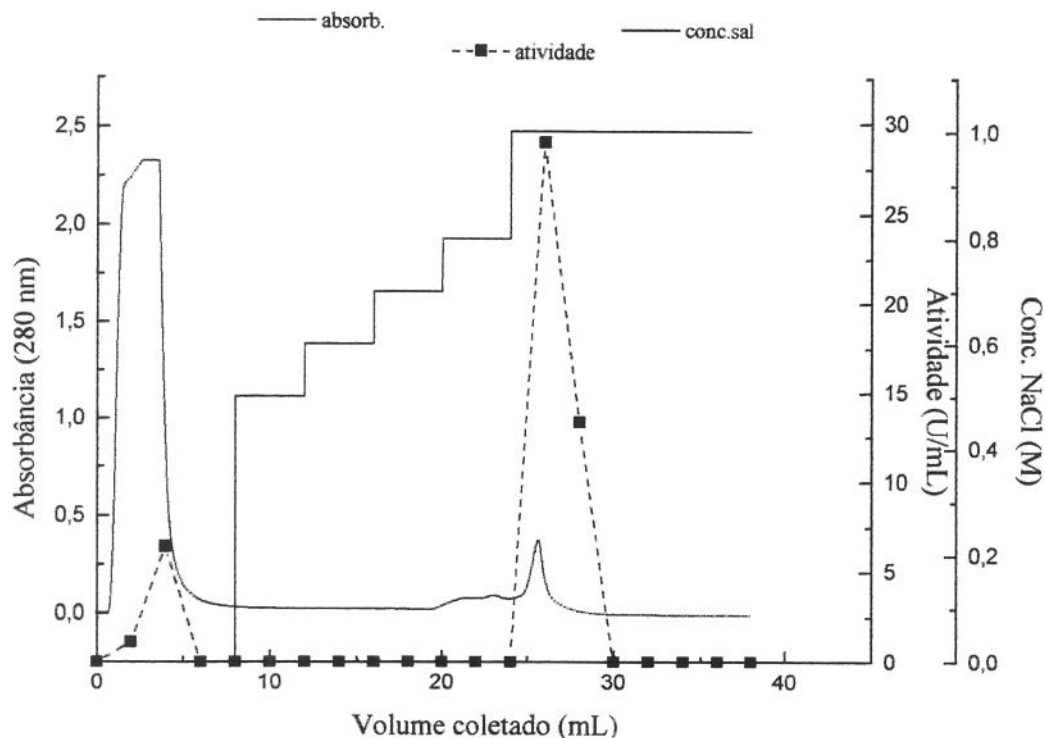


Figura 4.22: Histograma do teste 7 para purificação da enzima inulinase em coluna de leito fixo H/R 5/5 da Pharmacia preenchida com resina de troca iônica Streamline SP para leito de 4 cm de altura.

Novamente a enzima foi recuperada com NaCl em 1M, conforme teste 3. A recuperação foi de 66,9 %, praticamente idêntica à do teste anterior. O fator de purificação (4,3) foi menor porque a amostra retirada de 2 mL foi grande para estes casos, permitindo que proteínas eluídas antes da enzima acabassem se misturando com a mesma, diminuindo o resultado final expresso em U por mg de proteína.

Como se obteve melhores resultados com o pH de eluição maior que o de alimentação, ainda foram realizados dois testes, um com pH 4,5 (teste 8) e outro com pH 5,0 (teste 9), para verificar se existiria um ponto ótimo.

TESTE 8

Neste teste a eluição foi realizada com pH 4,5. O resultado obtido foi desfavorável, talvez pela enzima sair num pH próximo ao ponto isoelétrico, acarretando numa precipitação da enzima. A recuperação caiu muito, para 5,2 % (tabela 4.23), não sendo possível utilizar este pH.

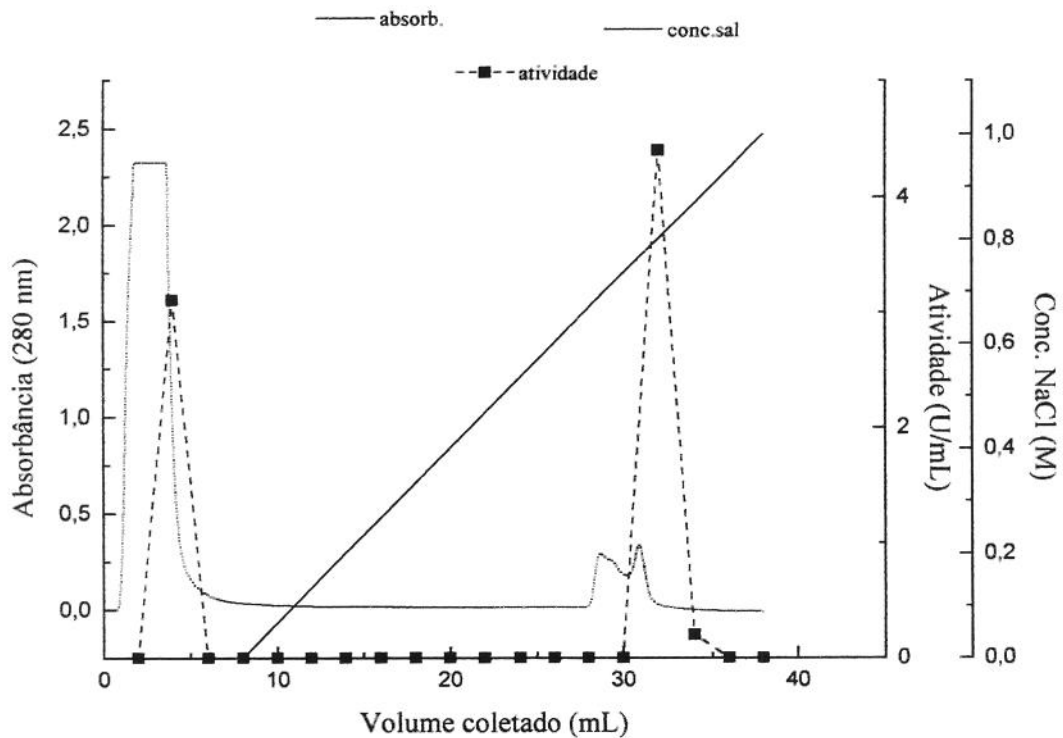


Figura 4.23: Histograma do teste 8 para purificação da enzima inulinase em coluna de leito fixo H/R 5/5 da Pharmacia preenchida com resina de troca iônica Streamline SP para leito de 4 cm de altura.

TESTE 9

Neste teste a eluição foi feita com pH 5,0. O teste mostrou resultados ainda mais desfavoráveis que o anterior, com recuperação de somente 3,8 % da enzima alimentada, mostrando que o pH não deve ultrapassar o ponto isoelétrico.

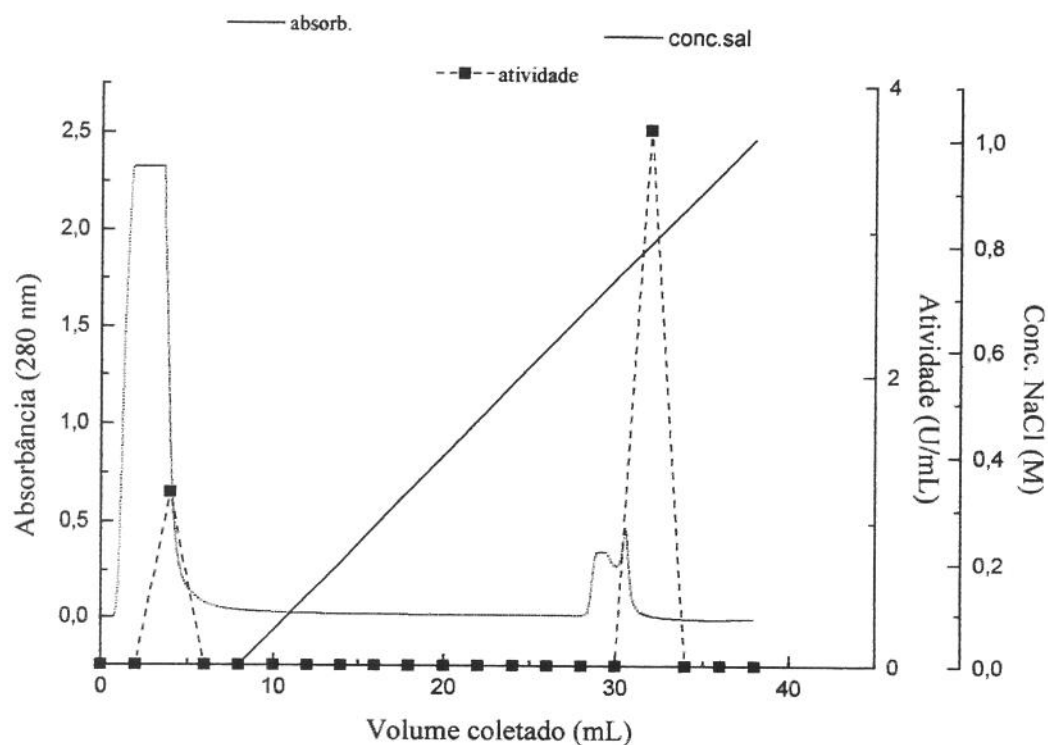


Figura 4.24: Histograma do teste 9 para purificação da enzima inulinase em coluna de leito fixo H/R 5/5 da Pharmacia preenchida com resina de troca iônica Streamline SP para leito de 4 cm de altura.

Assim, pela análise dos resultados obtidos verifica-se que as condições empregadas nos testes 6 e 7 foram as melhores, estabelecendo-se então a operação no leito expandido nas condições do teste 7 (eluição do tipo degrau, com velocidade de 100cm/h, concentração salina de 0,5 a 1 M e pH 4,1). A eluição em degrau foi escolhida por ser mais adequada para trabalho em larga escala.

4.3.5 Ensaios na coluna Streamline 25

4.3.5.1 Estudo do comportamento hidrodinâmico

As características de expansão da resina Streamline SP, como uma função da velocidade superficial para os líquidos de fluidização tampão acetato 0,02M pH 3,5 e meio de cultura, através do leito expandido, são apresentadas na figura 4.25.

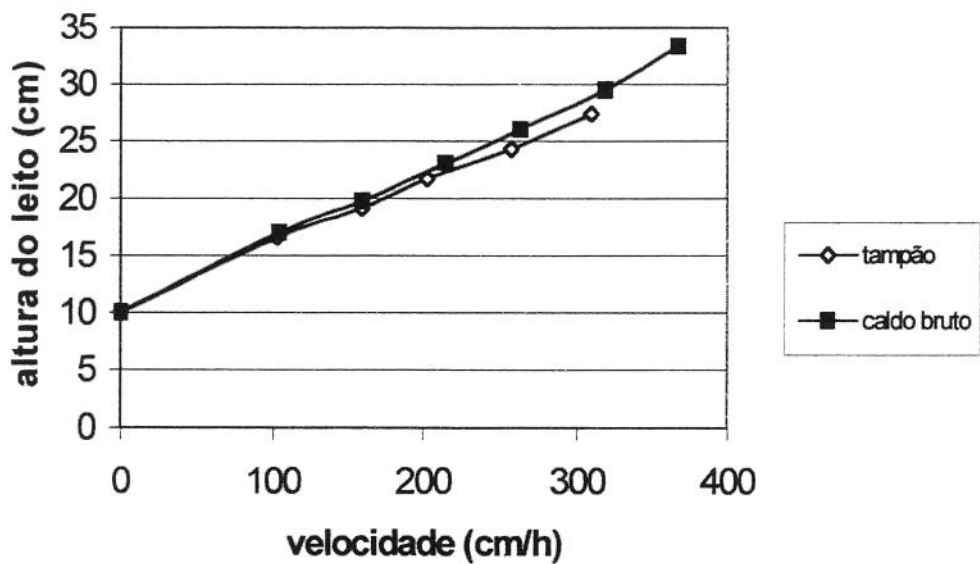


Figura 4.25: Altura de expansão do leito em função da velocidade superficial

Verifica-se uma expansão um pouco maior do leito quando aplicou-se o caldo bruto, o que já era esperado em função da maior viscosidade desta solução (tabela 4.24). Assim, para uma mesma velocidade linear aplicada, a altura atingida pela resina, ao trabalhar-se com o caldo bruto, será maior que quando aplicada uma solução tampão.

