

Área: Engenharia de Alimentos

PURIFICAÇÃO DE INULINASES OBTIDAS A PARTIR DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS UTILIZANDO PROCESSOS DE PRECIPITAÇÃO EM ETANOL E ULTRAFILTRAÇÃO

Helen Treichel, Marco Di Luccio, Marceli Fernandes Silva, Simone Maria Golunski*

Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias, URI Campus de Erechim

*E-mail: simonegolunski@hotmail.com

RESUMO

Inulinase (EC 3.2.1.7), produzida pela cepa de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 por fermentação em estado sólido do bagaço de cana foi purificada a partir do caldo de cultura por precipitação com etanol e ultrafiltração (UF). O objetivo deste trabalho foi investigar sistematicamente a purificação de inulinase utilizando precipitação com etanol (um produto comestível de solvente), acoplada a UF. Os efeitos da concentração de etanol e da taxa de adição de etanol ao extrato bruto sobre o rendimento da purificação e fator de purificação foram avaliados utilizando a técnica de planejamento experimental. A precipitação causou uma ativação de enzimas e um fator de purificação de até duas vezes. Após precipitação com 55 % de etanol (v/v) e uma vazão de 10 mL/min, seguido por ultrafiltração em módulo de fluxo tangencial, com pressão de 1 bar numa vazão de 1 L/min utilizando membrana de 100 kDa, a enzima foi purificada com um fator de purificação de 5,5 vezes, com rendimento de 86,1%. Este estudo apresenta uma estratégia de purificação simples e mais eficaz do que algumas técnicas de cromatografia.

Palavras-chave: purificação; inulinase; precipitação; ultrafiltração.

1 INTRODUÇÃO

Inulinases são 2,1-β-D-frutano-furohidrolases (EC 3.2.1.7), as quais hidrolisam a inulina, um polímero formado por moléculas de frutose com ligações β-2,1, liberando moléculas de frutose. Esta enzima pode ser aplicada para a produção de xaropes de frutose, que são amplamente utilizados na indústria de alimentos e bebidas (Ettalibi & Baratti, 2001). As inulinases também podem ser aplicadas na produção de frutooligossacarídeos. Essas

macromoléculas têm atraído muita atenção devido à sua aplicação como ingredientes funcionais (Sangeetha, Ramesh e Prapulla, 2005).

O isolamento e purificação de uma enzima produzida por micro-organismos é uma tarefa desafiadora, tendo em conta os aspectos econômicos e técnicos, pois as etapas de purificação podem representar 70-90% dos custos finais de produção. A purificação de uma proteína a partir de um meio fermentado inclui geralmente uma combinação de técnicas utilizadas para separar as proteínas de acordo com seu tamanho, carga, hidrofobicidade ou a capacidade de ligar-se a certos compostos (ligantes de afinidade, íons metálicos quelados) (Ghosh, 2003; Galaev & Mattiasson, 2001).

A técnica mais utilizada para purificação de proteínas é a cromatografia, a qual é bastante específica, podendo se obter frações bem puras. No entanto, este é um processo difícil de ser escalonado, com baixo rendimento e alto custo. Para a aplicação na indústria de alimentos e bebidas, enzimas microbianas exigem um certo grau de purificação, no entanto, os custos de separação devem ser minimizados para que o uso de enzimas na transformação de produtos alimentares seja viável (Przybycien et al., 2004). Para minimização de custos é importante encontrar economia e eficácia nos métodos de processamento de *downstream*.

Técnicas de precipitação são normalmente aplicadas como um primeiro passo no processamento de *downstream*. A precipitação pode atuar tanto na concentração como na purificação da molécula-alvo, mas na verdade, a concentração é mais facilmente alcançada ao invés de purificação. Por isso, esta técnica é frequentemente usada nos estágios iniciais das operações de *downstream*, reduzindo o volume de estágios posteriores (Glatz et al., 1990; Cortez et al., 1999). No entanto, em muitos casos, como na produção de enzimas extracelulares, a precipitação é uma forma eficaz de atingir um certo grau de purificação (Gill et al., 2006; Cui et al., 2007).

As principais vantagens da utilização de precipitação para a concentração e purificação são o uso de equipamento simples, de fácil escalonamento e possibilidade de uso com um grande número de agentes precipitantes, incluindo alguns de baixo custo, como o etanol, que é amplamente produzido no Brasil e no mundo. (Glatz et al., 1990; Cortez et al., 1999).