A figura 4.26 apresenta o gráfico do $\ln$ da velocidade linear pelo $\ln$ da porosidade. Para tal, foi considerada a porosidade do leito fixo como sendo 0,4 (Chang & Chase, 1996). Através do coeficiente angular, se obtém o valor do expoente de Richardson-Zaki e, a partir do coeficiente linear, se obtém a velocidade terminal.

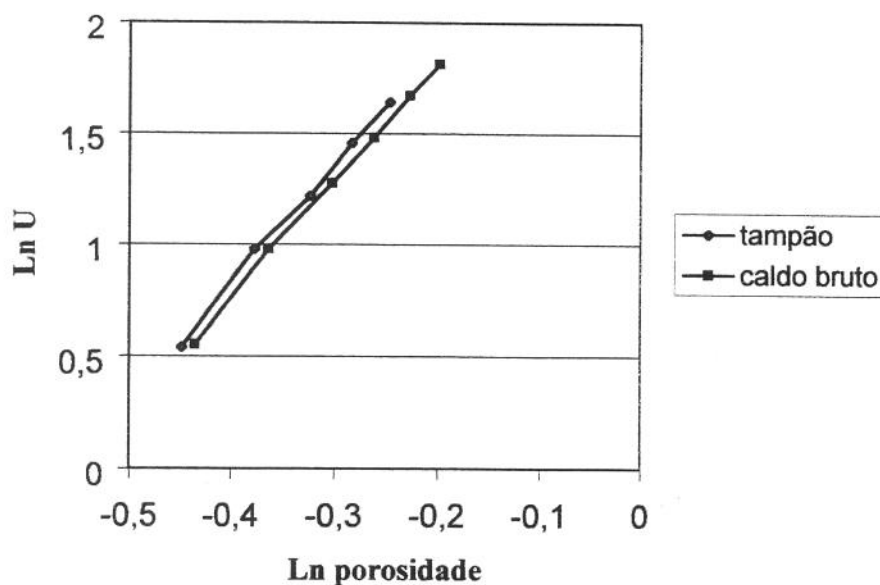


Figura 4.26: $\ln$ da velocidade versus $\ln$ da porosidade para tampão 0,02M pH 3,5 e meio de cultura

Os valores experimentais para a velocidade terminal e o parâmetro n de Richardson-Zaki são apresentados na tabela 4.24. Estes dados permitem correlacionar a velocidade aplicada ao sistema com a porosidade do leito, para o sistema em estudo.

Tabela 4.24: Dados experimentais da velocidade terminal e expoente de Richardson – Zaki para tampão acetato 0,02M pH 3,5 e meio de cultura.

Solução de fluidização	Viscosidade (Cp)	Densidade (Kg/m ³)	U_t (mL/min)	Expoente de Richardson-Zaki
Caldo bruto com células	1,0658	1012	17,6	5,3
Tampão acetato 0,02M pH 3,5	0,9398	999,8	19,8	5,4

Conforme colocado por Chase & Draeger (1992), para escoamento em regime laminar o valor usualmente obtido para n é de 4,8, que é próximo aos obtidos neste trabalho (tabela 4.24), sendo que o valor de n praticamente não variou entre um ensaio e outro.

A velocidade terminal para o caldo bruto é menor que para a solução tampão. Isto era esperado em função da maior viscosidade do caldo bruto.

Thömmes *et alii* (1995), ao trabalhar com adsorvente Biorais e com soluções de fluidização diferentes, também observou um decréscimo da velocidade terminal para o caldo com células comparada à velocidade obtida quando utilizou água no sistema. Quanto ao valor n , houve um decréscimo com o aumento da viscosidade, porém como colocado pelos autores, isto não é fácil de ser entendido.

Já Chang & Chase (1996), trabalhando com a resina Streamline SP, observaram um decréscimo da velocidade terminal e incremento de n com o aumento da densidade e viscosidade. Obtiveram n 4,71 para 0% de glicerol e 5,8 para 32% glicerol no tampão acetato 100mM pH 5,0.

4.3.5.2 Obtenção das curvas de ruptura

4.3.5.2.1 Comparação dos graus de expansão

Visando definir a melhor expansão a ser utilizada na purificação do leite expandido, foram feitas curvas de rupturas com H/H_0 de 2,0; 2,5 e 3,0, conforme apresentado na figura 4.27.

Para a realização dos testes apresentados na figura 4.27 foi realizada uma fermentação onde o meio resultante apresentou 65,64 U/mL de atividade, 5,3g/Kg de massa seca e 7,70 mg/mL de proteína no caldo bruto. O caldo, após acertado o pH para 3,5 na presença de células, apresentou uma condutividade de 9,6 mS.

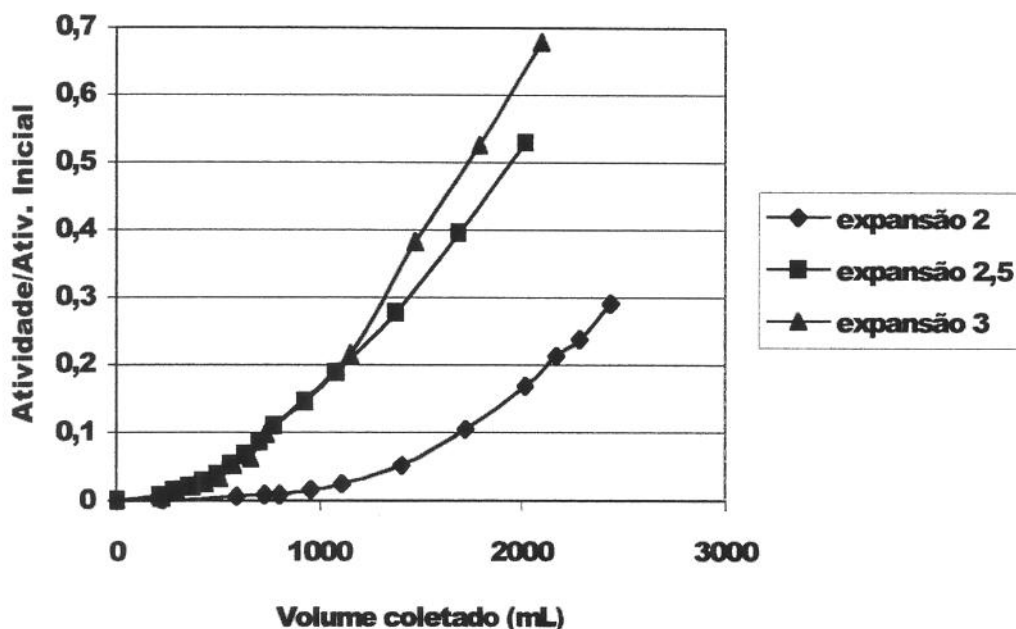


Figura 4.27: Comparação da adsorção de inulinase a diferentes graus de expansão com pH de 3,5.

Considerando o ponto de ruptura quando a concentração de saída atinge 10% da de entrada, o volume para ruptura foi de 1698 mL para expansão 2,0 e 750 mL para 2,5 e 3,0, o que significa uma capacidade de adsorção de 2219 U/mL de resina, 973 U/mL de resina e 976 U/mL de resina para as expansões de 2,0, 2,5 e 3,0, respectivamente. Assim, a expansão de 2,0 (porosidade do leito 0,7), com altura do leito de 20 cm, foi mais eficiente do que quando o leito foi expandido 2,5 ou 3 vezes, com 25 e 30 cm de altura, respectivamente, correspondendo a 0,76 e 0,80 de porosidade (baseado em uma porosidade para o leito fixo de 0,4, Chang & Chase, 1996). A adsorção da enzima na resina para a expansão de 2,0 foi cerca de 2,3 vezes maior que para a expansão de 2,5 e 3,0.

Chang & Chase (1996), trabalhando com adsorção de lisozima por resina Streamline SP, verificaram que o desempenho para uma expansão de duas vezes (porosidade de leito de 0,7) foi superior comparada ao leito expandido 4 ou 6 vezes usando 25% e 32% (porosidade de 0,85 e 0,9) de glicerol em tampão, respectivamente.

4.3.5.2.2 Curvas de ruptura para a mesma expansão e diferentes atividades

A figura 4.28 apresenta curvas de ruptura para duas diferentes atividades iniciais, mantidas as demais condições de adsorção e operação do leito iguais. Foram realizadas corridas com fermentações diferentes, porém com matéria-prima de mesmo lote, para fornecer um meio similar. A atividade final foi bem diferente, uma corrida apresentando atividade de 114,44 U/mL (7,1 mg/mL de proteína) e outra com atividade de 65,6 (7,7 mg/mL de proteína). Os testes foram realizados com uma expansão de 2,5 e pH 3,5.

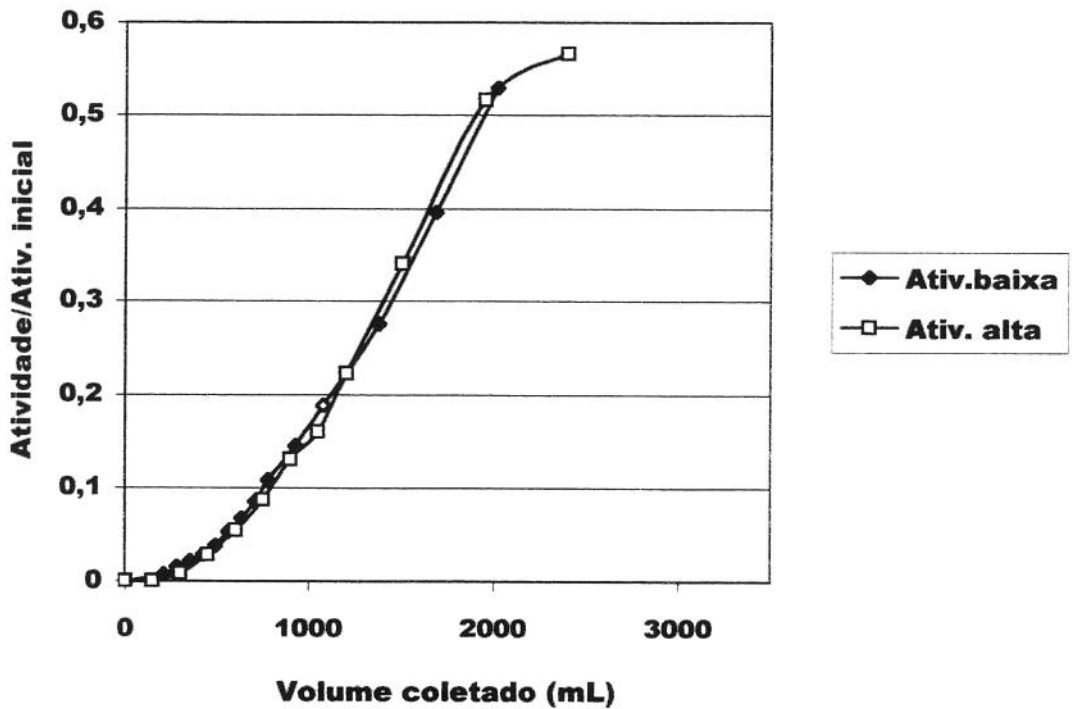


Figura 4.28: Comparação da adsorção de inulinase a diferentes atividades iniciais com grau de expansão de 2,5

Como pode ser verificado, as curvas de ruptura apresentam a mesma forma, com o mesmo ponto de ruptura, porém em termos de adsorção da enzima de interesse a capacidade será muito superior no caso do meio de maior atividade. O que pode ocorrer é que o meio de menor atividade tenha enzima, porém na forma desnaturada, o que impediria detectar sua adsorção, mas a enzima estaria ocupando sítios ativos. Portanto, cuidados

devem ser tomados para se interromper a fermentação no máximo de atividade e minimizar posterior desnaturação, como no momento de acerto de pH.

4.3.5.2.3 Curvas de ruptura para a mesma expansão (2,0) com e sem células

É importante analisar se a presença de células pode interferir na adsorção da enzima, já que a proposta do uso do leito expandido é eliminar a etapa de clarificação, porém não é interessante que hajam prejuízos na capacidade de adsorção. A figura 4.29 apresenta as curvas de ruptura da adsorção de inulinase a pH 3,5 sendo que em um meio manteve-se as células e o outro foi previamente clarificado.

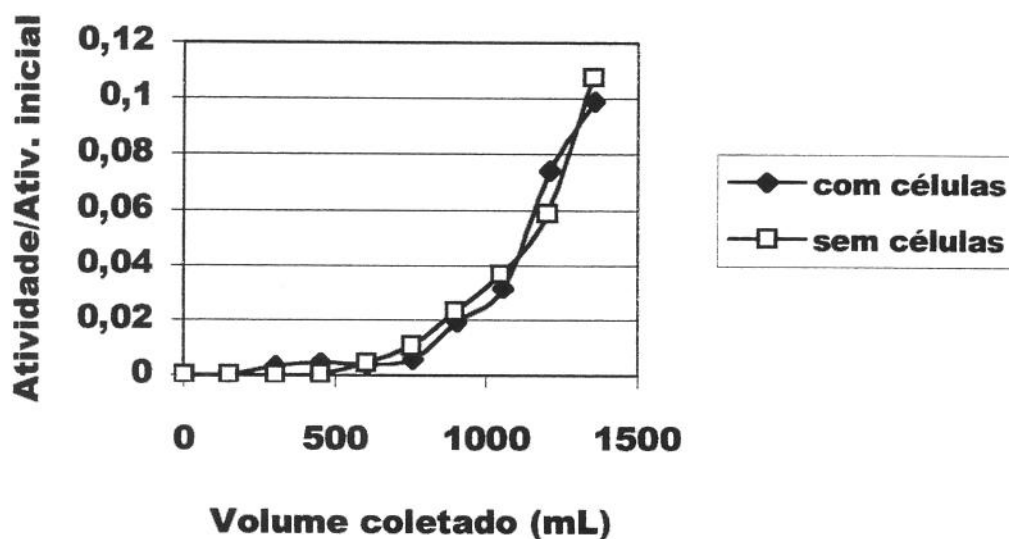


Figura 4.29: Comparativo da adsorção de inulinase para meio clarificado e não clarificado

O meio utilizado para os ensaios foi o mesmo, sendo que um teste foi feito com caldo contendo células (6,3 g/Kg de massa seca) e o outro com meio centrifugado, ambos com atividade inicial de atividade 65 U/mL. Como pode ser verificado, as curvas apresentam a mesma forma, indicando que as células não interferiram na capacidade de adsorção. Thömmes (1997) relata que as células têm, em geral, uma carga líquida negativa,

isto é favorável ao se trabalhar com uma resina catiônica, pois as células não chegam a competir com a enzima de interesse. Assim, uma independência das resinas catiônicas e por afinidade com respeito à presença de biomassa pode ser compreendida.

Chase & Draeger (1992) trabalhando com uma resina bioespecífica também não observaram maiores interferências nos parâmetros cinéticos e nos de transferência de massa com a presença de células.

3.3.5.2.4 Curva de ruptura completa para expansão 2,5 e 3,0

A seguir são apresentadas na figura 4.30 as curvas de ruptura completas, de adsorção da inulinase, para uma expansão de 2,5 e 3,0. Os meios utilizados para estes experimentos apresentavam 114 e 69,6 U/mL de atividade inicial para as expansões de 2,5 e 3,0, respectivamente.

Estas curvas não podem ser comparadas quanto ao grau de expansão porque o lote das matérias-primas utilizadas nas fermentações foi diferente, fornecendo uma curva de diferente ponto de ruptura. Já nos testes apresentados na figura 4.27, como anteriormente salientado, cuidados foram tomados para evitar outras diferenças, que não a modificação do grau de expansão.

Na figura 4.30 as curvas de ruptura completas, até a saturação, para uma expansão 2,5 e 3,0, mostraram uma capacidade de 5121,6 e 3963 U/mL de resina, respectivamente, o que é muito superior ao Q_m encontrado nos testes batelada. Batt *et alii* (1995) já haviam constatado diferenças entre os resultados obtidos no leito expandido e nos ensaios em batelada. A capacidade dinâmica que encontraram na adsorção de proteína solúvel de caldos de cultura de células de mamíferos, em coluna de leito expandido, foi de 1,33 mg de anticorpo por mL de resina, enquanto o máximo valor nos testes batelada foi de 0,76 mg/mL de resina, o que corresponde a um aumento de 75%. Os autores colocam que o sistema de mistura em batelada é um processo de um único estágio que requer mais resina e um tempo mais longo para atingir o mesmo grau de adsorção comparado a um processo de múltiplos estágios tal como o processo cromatográfico do leito expandido.

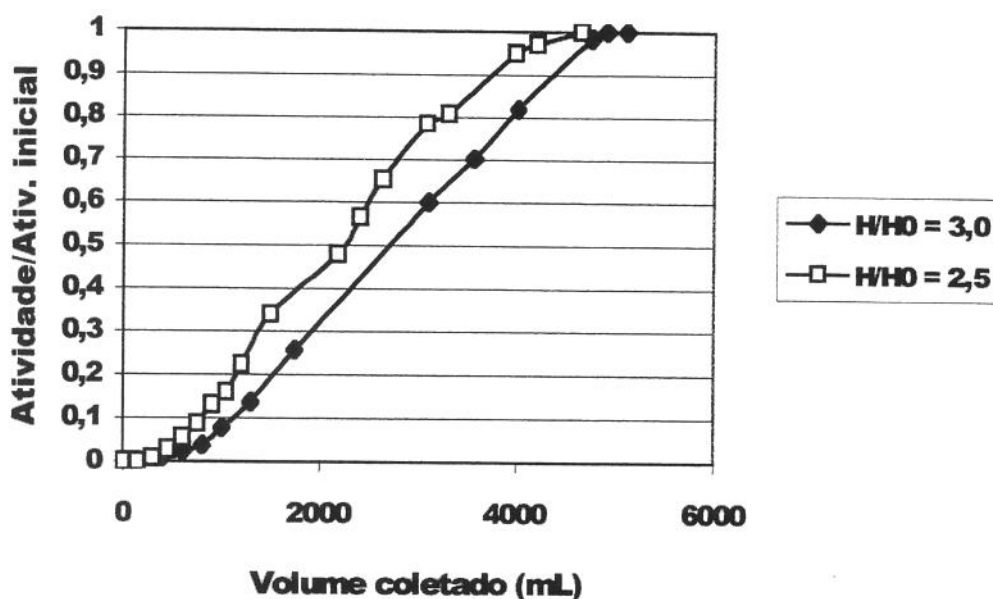


Figura 4.30: Curvas de ruptura para uma expansão de 2,5 e 3,0 de adsorção da inulinase de caldo bruto não clarificado pH 3,5.

Thömmes *et alii* (1995) trabalhando com purificação de anticorpo monoclonal, ao utilizarem a resina Streamline SP, obtiveram uma capacidade de adsorção, a partir dos testes batelada com reciclo, de 110 $\mu\text{g/mL}$. Já no modo frontal ocorreu um incremento na capacidade de adsorção, obtendo 161 $\mu\text{g/mL}$ de matriz, o que corresponde a 46% de melhora. Os autores acreditam que o fato da resina Streamline ter sido especialmente desenvolvida para operar no modo frontal permite reduzir a dispersão axial e estabilizar o leito expandido, permitindo melhorar o desempenho da resina sob estas condições.

Neste trabalho, além das causas citadas pelos autores acima, tem-se que nas curvas de ruptura os testes foram realizados com o meio logo após o término da fermentação, o mesmo não ocorrendo nos testes em batelada. Assim, estes últimos poderiam ter uma maior quantidade de enzima desnaturada, que pode também vir a ser adsorvida, porém não tem como ser quantificada, conduzindo a um menor valor de capacidade máxima. Se o meio utilizado no teste de expansão 2,5 apresentasse na verdade uma atividade de 51 U/mL

(valor inicial dos testes cinéticos) e não de 114 U/mL, sua capacidade provavelmente seria bem menor, considerando que a curva de ruptura mantivesse a mesma forma, como foi o caso apresentado no item 4.3.5.2.2.

4.3.5.3 Operação do leito para purificação da enzima

A seguir são apresentados os testes de purificação da enzima inulinase, realizados no leito expandido, com uma expansão de 2,0. O meio fermentado foi utilizado sem prévia clarificação. As condições de cada teste foram definidas conforme se obtinha os resultados do ensaio anterior. Em todos os testes a lavagem foi realizada a 300 cm/h e a eluição a 100 cm/h.

TESTE 1

No teste 1 foram mantidas as condições selecionadas no item 4.3.4 para o teste 7 (testes de purificação no leito fixo), ou seja alimentação e lavagem com pH 3,5, eluição com pH 4,1 e do tipo degrau, iniciando com concentração salina de 0,5M. O comportamento porém foi completamente diferente do esperado. Nenhuma enzima foi eluída, conforme se verifica na tabela 4.24, porém, houve um pico de saída de proteína, já no início da eluição com 0,5M e não com 1M de NaCl como seria esperado (figura 4.31) pelos resultados que haviam sido obtidos nos testes em leito fixo.

Apesar de não haver enzima eluída, a mesma foi adsorvida, ou desnaturada durante o processo de adsorção, pois pouca enzima foi liberada durante a alimentação, com atividade máxima de saída 2,1 U/mL (volume coletado de 450 mL). Foram alimentados 500 mL de caldo bruto com atividade total 48150 U, destes foram perdidos na alimentação 822,8 U, o que corresponde a somente 1,7%. A lavagem foi feita até o volume de 2282 mL, realizada com tampão acetato pH 3,5. Nenhuma enzima foi detectada durante esta operação.

Para melhor estudar a razão desta falta de enzima na eluição retornou-se a uma eluição do tipo gradiente (teste 2) com a concentração de sal variando de 0 a 1M, e o pH

sendo 3,5 para todos os passos, alimentação, lavagem e eluição, o que corresponde às condições iniciais testadas no leito fixo.

Tabela 4.25: Resultados do teste 1 de purificação da enzima inulinase

Volume coletado (mL)	Atividade (U/mL)	Abs (280 nm)	Volume coletado (mL)	Atividade (U/mL)	Abs (280 nm)
0	0	0	2685	0	0,057
150	0	2,0	2735	0	0,04
300	0,73	2,0	2776	0	0,08
450	1,41	2,0	2826	0	0,032
600	2,1	2,0	2876	0	0,037
757	1,19	2,0	2926	0	0,035
907	0	2,0	2976	0	0,068
1057	0	2,0	3026	0	0,055
1282	0	2,0	3076	0	0,052
1507	0	0,145	3126	0	0,031
1732	0	0,079	3176	0	0,028
1957	0	0,063	3226	0	0,03
2282	0	0,054	3276	0	0,023
2357	0	0,888	3326	0	0,025
2407	0	2,0	3376	0	0,034
2457	0	2,0	3426	0	0,027
2532	0	0,44	3476	0	0,02
2582	0	0,116	3526	0	0,027
2634	0	0,076			

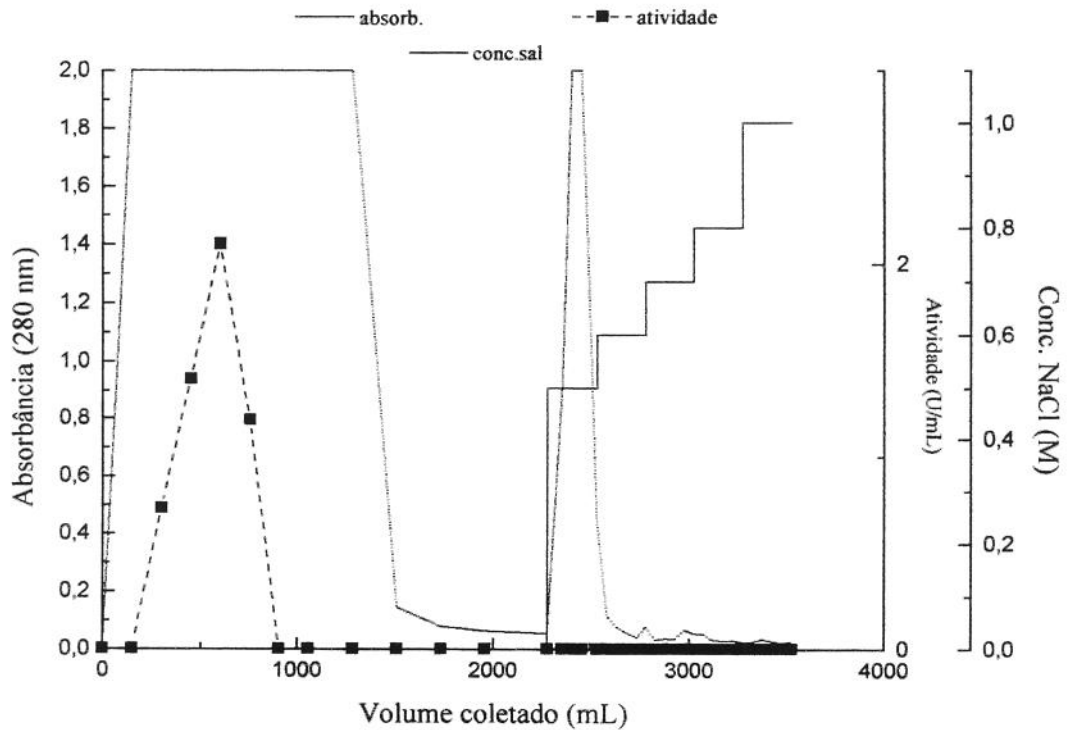


Figura 4.31: Histograma do teste 1 para purificação da enzima inulinase em coluna de leito expandido da Pharmacia preenchida com resina de troca iônica Streamline SP para expansão de leito de 2,0 com 10 cm de altura de resina sedimentada.