O metanol, etanol e isopropanol são importantes precipitantes industrial. O etanol representa, provavelmente, o equilíbrio ideal entre o efeito sobre a solubilidade e caráter hidrofílico adequado para reduzir a desnaturação. A precipitação em etanol é uma técnica

promissora que pode ser aplicada a diferentes proteínas (Cortez e Pessoa Jr., 1999; Cui et al., 2007).

Processos de separação por membranas (PSM) são considerados uma alternativa econômica para atingir alta produtividade e pureza ao mesmo tempo. Ultrafiltração (UF) é o PSM mais utilizado na purificação de proteínas. Comparado aos métodos cromatográficos, a técnica de separação por membranas oferece vantagens de menor custo e facilidade de scale-up para a produção comercial. Embora UF tenha sido extencivamente investigada, a purificação de proteínas por UF ainda é um desafio que precisa de mais esforços de investigação (Saxena et al., 2009). A maioria dos estudos publicados são focados em soluções modelo de proteínas (Darnon et al., 2003, Huang et al., 2009, Lin et al., 2008, Rohani e Zydney, 2009) e a extração para sistemas mais complexos de proteína nem sempre é fácil.

A utilização de processos de precipitação e de membrana para a purificação de inulisanas pode ser de grande interesse para a investigação e desenvolvimento de tecnologias para aplicações na indústria alimentar. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi investigar sistematicamente o isolamento e purificação de inulisanas produzidas por fermentação em estado sólido utilizando precipitação com etanol (um produto comestível de solvente), acoplado a ultrafiltração.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1 Produção de inulinase

A enzima foi produzida por fermentação em estado sólido do bagaço de cana com *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. O substrato sólido foi suplementado com 15% (p/p) de melaço de cana pré-tratado, 30% (p/p) de água de maceração de milho (AMM) e 20% (p/p) de farelo de soja (Mazutti et al., 2006; 2007). O bagaço de cana foi obtido em um mercado local, AMM foi adquirida da Corn Products International (Mogi Guaçu, SP, Brasil), o melaço de cana foi adquirido da Refinaria Ester (Campinas, SP, Brasil) e o farelo de soja foi adquirido na empresa Olfar (Erechim, RS, Brasil). A umidade inicial dos substratos foi

corrigida para 65%, conforme descrito anteriormente (Mazutti et al., 2006). O melaço de cana foi pré-tratado com uma solução 200 gL⁻¹ em ácido sulfúrico pH 5,0. Esta solução permaneceu em repouso por 24 horas. Depois disso, o pH final foi ajustado para 4,0 com ácido sulfúrico. A solução foi centrifugada a 15.000 x g por 15 min a 4 °C (Sguarezi et al., 2008).

As fermentações foram realizadas em um biorreator de leito fixo com 2 kg de bagaço de cana seco. O arranjo experimental consiste de um cilindro (34 cm de diâmetro e 50 cm de altura) conectado a uma linha de ar saturada com água. O umidificador de ar consistia de um cilindro de PVC em que o ar seco foi bombeado através de uma coluna de água usando um borrifador de ar. O biorreator foi carregado com 2 kg de bagaço com umidade de 65% (p/p) e esterilizado a 121 °C por 20 minutos. O bagaço foi inoculado com 765 mL de uma suspensão de células previamente preparada. Após 24 horas, o bagaço foi removido do reator e a enzima extraída com tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,8.

2.1.2 Precipitação com etanol

O extrato enzimático foi centrifugado a 2.800 × g por 20 min a 5 °C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi utilizado para a concentração da enzima. Uma solução aquosa de etanol refrigerada foi adicionada gota a gota, a uma alíquota do extrato enzimático bruto a uma taxa de alimentação determinada, utilizando uma bomba peristáltica (Masterflex). A solução do extrato foi mantido a 5 °C durante todo o período, sob agitação constante. Após a adição de etanol, o precipitado resultante foi centrifugado a 9.000 × g por 15 min a 5 °C. O precipitado foi coletado e dissolvido em tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,8. A atividade enzimática foi determinada em todas as frações.

Os efeitos da concentração de etanol (10-100%) e a taxa de alimentação (0,09-19,9mL/min) foram analisados por um delineamento composto central rotacional (DCCR), contendo 4 pontos fatoriais, 4 pontos axiais e triplicata do ponto central, totalizando 11 experimentos. Esses níveis foram definidos com base em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa (Risso et al., 2009). Os resultados foram analisados utilizando o software Statistica 8.0 (Stat Soft Inc. Tulsa, OK, EUA).