TESTE 2

Os resultados do teste 2 estão apresentados na tabela 4.26 e figura 4.32. Foram alimentados 1358 mL de meio com 65 U/mL de atividade enzimática, esta quantidade foi bem superior ao teste anterior, visando-se detectar alguma saída de enzima na eluição. Na alimentação houve uma perda de 4,16% do total de enzima alimentada. A eluição iniciou após 2668 mL de volume coletado.

Neste ensaio observou-se a saída de proteína com atividade na eluição (tabela 4.26), iniciando no volume de 2968,5 mL até 3220,5 mL, porém foi muito baixa, representando somente 0,22% do total alimentado (88270 U). O pico enzimático estaria ocorrendo ao

redor de 0,25-0,35 M de sal (figura 4.32). Através destes resultados suspeitou-se que o problema da baixa quantidade de enzima eluída talvez resultasse das células presentes, que poderiam liberar alguma protease que desnaturasse a enzima enquanto a mesma estivesse adsorvida. Como os testes em leito fixo haviam sido realizados com caldo clarificado, pois as células obstruíam a coluna, e não havia ocorrido este problema na eluição, o próximo teste (teste 3) foi feito com as mesmas características do teste 2, porém com o meio clarificado.

Tabela 4.26: Resultados do teste 2 de purificação da enzima inulinase

Volume coletado (mL)	Atividade (U/mL)	Abs (280 nm)	Volume coletado (mL)	Atividade (U/mL)	Abs (280 nm)
0	0	0	2718	0	0,024
150	0	2,0	2768	0	0,113
300	0,2165	2,0	2818	0	1,391
450	0,2868	2,0	2868,5	0	2,0
605	0,2435	2,0	2918,5	0	2,0
755	0,3788	2,0	2968,5	0,1082	2,0
905	1,2609	2,0	3019	1,8237	2,0
1055	2,04	2,0	3069	0,8388	2,0
1208	4,7945	2,0	3119,5	0,395	2,0
1358	6,418	2,0	3170	0,3517	2,0
1508	8,63	2,0	3220,5	0,3085	1,13
1733	0,092	2,0	3271	0	0,631
1958	0	0,632	3321	0	0,446
2183	0	0,401	3371,5	0	0,263
2408	0	0,135	3421,5	0	0,181
2568	0	0,081	3472	0	0,121
2668	0	0,025			

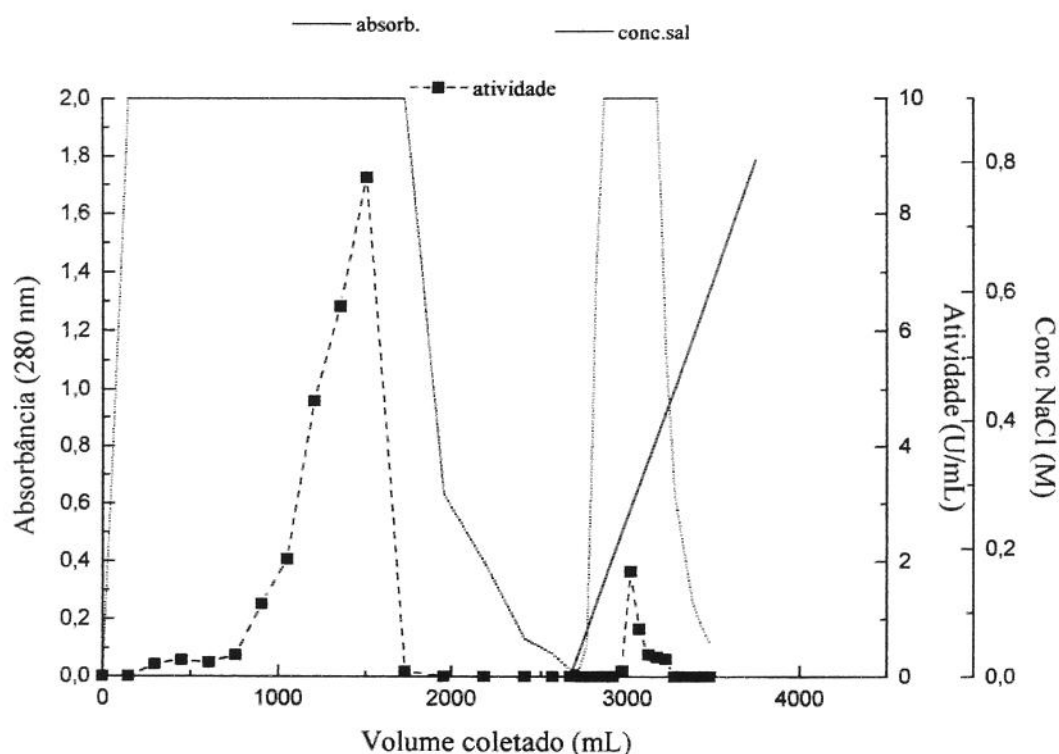


Figura 4.32: Histograma do teste 2 para purificação da enzima inulinase em coluna de leito expandido da Pharmacia preenchida com resina de troca iônica Streamline SP para expansão de leito de 2,0 com 10 cm de altura de resina sedimentada.

TESTE 3

Os resultados do teste de purificação no leito expandido, com o meio clarificado estão apresentados na tabela 4.27 e figura 4.33. Foram alimentados 1350 mL de caldo clarificado com atividade de 65 U/mL, num total de 87750 U. Na alimentação foram perdidas 3,2% em atividade enzimática do total alimentado.

Neste ensaio, apesar de ser observado um pequeno incremento na atividade total eluída, isto não chegou a ser significativo, podendo ser observado na tabela 4.27 um máximo de atividade eluída de 2,6 U/mL no volume coletado de 3091 mL. A quantidade de enzima total eluída passou de 0,22% no ensaio com caldo não clarificado para 0,5% no

meio sem células, não sendo portanto a presença destas que estava conduzindo a tão baixos valores de recuperação. Por um lado esta informação é importante, pois a operação neste leito expandido tem justamente o objetivo de eliminar a etapa de clarificação, sem prejuízos na purificação.

No teste seguinte (teste 4) voltou-se a trabalhar com o caldo não clarificado, porém optou-se por testar uma temperatura de eluição menor, de 18°C, mantendo a alimentação em 25°C.

Tabela 4.27: Resultados do teste 3 de purificação da enzima inulinase

Volume coletado (mL)	Atividade (U/mL)	Abs (280 nm)	Volume coletado (mL)	Atividade (U/mL)	Abs (280 nm)
0	0	0	2740	0	0,069
150	0	2,0	2790	0	0,121
300	0	2,0	2841	0	0,901
450	0,03788	2,0	2891	0	2,0
600	0,3626	2,0	2941	0	2,0
750	0,8658	2,0	2991	0,0649	2,0
900	1,89	2,0	3041	2,137	2,0
1050	3	2,0	3091	2,559	2,0
1200	4,74	2,0	3141	1,715	2,0
1350	8,69	2,0	3191	1,255	2,0
1500	9,69	2,0	3241	0,828	1,62
1725	0,189	2,0	3291	0,369	0,667
1960	0	0,172	3341	0	0,326
2195	0	0,13	3391	0	0,18
2420	0	0,1	3441	0	0,11
2580	0	0,092	3491	0	0,08
2690	0	0,078			

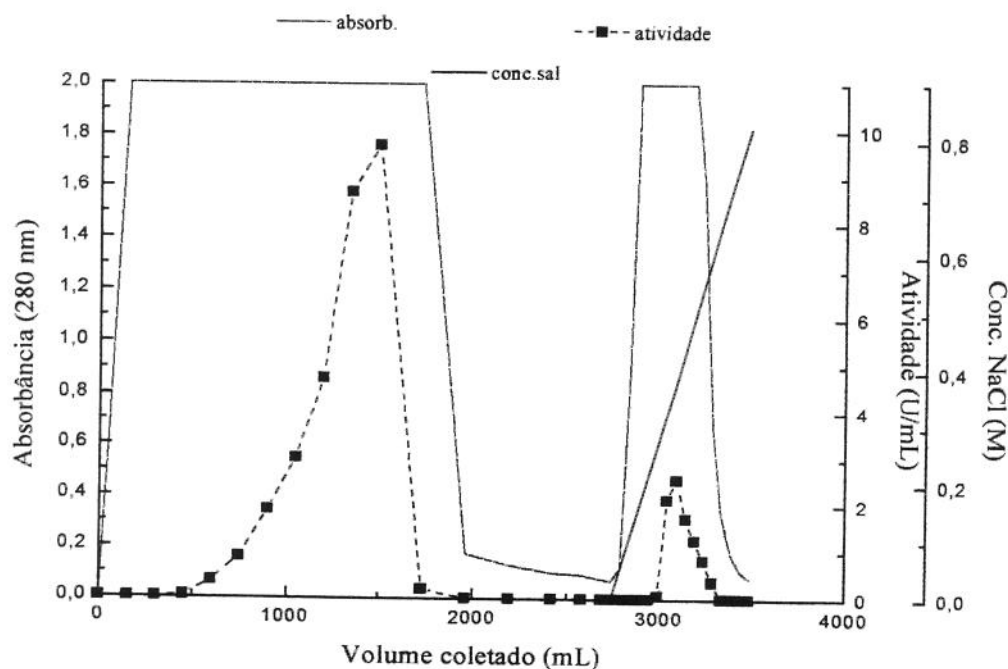


Figura 4.33: Histograma do teste 3 para purificação da enzima inulinase em coluna de leito expandido da Pharmacia preenchida com resina de troca iônica Streamline SP para expansão de leito de 2,0 com 10 cm de altura de resina sedimentada.

TESTE 4

Os resultados do teste 4, com a eluição realizada à menor temperatura (18°C), estão apresentados na tabela 4.28 e figura 4.34. Foram alimentados 1008 mL de caldo bruto com atividade inicial de 113,6 U/ mL.

A saída de enzima aumentou consideravelmente, com tubos contendo até 52 U/mL (volume coletado 2665,5 mL), porém toda enzima recuperada ainda representou somente 3,6% do total alimentado. A menor temperatura impediu uma desnaturação quase completa, mas não foi a causa principal do problema.

Uma informação importante colocada por Scopes (1988) é que o pH do microambiente de uma resina de troca iônica não é o mesmo da solução que está sendo

aplicada devido ao efeito Donnan que pode repelir ou atrair prótons na matriz adsorvente. Em geral, o pH na matriz é em torno de 1 unidade maior que da solução ao redor, no caso de resina aniônica, e 1 unidade menor no caso de resina catiônica (figura 4.35). Quanto menor a força iônica da solução ao redor, maior esta diferença.

No presente caso, estava sendo utilizado um pH de 3,5 em todo o sistema, o que resultaria em um ambiente ao redor da resina de pelo menos 2,5, o que é muito agressivo para a enzima. Costa (1986) verificou uma perda de 16 % para a enzima em contato com pH 3,0 por 6 horas. No caso do teste 1, apesar do pH da eluição ser de 4,1, ainda toda lavagem foi feita com pH 3,5.

Portanto, para verificar se um aumento de pH não conduziria a esta desnaturação, o teste seguinte (teste 5) foi todo realizado com um pH de 3,9 durante a alimentação, lavagem e eluição. Na saída, além da atividade e da absorbância acompanhou-se também o pH. Aparentemente a elevação do pH é baixa, porém este aumento não pode ser muito superior a 3,9 pois estaria próximo ao ponto isoelétrico que é entre 4,15 e 4,35.

Tabela 4.28: Resultados do teste 4 de purificação da enzima inulinase a 18°C

Volume coletado (mL)	Atividade (U/mL)	Abs (280 nm)	Volume coletado (mL)	Atividade (U/mL)	Abs (280 nm)
0	0	0	2455	0	1,144
200	0	2,0	2504	0	2,0
400	0,59	2,0	2564	0	2,0
605	1,78	2,0	2615,5	2,84	2,0
808	5,02	2,0	2665,5	52,33	2,0
1008	11,57	2,0	2716	18,51	2,0
1208	16,53	2,0	2766	3,8	2,0
1433	0	2,0	2816	2	2,0
1658	0	0,291	2866	1,3	1,772
1883	0	0,122	3016	0,71	0,772
2118	0	0,104	3066	0,39	0,421
2298	0	0,126	3117	0	0,251
2348	0	0,057	3168	0	0,131
2399	0	0,15			

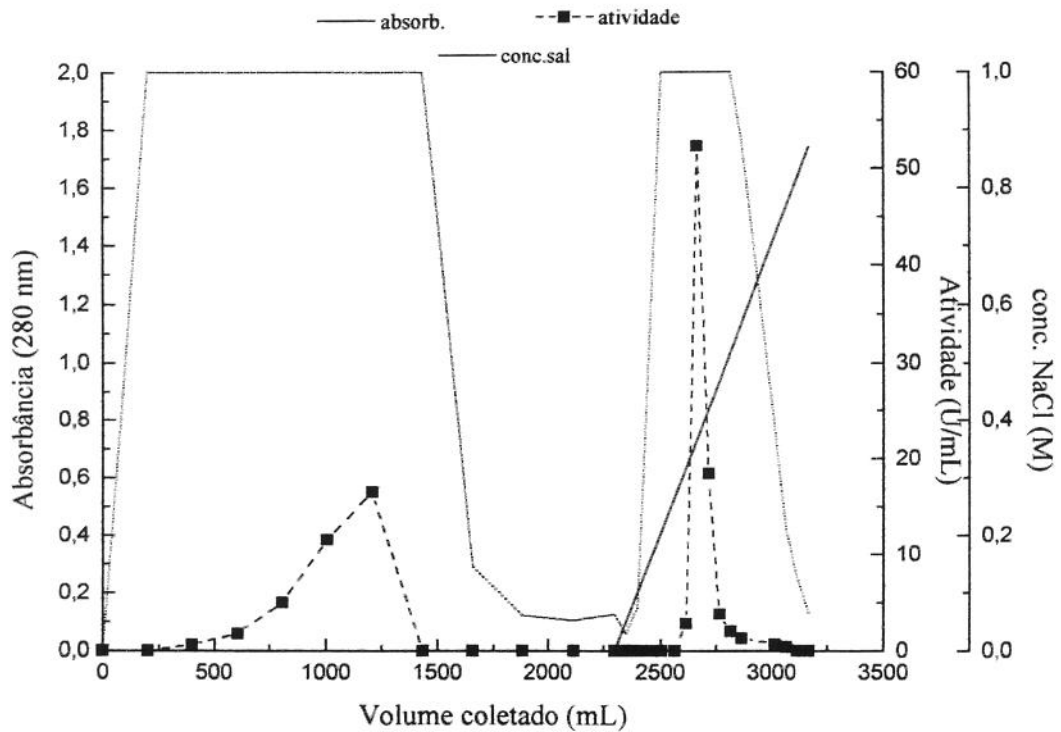


Figura 4.34: Histograma do teste 4 para purificação da enzima inulinase em coluna de leito expandido da Pharmacia preenchida com resina de troca iônica Streamline SP para expansão de leito de 2,0 com 10 cm de altura de resina sedimentada a 18°C.

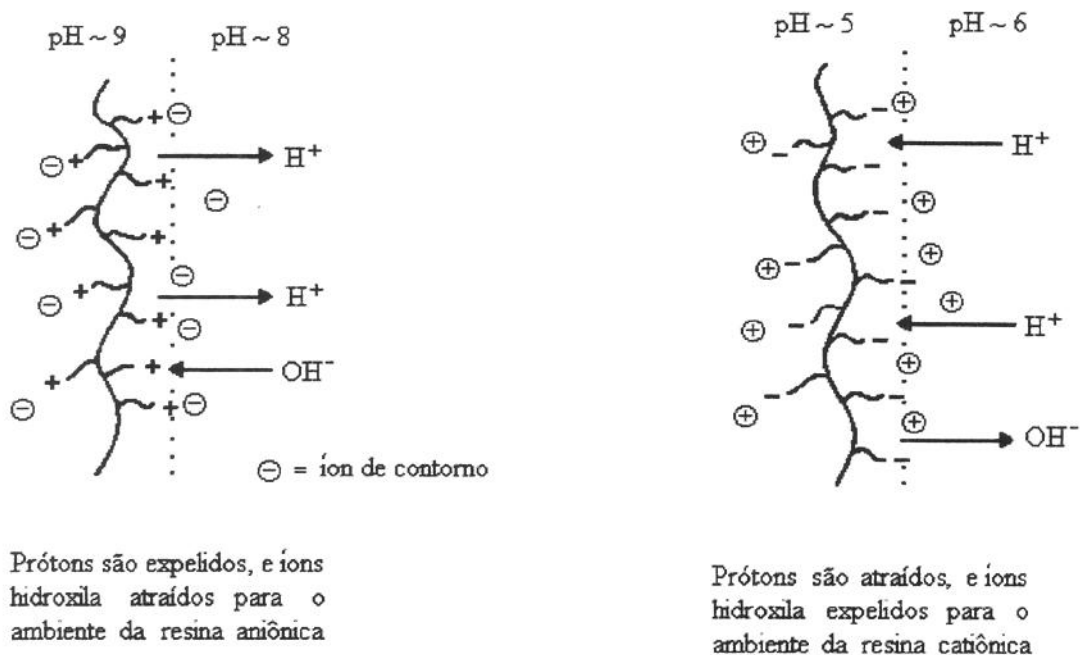


Figura 4.35: Efeito Donnan no pH do microambiente da resina de troca iônica

TESTE 5

Os resultados do teste de purificação trabalhando-se com um pH de 3,9 para todo o processo estão apresentados na tabela 4.29 e figura 4.36. Foram alimentados 600 mL de meio com atividade enzimática de 102,3 U/mL. Foram perdidos na alimentação 80,7% em termos de atividade enzimática. Isto porque o pH estava muito elevado, desfavorecendo a adsorção.

No caso da recuperação após a eluição, esta foi muito maior que as anteriores se calcularmos sobre a quantidade de enzima adsorvida e não sobre a alimentada, haja visto sua grande perda. A recuperação final foi de 68%. As maiores atividades concentraram-se nos volumes coletados de 2728 e 2779 mL (tabela 4.29) e a eluição ocorreu quando se atingiu uma concentração de NaCl ao redor de 0,3 M (figura 4.36). Um dado importante é que no momento de saída da enzima o pH para o volume de 2728 mL foi de apenas 2,9, ou seja, 1,0 abaixo do pH de alimentação. Isto provavelmente ocorreu porque à medida em que o Na^+ do sal empregado na eluição foi adsorvido, o H^+ que estava na resina foi liberado,

reduzindo o pH de saída. Isto significa que o microambiente da resina estaria a um pH inferior ao da solução de alimentação e, realmente, o efeito Donnan estaria contribuindo para a desnaturação da enzima.

Apesar de, em termos de recuperação da enzima adsorvida, o ensaio ter sido bem superior, a adsorção em si foi baixa, como pode ser observado na figura 4.36. O pico de atividade durante a alimentação foi alto mostrando que muita enzima passou pela coluna sem ser retida. Isto ocorre porque o pH do caldo de alimentação estava muito próximo do ponto isoelétrico desta enzima.

Tabela 4.29: Resultados do teste 5 de purificação da enzima inulinase

Volume coletado (mL)	Atividade (U/mL)	pH	Abs (280 nm)	Volume coletado (mL)	Atividade (U/mL)	pH	Abs (280 nm)
0	0	4	0	2568	0	3,74	0,308
200	17,3	3,98	2,0	2623	0	2,86	0,861
400	89,26	4,13	2,0	2677	0	2,98	1,445
600	90,16	4,12	2,0	2728	62,88	2,9	2,0
800	50,29	4,19	2,0	2779	80,8	3,47	2,0
1025	0,47	4,35	2,0	2831	9,39	3,8	2,0
1250	0	4,17	0,285	2881	2,77	3,89	2,0
1475	0	4,26	0,154	2931	1,61	3,88	0,876
1700	0	4,17	0,123	2988,5	0,74	3,92	0,553
1927	0	4,16	0,111	3041,5	0	3,91	0,37
2377	0	4,12	0,092	3095,5	0	3,91	0,252
2417	0	4,07	0,083	3147,5	0	3,91	0,206
2468	0	4,12	0,078	3199	0	3,9	0,169
2518	0	3,06	0,102	3250	0	3,91	0,138

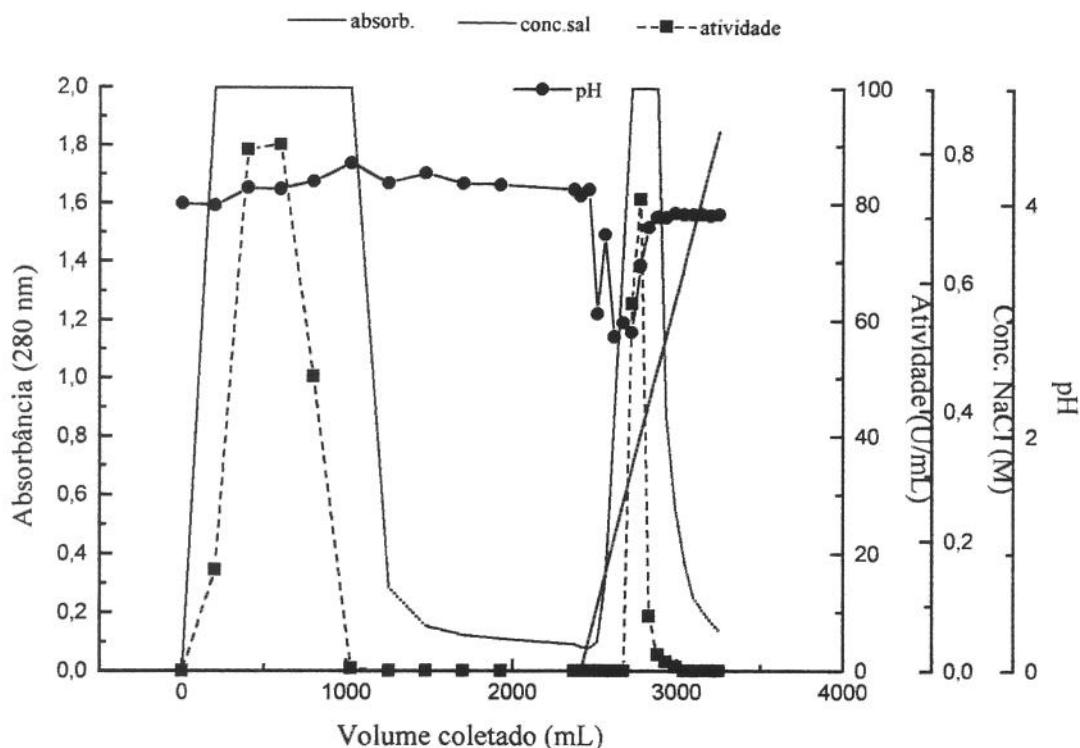


Figura 4.36: Histograma do teste 5 para purificação da enzima inulinase em coluna de leito expandido da Pharmacia preenchida com resina de troca iônica Streamline SP para expansão de leito de 2,0 com 10 cm de altura de resina sedimentada.