2.1.3 Ultrafiltração

O sistema de aparato experimental consiste basicamente de um módulo de fluxo tangencial folha plana, equipada com uma bomba de engrenagens (microbomba, Cole Parmer, Vernon Hills, IL, EUA), fluxômetro (Salvi Casagrande, SP, Brasil) e válvula de contrapressão. O módulo foi criado com uma membrana de 100 kDa (SEPA CF, Osmonics, GE, Minnetonka, Minnesota, EUA). Os extratos enzimáticos foram circulados no sistema com controle de temperatura (5 °C), com pressão de 1 bar numa vazão de 1 L/min. Para cada ensaio experimental uma amostra foi mantida na mesma temperatura sem circular através do sistema para verificar se há perda de atividade durante a operação.

2.1.4 Atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada pela medida da taxa inicial de produção de açúcar em condições controladas (Bender et al., 2008). Uma amostra de 0,5 mL da enzima foi adicionada a 4,5 mL de uma solução 2% (p/v) de sacarose em tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,8 e incubadas a 50 °C por 10 min. A liberação dos açúcares redutores totais foi determinado pelo método DNS (ácido 3,5 dinitrossalicílico) (Miller, 1959). Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 micromol de sacarose por minuto nas condições de reação.

2.1.5 Determinação de proteína total

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

2.1.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A enzima purificada foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) de acordo com o método de Laemmli (Laemmli, 1970). Foi utilizado um gel de separação de 15%. As proteínas foram coradas com uma solução 0,1% de Coomassie Brilliant Blue R-250.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do planejamento experimental para avaliar as condições de precipitação de inulinase são apresentados na Tabela 1, que apresenta os valores reais e codificados para as variáveis independentes (concentração e vazão de etanol) e as respectivas respostas em termos de atividade específica, rendimento da enzima e o fator de purificação. A atividade específica do extrato enzimático bruto foi de 107,0 U/mg. Geralmente é observado um aumento na atividade específica após a precipitação. As maiores atividades específicas foram encontradas no ensaio 8 (262,9 U/mg), seguido pelo ensaio 5 (255,2 U/mg) e do ponto central (215,4 U/mg).

Tabela 1. Matriz do planejamento experimental 2^2 (valores reais e codificados) com o rendimento da atividade de inulinase.

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

É interessante notar que na maioria dos casos, a recuperação da enzima foi superior a 100%. Isto sugere que a precipitação remove os inibidores da enzima. A forte ativação da enzima pode ser devido ao alto teor de metais pesados e outros inibidores da enzima típica nos meios de fermentação. O maior rendimento médio encontrado foi de 168,5% no ensaio 8. Altas produtividades também foram obtidas no ensaio 7 e no ponto central. O menor

rendimento foi obtido nos ensaios 3 e 5, em níveis mais baixos da concentração de etanol, o que sugere que baixas concentrações de etanol são incapazes de separar a enzima de inibidores.

Exceto o ensaio 7 todas as precipitações renderam FP superior a 1, mostrando que a precipitação pode levar a diferentes graus de purificação. Os maiores fatores de purificação foram obtidos nos ensaios 8, 4 e no ponto central. É interessante notar que neste trabalho, foi possível obter maiores fatores de purificação ($> 1,5$) do que aqueles comumente relatados na literatura para as etapas de precipitação na purificação da enzima (Cui et al., 2007)

A análise estatística dos dados experimentais permitiu a validação de um modelo empírico para a produção da enzima em função da concentração e da vazão de etanol. A equação 1 apresenta o modelo codificado para o rendimento da enzima. O modelo foi validado pela análise de variância (ANOVA), com coeficiente de correlação de 0,91 e teste F calculado maior do que o tabelado, transformando o modelo válido com 95% de confiança. A Figura 1 apresenta a superfície de resposta para o modelo validado para a recuperação da enzima.

A análise da Figura 1 e da Equação 1 mostra que o rendimento da enzima é muito mais dependente da concentração de etanol do que a taxa de adição de etanol ao extrato bruto. O efeito da interação da concentração de etanol e vazão também foi significativa e maior do que o efeito linear da taxa de fluxo, mostrando que o processo é bastante complexo, uma vez que a taxa de adição de etanol para o sistema pode aumentar ou diminuir o rendimento da enzima, dependendo a concentração de etanol.