Quando Pessoa *et alii* (1996) realizaram testes para obtenção de isothermas de adsorção da enzima inulinase de *Candida kefir*, utilizando a resina Streamline DEAE (aniônica) e Streamline SP (catiônica), obtiveram quase que o mesmo valor de Q_m para ambas resinas. No caso, o pH mais adequado para a DEAE foi de 6,5 e para a SP foi de 4,0 (com 3,2 houve desnaturação da enzima). Os autores acharam surpreendente haver uma boa adsorção da inulinase no pH 4,0 usando Streamline SP, já que o ponto isoelétrico desta enzima seria de 3,9 a 4,3. No caso isto não é tão inesperado se for levado em conta o efeito Donnan comentado anteriormente, já que ao redor da resina o pH seria menor, permitindo a adsorção. Como os autores obtiveram resultados similares entre as resinas, se o pH no caso da resina catiônica no momento da adsorção for menor, esta apresentará um desempenho superior ao da resina Streamline DEAE. Portanto se somente no momento da alimentação o

pH fosse menor, haveria uma melhor adsorção, como já constatado pelas curvas de ruptura, e buscar-se-ia proteger a enzima através de um pH de lavagem e eluição mais altos.

Uma observação a ser feita é que, quando se trabalha com purificação de enzimas, a medida de absorbância pode não ser eficaz. Apesar de indicar a saída de proteínas, não fornece informações se a enzima está ativa ou não, o que só é verificado mediante a análise de atividade. Portanto, mesmo ao trabalhar-se com enzimas comerciais diluídas em tampão, o ideal é manter a análise enzimática.

TESTE 6

Com base nos comentários anteriores, foi delineado um novo ensaio (teste 6) mantendo o pH de alimentação em 3,5 e a lavagem e a eluição em um pH de 4,1.

Os resultados para a purificação da inulinase em leite expandido trabalhando com pH diferenciado estão apresentados na tabela 4.30 e figura 4.37. Foram alimentados 605 mL de caldo bruto com atividade de 98,3 U/mL.

A enzima foi liberada ao redor de 0,3 M de NaCl (figura 4.37), praticamente toda enzima foi adsorvida, conforme pode ser observado através da tabela 4.30, pois não há grande atividade enzimática no volume de saída durante e logo após a alimentação do caldo de cultura, bem diferente do teste 5, quando se alimentou com pH 3,9. A perda da enzima durante a adsorção totalizou 1,54% do total alimentado. A atividade na eluição atingiu valores altos de 566 U/mL. O pH na saída da coluna no momento em que se coleta a amostra foi ao redor de 3, novamente em torno de 1 unidade abaixo do valor do pH de eluição. Os resultados deste ensaio quanto à purificação estão apresentados na tabela 4.32. Obteve-se um fator de purificação de 10,3 vezes e uma recuperação de 78%. Pessoa *et alii* (1996) operando em leite expandido para purificação de inulinase, apesar de uma recuperação 93% obtiveram um fator de purificação menor, de 5,8 vezes.

Tabela 4.30: Resultados do teste 6 de purificação da enzima inulinase

Volume coletado (mL)	Atividade (U/mL)	pH	Abs (280 nm)	Volume coletado (mL)	Atividade (U/mL)	pH	Abs (280 nm)
0	0		0	1558	12,46	2,92	2,0
200	0	2,9	2,0	1608	307,87	2,85	2,0
405	0,63	3,68	2,0	1657	566,41	3,03	2,0
605	1,54	3,65	2,0	1707	59,03	3,78	2,0
805	2,4	3,71	2,0	1757	11,82	3,84	2,0
1030	0	4,2	2,0	1808	4,56	3,88	1,094
1135	0	4,15	0,492	1858	2,18	3,9	0,676
1305	0	4,12	0,078	1912	0	3,91	0,464
1355	0	4,1	0,054	1962	0	3,92	0,307
1405	0	3,76	0,117	2011	0	3,92	0,231
1455	0	3,04	0,704	2062	0	3,92	0,177
1506	0	2,87	2,0				

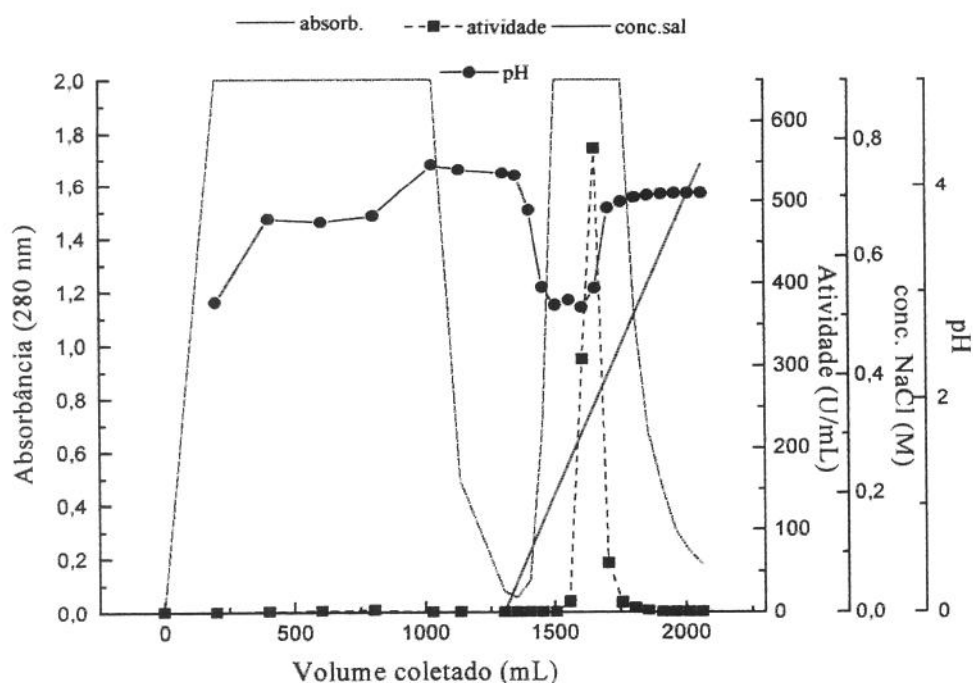


Figura 4.37: Histograma do teste 6 para purificação da enzima inulinase em coluna de leito expandido da Pharmacia preenchida com resina de troca iônica Streamline SP para expansão de leito de 2,0 com 10 cm de altura de resina sedimentada.

O resultado obtido no teste 6 foi muito bom e o próximo teste foi feito visando manter estes resultados. Assim todos os parâmetros foram iguais, com exceção da eluição que foi feita do tipo degrau, pois esta é mais facilmente reproduzida em larga escala.

TESTE 7

A tabela 4.31 e a figura 4.38 apresentam os resultados de purificação da inulinase com eluição na forma de degrau. Foram alimentados 603 mL de meio com atividade inicial de 119,1 U/mL. A perda de enzima durante a alimentação foi de 3,6%.

Foram aplicados na eluição duas concentrações salinas, conforme pode ser observado na figura 4.38, 100 mL com 0,1M e o restante à 0,5 M de NaCl. Toda enzima foi eluída na concentração de 0,5 M, com frascos de atividade de até 1065 U/mL.

É interessante observar na tabela 4.31 que a saída da enzima esteve associada à queda de pH, podendo este vir a ser um parâmetro de controle da saída do produto de interesse, sendo posteriormente confirmado através da análise de atividade enzimática.

Tabela 4.31: Resultados do teste 7 de purificação da enzima inulinase

Volume coletado (mL)	Atividade (U/mL)	pH	Abs (280 nm)	Volume coletado (mL)	Atividade (U/mL)	pH	Abs (280 nm)
0	0		0	1432	1065,72	2,64	2,0
200	0	3,02	2,0	1482	93,23	2,88	2,0
403	1,62	3,74	2,0	1532	14,33	4,02	2,0
603	4,11	3,71	2,0	1582	3,09	4,03	0,141
803	7,05	3,76	2,0	1632	0,84	4,04	0,075
1028	0	4,26	2,0	1682	0,23	4,04	0,047
1133	0	4,23	0,351	1733	0	4,04	0,033
1233	0	4,22	0,073	1783	0	4,04	0,024
1282	0	4,16	0,064	1836	0	4,04	0,019
1332	0	3,24	1,034	1887	0	4,04	0,017
1382	0	2,92	2,0				

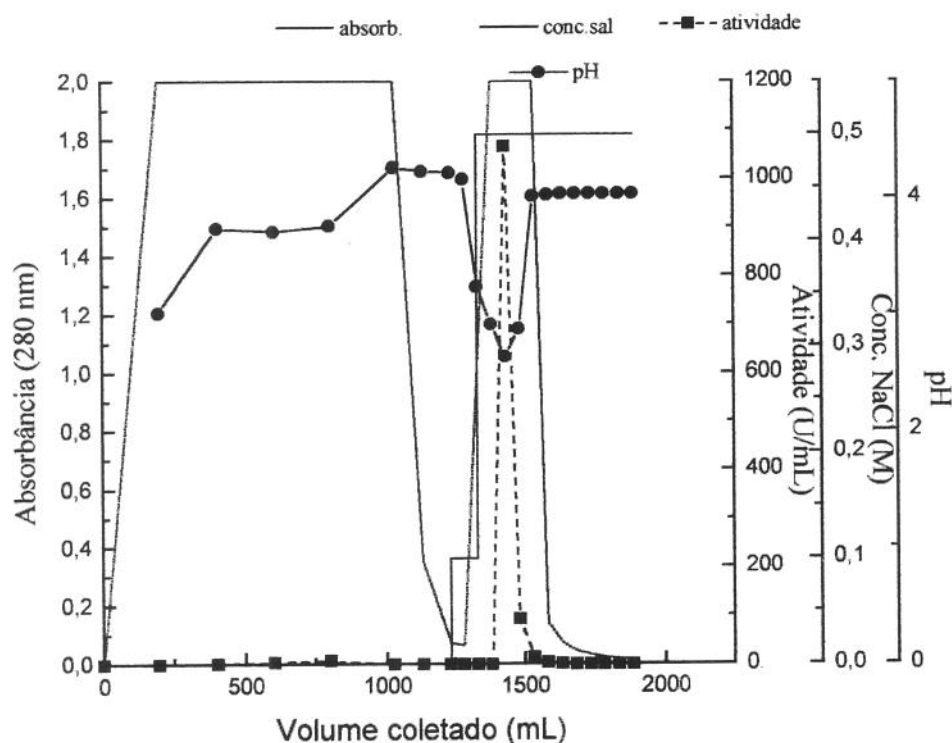


Figura 4.38: Histograma do teste 7 para purificação da enzima inulinase em coluna de leito expandido da Pharmacia preenchida com resina de troca iônica Streamline SP para expansão de leito de 2,0 com 10 cm de altura de resina sedimentada.

O fator de purificação e o percentual de recuperação para o teste degrau e para o teste em gradiente foram muito próximos (tabela 4.32) mostrando que o ensaio pode ser conduzido na forma degrau por ser mais facilmente reproduzida.

Não se encontram casos de aplicação desta resina para purificação de inulinase em leito expandido. Pessoa *et alii* (1996) trabalharam apenas na obtenção da isoterma e os dados já foram relatados anteriormente. O trabalho de Noppe *et alii* (1996) apresenta a utilização da resina Streamline SP para purificação também de uma enzima, sendo esta porém a lisozima do leite. Os autores obtiveram resultados similares ao encontrado neste trabalho, atingindo um fator de purificação de 8,3 vezes e uma recuperação de 89%.

Tabela 4.32: Resultados de purificação da inulinase para os ensaios realizados na coluna de leito expandido.

Teste	Frações	Vol (mL)	U total	P total (mg)	U/mg	FP*	Rec %**
6	Caldo Bruto	605	59471,5	4336,6	13,7	1	100
	Streamline SP	149	46099	327,4	140,8	10,3	78
7	Caldo Bruto	603	71829,4	4673,9	15,4	1	100
	Streamline SP	50	53286	332,9	160,1	10,4	74

* FP - fator de purificação

** Rec% - percentual de recuperação

Bonnerjea *et alii.* (1986) apresenta uma revisão com cerca de 100 artigos onde o fator médio de purificação para cromatografia de troca iônica está ao redor de 10, conforme apresentado na figura 4.39. Este valor está bastante concordante com os resultados obtidos neste trabalho na etapa de purificação do leito expandido.

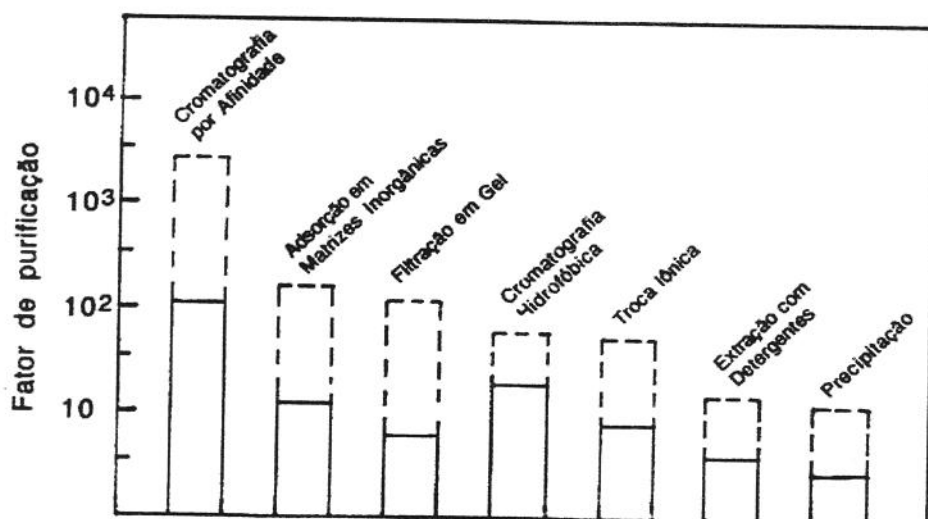


Figura 4.39: Fatores de purificação máximo (----) e médio (—) de purificações relatadas em 100 artigos, (adaptado de Bonnerjea *et alii.*, 1986).

TESTE 8

Com o objetivo de verificar a relação S/I no caldo bruto e da fração eluída foi realizado um novo teste, seguindo as condições estabelecidas no teste 7. A tabela 4.33 apresenta os resultados de atividade encontrados sobre a sacarose e a inulina e a respectiva relação S/I.

Tabela 4.33: Relação S/I na alimentação e fração eluída

Frações	Volume total (mL)	Atividade total sobre sacarose (S) (U)	Atividade total sobre inulinase (I) (U)	Relação S/I
Caldo bruto	640	68572	4396	15,6
Streamline SP	50	54740	3523	15,5

Como pode ser verificado a relação S/I não se altera quando a amostra é purificada utilizando-se a resina de troca iônica Streamline SP. Estes resultados são similares aos obtidos por Rouwenhorst *et alii* (1990) que, ao purificar a enzima inulinase de *K. marxianus* CBS 6556, utilizando resina aniônica, obteve no caldo bruto uma relação S/I de 13 e na fração eluída uma relação de 13 ± 2 , ou seja, os autores também não verificaram alterações na taxa após a recuperação da enzima.

É importante salientar que, em todos os testes realizados, não houve problemas com obstrução por células no adaptador. Após atingir a expansão desejada, o leito se mantinha estável, sendo necessário pequenos ajustes ao longo da corrida. A figura 4.40 mostra o leito em operação.



Figura 4.40: Leito expandido com resina Streamline SP, operando para purificação da enzima inulinase a partir de caldo não clarificado (com células de *Kluyveromyces marxianus*)

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho propôs-se a otimização de produção da enzima inulinase, obtendo-se um produto com alta atividade enzimática de modo a serem realizados estudos posteriores para determinação das constantes cinéticas de adsorção e parâmetros de transporte como o coeficiente de transferência de massa e a difusividade efetiva, e estudos de purificação desta enzima utilizando a resina Streamline SP em coluna de leito fixo e expandido.

A metodologia do planejamento fatorial mostrou-se muito útil para a otimização da produção da enzima inulinase, não só na obtenção de melhores valores na atividade enzimática, mas também em termos econômicos, aumentando o rendimento e a produtividade da fermentação. Dentre as variáveis estudadas no planejamento fracionário (2^{5-1}) (pH, concentração de sacarose, de extrato de levedura, de peptona e de K_2HPO_4), o pH foi o parâmetro mais importante durante a produção, e foi fixado em 3,5 por ser a condição que favorecia a atividade enzimática. O efeito da concentração de K_2HPO_4 foi baixo e assim mantido em 1 g/L (nível -1). Os efeitos da concentração de sacarose, extrato de levedura e peptona foram estudados em um planejamento fatorial completo. O incremento da concentração de extrato de levedura e peptona mostrou estar correlacionado com o aumento da atividade enzimática. Por outro lado, um incremento na concentração de sacarose conduz a um decréscimo na produção da enzima. A melhor condição para produção da inulinase foi utilizando-se: 14g/L sacarose, 10g/L extrato de levedura e 20g/L de peptona. A dinâmica da produção da enzima, utilizando-se as condições otimizadas mostrou que a máxima produção é obtida ao redor de 42 horas de fermentação.

No estudo da influência da concentração de substrato (sacarose ou inulina), pH e temperatura na determinação da atividade enzimática verificou-se que a enzima apresenta um comportamento diferente para cada substrato. A atividade da inulinase, utilizando-se sacarose como substrato, foi afetada pela temperatura e pH de reação. Os melhores resultados foram verificados com temperatura entre 60- 68 °C e pH entre 4,5 e 5, obtendo-se assim uma atividade ao redor de 110 U/mL. Quando inulina foi utilizada como substrato, a única variável estatisticamente significativa foi a temperatura, obtendo-se uma atividade

de 7,3 U/mL com 50 - 51°C. Com estas condições, a relação entre a atividade sobre a sacarose e sobre a inulina (S/I) foi igual a 15, porém é possível obter relações de 9,5 até 77,2, já que as melhores condições não são as mesmas para cada substrato. A escolha depende da aplicação desejada.

Através dos ensaios cinéticos e de equilíbrio, verificou-se que a adsorção da inulinase de caldo bruto clarificado, utilizando-se a resina de troca iônica Streamline SP, é convenientemente descrita pela isoterma de Langmuir, apresentando um Q_m de 1254 U/mL de resina e um K_d de 0,325 U/mL. O equilíbrio foi atingido após 2 horas de reação. As constantes cinéticas determinadas pelo ajuste dos dados dinâmicos foram de $6,52 \times 10^{-3}$ mL/U.min e $2,09 \text{ min}^{-1}$ para k_1 e k_2 respectivamente. Os parâmetros de transporte de massa como difusividade efetiva (D_{ef}) e coeficiente de transferência de massa (K_s) variaram conforme variou a concentração inicial da enzima no meio.

Os ensaios de purificação da enzima, em coluna de leito fixo utilizando resina de troca iônica, foram importantes para estabelecer algumas condições de purificação a serem adotadas no leito expandido. Constatou-se que o processo é mais eficiente quando o pH de eluição é superior ao de alimentação, por minimizar a desnaturação da enzima. A eluição do tipo degrau pode ser empregada sem maiores prejuízos na purificação quando comparada à eluição do tipo gradiente linear crescente.

Os ensaios conduzidos na coluna de leito expandido, utilizando o caldo bruto sem prévia clarificação, não apresentaram problemas operacionais de obstrução em função da presença de células. Através dos ensaios para estudo do comportamento hidrodinâmico em coluna de leito expandido, obteve-se expoentes de Richardson-Zaki de 5,3 e 5,4 e velocidades terminais de 17,6 cm/min e 19,8 cm/min para o caldo bruto com células e para tampão acetato 0,02M respectivamente.

Os ensaios de adsorção, quando se obteve as curvas de rupturas a diferentes graus de expansão, mostraram que uma expansão de 2 vezes (porosidade de leito de 0,7) é mais eficiente quando comparado às expansões de 2,5 e 3,0. Já a presença de células não afeta o processo de adsorção nas condições trabalhadas, com as curvas de ruptura mantendo a mesma forma com e sem massa celular.

Verificou-se que, devido ao efeito Donnan, o ambiente ao redor da resina se encontra em um pH de 1 unidade abaixo do de alimentação, portanto o pH de lavagem e de eluição da enzima devem ser superior ao de alimentação, para evitar desnaturação da enzima.

O teste de purificação final, conduzido na coluna de leito expandido, apresentou uma recuperação de 74% e um fator de purificação de 10,4 vezes. Estes resultados foram obtidos operando-se com uma expansão de 2,0, alimentação a pH 3,5, lavagem a pH 4,1 e eluição do tipo degrau com velocidade de 100 cm/h e pH de 4,1.

Assim, neste trabalho foi possível um incremento significativo na etapa de otimização da produção da enzima, partindo-se de 9 para 110 U/mL. Foi possível então, o estudo da recuperação e purificação da inulinase, a partir do caldo bruto numa única etapa através da utilização do leito expandido, contendo resina de troca iônica STREAMLINE SP. Atingiu-se um fator de purificação igual a 10 vezes e recuperação de 74%, sem problemas operacionais devido à presença de células no caldo bruto. Este resultado é muito importante ao nível de viabilização de um processo biotecnológico, pois elimina várias etapas intermediárias. É sabido que as etapas de separação e purificação de enzimas representam mais da metade do custo de instalação de uma planta industrial e o desafio atual é, não só selecionar os melhores microrganismos, condições de cultivo e operacionais do processo de fermentação, mas também o melhor processo de recuperação e purificação do produto desejado.

6 SUGESTÕES

Quanto à produção da enzima:

Estudar a influência da agitação e aeração do processo em sistema batelada e verificar a produção da enzima em sistema batelada alimentada ou em processo contínuo, mantendo baixo o nível de substrato em função da repressão catabólica ocasionada pela sacarose.

Estudar meios alternativos de produção da inulinase de modo a minimizar custos de produção, ocasionados principalmente pela elevada concentração de peptona e extrato de levedura.

Quanto ao processo de purificação:

Desenvolver um modelo matemático que represente bem o sistema de adsorção no leito expandido, podendo-se assim realizar uma simulação deste. Pode-se assim conhecer melhor as características do sistema, auxiliando na etapa de mudança de escala.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, M. O. D. **Adsorção de albumina de soro bovino em resinas trocadoras de íons**. Campinas, 1996. 85p. Tese (Mestre em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade estadual de Campinas.
- AZHARI, R.; SZLAK, A. M.; ILAN, E.; SIDEMAN, S.; LOTAN, N. Purification and characterization of endo- and exo-inulinase. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Duluth, v. 11, n. 1, p. 105-117, 1989.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2 ed. Singapore: McGraw-Hill Book Company, 1986. 984p.
- BARBOZA, M. **Estudo cinético de adsorção, modelagem dinâmica e otimização de processo contínuo de purificação de cefalosporina C**. Campinas, 1998. 167p. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade estadual de Campinas.
- BARTHOMEUF, C.; REGERAT, F.; POURRAT, H. Production of inulinase by a new mold of *Penicillium rugulosum*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 72, n. 6, p. 491-494, 1991.
- BATT, B. C.; YABANNAVAR, V. M.; SINGH, V. Expanded bed adsorption process for protein recovery from whole mammalian cell culture broth. **Bioseparation**, Dordrecht, v. 5, n. 1, p. 41-52, feb., 1995.
- BELAMRI, M.; SASSI, A. H.; SAVART, M.; TANTAOUI-ELARAKI, A.; COTTIN, P. Purification and properties of an extracellular inulinase-like β -fructosidase from *Bacillus stearothermophilus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 19 n. 6, p. 410-413, dec., 1994.
- BELTER, P. A.; CUSSLER, E. L.; HU, W. **Bioseparations: downstream processing for biotechnology**. New York: John Wiley & Sons, 1988. 368 p.