Na Equação 1 o Y_{calc} é o rendimento da enzima (%), C e V são a concentração codificada de etanol e a vazão, respectivamente. Os parâmetros desta equação mostram que a concentração de etanol apresenta um ponto ótimo na produção da enzima. Esse comportamento pode ser devido ao fato de aumentar a concentração de etanol pode-se aumentar a precipitação da enzima. No entanto, além de um certo nível, elevadas concentrações de etanol podem causar perda de atividade da enzima devido a desnaturação. Um estudo sobre a recuperação de inulinase relataram o uso da concentração de etanol de 70% como procedimento de rotina, mas não mostram o quanto a atividade aumentou com este procedimento (Risso et al., 2009). No presente estudo, optamos por usar 55% de etanol em novas medidas, uma vez que esta concentração resultou em bons rendimentos da enzima (146,8%) podendo ser mais rentável do que o uso de altas concentrações de etanol.

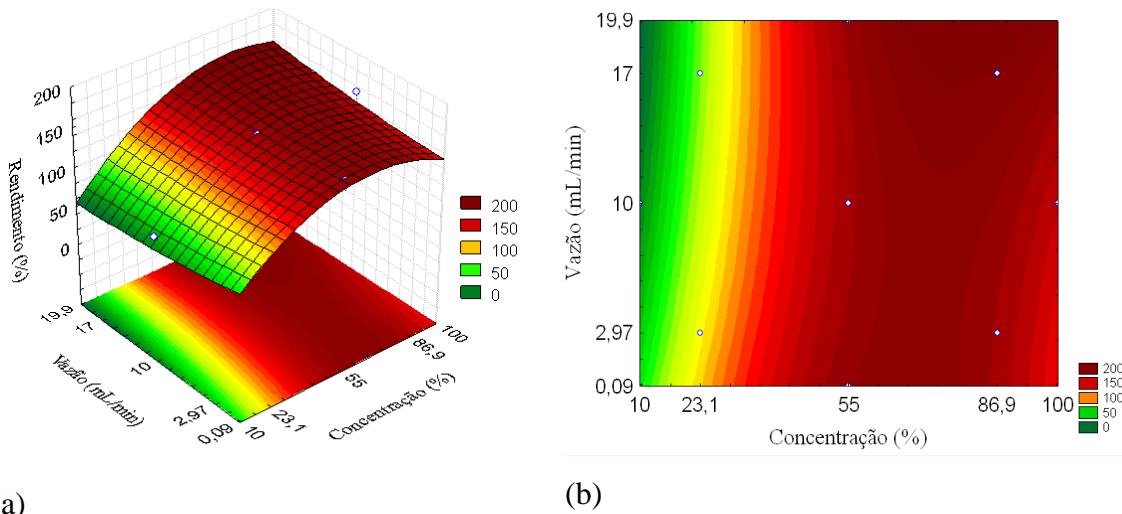


Figura 1. Superfície de resposta para o rendimento da purificação de inulinase (a) e curva de contorno(b).

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

O resumo da estratégia de purificação de inulinase proposto neste trabalho é apresentado na Tabela 2. A enzima foi extraída de um novo lote de meio fermentado, quando a atividade foi 13,24 U/mL e o teor de proteína foi de 0,18 mg/mL, resultando em uma atividade específica de 73,56 U/mg. O extrato foi precipitado com as condições do ponto central do planejamento experimental, uma vez que poderia resultar em um bom rendimento e fator de purificação, como observado anteriormente. A produção da enzima aumentou após a precipitação do etanol confirmando os resultados do planejamento experimental. Este fato pode ser atribuído à eliminação de possíveis inibidores que poderiam ter permanecido na solução, enquanto que a enzima foi precipitada. A influência do etanol sobre as enzimas pode variar em função da natureza da proteína que é precipitada. Em nosso estudo o etanol não diminuiu a atividade de inulinase, mas Cui et al (2007) têm mostrado que o etanol poderia causar uma diminuição na estabilidade transglutaminase. O aumento no rendimento da enzima também foi observado por outros autores que este comportamento correlacionado com a remoção de inibidores (Porto et al., 2008; Cortez et al., 2004), na purificação de proteases e

xilitol desidrogenase por sistemas aquosos de duas fases. Até agora, nenhum relatório prévio de precipitação com solvente mostraram resultados semelhantes.

Tabela 2. Estudo das etapas de purificação de inulinase de *K. marxianus* NRRL Y-7571.