- BLANCH, H. W.; CLARK, D. S. **Biochemical Engineering**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1997. 702 p.
- BONNERJEA, J.; OH, S.; HOARE, M.; DUNILL, P.; Protein purification: The right step at the right time. **BioTechnology**, New York, v. 4, p. 954-958, 1986.
- BJURSTROM, E. E. Biotechnology: fermentation and downstream processing. **Chemical Engineering**, New York, v. 92, n. 4, p. 126-158, feb., 1985.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters: An introduction to design, data analysis, and model building**, New York: John Wiley & Sons, 1978. 653p.
- BURRIL, G. S.; ROBERTS, W. J. Biotechnology and economic development: the winning formula. **Bio/Technology**, New York, v. 10, n. 6, p. 647-653, jun., 1992.
- CHANG, Y. K.; McCREATH, G. E.; DRAEGER, N. M.; CHASE, H. A. Novel technologies for direct extraction of proteins. **TranslChemE**, London, v. 71, Part B, p. 299-303, may, 1993.
- CHANG, Y. K.; McCREATH, G. E.; CHASE, H. A. Development of an expanded bed technique for an affinity purification of G6PDH from unclarified yeast cell homogenates. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.48, n. 4, p. 355-366, 1995.
- CHANG, Y. K.; CHASE, H. A. Development of operating conditions for protein purification using expanded bed techniques: the effect of degree of bed expansion on adsorption performance. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.49, n. 2, p. 512-526, 1996.
- CHASE, H. A. Prediction of the performance of preparative affinity chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 297, p. 179-202, aug., 1984 a.

- CHASE, H. A. Affinity separations utilising immobilised monoclonal antibodies - a new tool for the biochemical engineer. **Chemical Engineering Science**, Oxford, v. 39, n. 7/8, p. 1099 - 1125, 1984 b.
- CHASE, H. A.; DRAEGER, N. M. Affinity purification of proteins using expanded beds. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 597, n. 1/2, p. 129-145, apr., 1992.
- COLLINS, C. H. Princípios básicos de cromatografia. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 6 ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1995. p. 11-27.
- COSTA, F. A. A. **Contribuição ao estudo de produção de invertase extracelular por leveduras**. Campinas, 1986. 106p. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade estadual de Campinas.
- CRITTENDEN, R.G.; PLAYNE, M. J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 7, n. 11, p. 353-361, nov., 1996.
- CRUZ, J. M.; SANTANA, C. C. Adsorção e eluição de insulina em leito fixo e fluidizado de resina trocadora de íons. In: ENEMP, 1996, Uberlândia. **Anais**. Uberlândia: Editora da Universidade Federal de Uberlândia, 1997. p. 568-573.
- DASARI, G.; PRINCE, I.; HEARN, M. T. W. High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins. **Journal of Chromatography**, v. 631, n. 1/2, p. 115-124, feb., 1993.
- EFSTATHIOU, I.; REYSSET, G.; TRUFFAUT, N. A study of inulinase activity in the *Clostridium acetobutylicum* strain ABKn8. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 25, n. 2, p. 143-149, 1986.
- ELYACHIOUI, M.; HORNEZ, J.P.; TAILLIEZ, R. General properties of Extracellular Bacterial Inulinase. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.73, n. 6, p. 514-519, 1992.

- ETTALIBI, M.; BARATTI, C. Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinases and endoinulinases of *Aspergillus ficuum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 26, n. 1, p. 13-20, 1987.
- FREITAG, R.; HORVÁTH, C. Chromatography in the downstream processing of biotechnological products. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, Berlin, v. 53, p. 17-59, 1995.
- FREJ, A. K. B.; HJORTH, R.; HAMMARSTRÖM, A. Pilot scale recovery of recombinant annexin V from unclarified *Escherichia coli* homogenate using expanded bed adsorption. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 44, n. 8, p. 922-929, 1994.
- GARIBAY, M. G.; RAMÍREZ, R. Q.; CANALES, A. L-M. **Biotecnología Alimentaria**. 1 ed. México: Editorial Limusa, 1993. 636p.
- GARKE, G.; HARTMANN, R.; PAPAMICHAEL, N.; DECKWER, W. D.; ANSPACH, F. B. The influence of protein size on adsorption kinetics and equilibria in ion-exchange chromatography. **Separation Science and Technology**, New York, v. 34, n. 13, 2521-2538, 1999.
- GUERRERO, A. C.; PENA, I. G.; BARZANA, E.; GARIBAY, M. G.; RUIZ, L. G. *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-278: a wild inulinase hyperproducing strain. **Journal of fermentation and bioengineering**, Osaka, v. 80, n. 2, p. 159-163, 1995.
- GROOTWASSINK, W. D.; FLEMING, S. E. Non-specific β -fructofuranosidase (inulinase) from *Kluyveromyces fragilis*: batch and continous fermentation, simple recovery method and some industrial properties. **Enzyme Microbial Technology**, Surrey, v.2, p.45-53, jan., 1980.
- GROOTWASSINK, W. D.; HEWITT, G. .M. Inducible and constitutive formation of β -fructofuranosidase (inulinase) in batch and continuous cultures of the yeast *Kluyveromyces fragilis*. **Journal of General Microbiology**, London, v.129, p.31-41, 1983.

- GUPTA, A. K.; SINGH, D. P.; KAUR N.; SINGH, R. Production, purification and immobilization of inulinase from *Kluyveromyces fragilis*. **Journal Chemical Technology Biotechnology**, London, v. 59, n. 4, p. 377-385, 1994.
- HENSING, M.; VROUWENVELDER, H.; HELLINGA, C.; 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, n. 4, p. 516-521, dec., 1994.
- HJORTH, R.; KÄMPE, S.; CARLSSON, M. Analysis of some operating parameters of novel adsorbents for recovery of proteins in expanded beds. **Bioseparation**, Dordrecht, v. 167, n. 1/2, p. 217-223, 1995.
- JOHANSSON, H. J.; JÄGERSTEN, C.; SHILOACH, J. Large scale recovery and purification of periplasmic recombinant protein from *E. coli* using expanded bed adsorption chromatography followed by new ion exchange media. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 48, n. 1/2, p. 9-14, 1996.
- KIM, C.H.; RHEE, S. K., Fructose Production from Jerusalem Artichoke by Inulinase Immobilized on Chitin. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 11, n. 3, p. 201-206, 1989.
- KIM, D.H.; CHOI, Y.J.; SONG, S.K.; YUN, J.W. Production of Inulo-oligosaccharides using endo-inulinase from a *pseudomonas* sp. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 19, n. 4, p. 369-371, 1997.
- KNIGHT, P. Chromatography: 1989 report. **Bio/Technology**, New York, v. 7, n. 3, p. 243-249, mar., 1989.
- KUSHI, R. T.; HOJO, O.; TREVISAN, H. C.; MONTI, R.; CARVALHO, A.; CONTIERO, J. Estudo da inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus*. In: SINAFERM, 1996, São Carlos. **Anais**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos. p. 309-314.
- LEWUS, R. K.; ALTAN, F. K.; CARTA, G. Protein adsorption and desorption on gel-filled rigid particles for ion exchange. **Industrial Engineering Chemistry Research**, Washington, v. 37, p. 1079-1087, 1998.

- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MANZONI, M.; CAVAZZONI, V. Extracellular inulinase from four yeasts. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 21, n. 5, p. 271-274, 1988.
- MANZONI, M.; CAVAZZONI, V. Hydrolysis of Topinambur (Jerusalem Artichoke) Fructans by Extracellular Inulinase of *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. **Journal Chemical Technology Biotechnology**, London, v. 54, n. 4, p. 311-315, 1992.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, mar., 1959.
- MOHSENIN, N. M. **Physical properties of plant and animal materials**. New York: Gordon and Breach Science Publishers, 1970. 734p. v. 1.
- NOPPE, W.; HANSSENS, I.; De CUYPER, M. Simple two-step procedure for the preparation of highly active pure equine milk lysozyme. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 719, n. 2, p. 327-331, jan., 1996.
- PEREIRA, J. A. M.; ROSA, P. T. V.; PASTORE, G. M.; SANTANA, C. C. Expanded bed adsorption utilizing ion exchange resin to purify extracellular β -galactosidase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Tokyo, v. 70-72, p. 779-787, 1998.
- PESSOA Jr., A.; HARTMANN, R.; VITOLO M.; HUSTEDT, H. Recovery of extracellular inulinase by expanded bed adsorption. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 51, n. 1, p. 89-95, 1996.
- PHARMACIA BIOTECH. **Process Products'96**. Uppsala, 1996.
- POORNA, V.; KULKARNI, P. R. A study of inulinase production in *Aspergillus niger* using fractional factorial design. **Bioresource Technology**, Essex, v. 54, n. 3, p. 315-320, 1995.

- RICHARDSON, J. F.; ZAKI, W. N. Sedimentation and fluidisation: part I. **TransIChemE**, London, v. 32, n. 1, p. 35-53, 1954.
- RODRIGUES, M. I.; KALIL, S.J.; MAUGERI, F. Planejamento fatorial e “screening design” como ferramenta para otimização de processos bioquímicos. In: Sinaferm, 1998, Uberlândia. **Anais**. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 1998. CDROM.
- ROUWENHORST, R. J.; VISSER, L. E.; VAN DER BAAN, A. A.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN J. P. Production, distribution, and kinectic properties of inulinase in continuous cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 5, p. 1131-1137, 1988.
- ROUWENHORST, R. J.; HENSING, M.; VERBAKEL, J.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P. Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 11, p. 3337-3345, 1990.
- SADANA, A.; BEELARAM, A. M. Efficiency and economics of bioseparation: some case studies. **Bioseparation**, Dordrecht, v. 4, n.4, p. 221-235, aug., 1994.
- SANTOS, A. M. P. **Síntese de oligossacarídeos por inulinase de *Kluyveromyces bulgaricus***. Campinas, 1998. 91p. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade estadual de Campinas.
- SCHNEIDER, A. L. S. **Estudo da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907**. Florianópolis, 1996. 137p. Tese (Mestre em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina.
- SCOPES, R. K. **Protein Purification Principles and Practice**. 2 ed. New York: Springer-Verlag, 1988. 329p.
- SIGMA. **Biochemicals and Reagents**. St. Louis, 1999.

- SILVA, F. R. C.; PEREIRA, J. A. M.; ARAÚJO, M. O. D.; SANTANA, C. C. Mass transfer parameters evaluation in protein adsorption on macroporous resin. **Hungarian Journal of Industrial Chemistry Veszprém**, v. 27, p. 183-187, 1999.
- SINGH, P. C.; SINGH, R. K. Choosing an appropriate bioseparation technique. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 7, n. 2, p. 49-58, feb., 1996.
- SKIDMORE, G. L.; CHASE, H. A. Multi-component adsorption of proteins to ion exchanger. **Sep. Biotechnol.**, 2 meet, v. 2, p. 418-427, 1990.
- SNOW, U. Adsorbent reduces primary unit operations for bioprocess recovery. **Genetic Engineering News**, New York, v.14, n.3, p. 320-329, 1994.
- SPALDING, B. J. Downstream processing: key to slashing production costs 100 fold. **Bio/Technology**, New York, v. 9, p. 229-232, mar., 1991.
- SPIEGEL, J. E.; ROSE, R.; KARABELL, P.; FRANCOS, V. H.; SCHMITT, D. F. Fructooligosaccharides as food ingredients. **Food Technology**, Chicago, p. 85-89, jan., 1994.
- THÖMMES, J.; HALFAR, S. L.; KULA, M. R. Purification of monoclonal antibodies from whole hybridoma fermentation broth by fluidized bed adsorption. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.45, n. 3, p. 205-211, 1995.
- THÖMMES, J.; Fluidized bed adsorption as a primary recovery step in protein purification. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, Berlin, v.58, p. 185-230, 1997.
- VANDAMME, E.J.; DERYCKE, D.G. Fermentation process, properties and applications, **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v. 29, p. 139-176, 1983.
- VOSER, W. Isolation of hydrophilic fermentation products by adsorption chromatography. **Journal Chemical Technology Biotechnology**, London, v. 32, n. 1, p. 109-118, jan., 1982.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

YANG, C-M.; TSAO, G. T. Packed bed adsorption theories and their applications to affinity chromatography. **Advances in biochemical Engineering**, New York, v. 25, p. 1-18, 1982.

ZITTAN, L. Enzymatic hydrolysis of inulin – an alternative way to fructose production. **Starch**, Weinheim, v. 33, n. 11, p. 373-377, 1981.