Etapas de Purificação	Proteína Total (mg)	Atividade Total (U)	Atividade Específica (U/mg)	Rendimento da Enzima (%)	Fator de Purificação (FP)
Extrato enzimático bruto	108	7944	73,56	100,0	1,0
Precipitação com etanol	56,0	9560	170,71	120,3	2,3
Retentado UF	16,1	6484	402,73	81,6	5,5

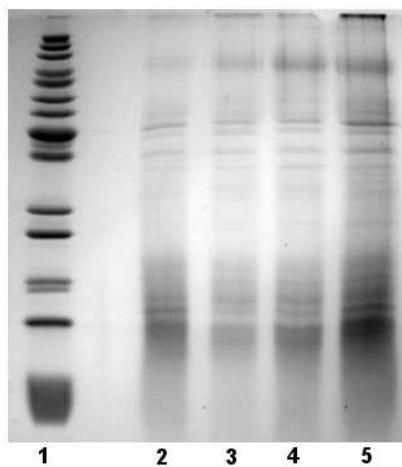


Figura 2. SDS-PAGE das diferentes frações do extrato enzimático: Linha 1: marcador de peso molecular (de cima para baixo) 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15 e 10 kDa . Linha 2: extrato enzimático bruto. Linha 3: extrato enzimático, após precipitação com etanol 55% / 10 mL/min. Linha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

Após a precipitação da enzima pré-purificada foi concentrada e fracionada por ultrafiltração, utilizando uma membrana de 100 kDa, que foi a melhor para aumentar o fator de purificação quando selecionada a partir de uma faixa de peso molecular de corte de 30-100 kDa (resultados não publicados). A etapa de UF causou uma pequena gota no rendimento da

enzima devido à perda da enzima na superfície da membrana caracterizada pelo entupimento ou a formação do gel de proteínas. No entanto, um bom fator de purificação pode ser obtido (5,5 vezes), depois da UF. Possivelmente proteínas contaminantes de preferência permeiam a membrana, enquanto que a enzima foi mantida, aumentando a sua pureza.

O gel SDS-PAGE das frações apresentadas na Tabela 2 é mostrado na Figura 3. Uma pequena variação no perfil de proteína pode ser observado quando o extrato bruto (linha 2), em comparação com os demais tratamentos, mesmo quando um maior fator de purificação foi obtido (PF = 5,5, linha 4). A banda na região de 100-120 kDa é intensificada, sugerindo que esta pode se referir a inulinase. A concentração global das proteínas do extrato foi observada quando as amostras foram submetidas a ultrafiltração, mesmo as proteínas de baixo peso molecular parecem estar concentradas. Isto pode ser devido à polarização de concentração e aos fenômenos como o *fouling* que ocorre na superfície da membrana. As proteínas que são retidas pela membrana podem formar uma camada de gel na superfície da membrana, que atua como uma segunda membrana dinâmica, aumentando a retenção de proteína, como já observado por outros autores (Ghosh & Cui, 2000).

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

3 CONCLUSÃO

Neste estudo, uma estratégia para a purificação de inulinase produzida por fermentação em estado sólido é proposta, utilizando uma abordagem em duas etapas com base

na precipitação com etanol, seguida por ultrafiltração. O fator de purificação pode ser aumentado 2-2,5 vezes, dependendo da concentração de etanol e sobre a taxa de sua adição ao extrato bruto. A precipitação com etanol também causou a ativação da enzima, possivelmente devido à remoção dos inibidores. Os resultados mostraram que foi possível obter uma purificação de 5,5 vezes do extrato bruto com rendimento de 86,1%, após precipitação seguida por ultrafiltração. Estes resultados são animadores quando comparados à literatura, provando que uma técnica simples de purificação de duas etapas pode ser mais eficaz do que algumas técnicas de cromatografia.

REFERÊNCIAS

- BENDER, J.P., MAZUTTI, M.A., DI LUCCIO, M., TREICHEL, H. Extraction of inulinase obtained by solid state fermentation of sugarcane bagasse by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. *Appl Biochem Biotechnol*, v.149, p.195–203, 2008.
- BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- CORTEZ E.V., PESSOA A. JR. Xylanase and β -xylosidase separation by fractional precipitation. *Process Biochemistry*, v. 35, n. 3-4, p. 277-283, 1999.
- CORTEZ, E.V., PESSOA, JR. A., FELIPE, M. D. G. A., ROBERTO, I.C., VITOLO, M. Liquid–liquid extraction of xylitol dehydrogenase from *Candida guilliermondii* homogenate by reversed micelles. *Journal of Chromatography B*, v. 807, p. 55–60, 2004.
- CUI, L., DU, G., ZHANG, D., LIU, H., CHEN, J. Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygroscopicus*. *Food Chemistry*, v. 105, n. 2, p. 612–618, 2007.
- DARNON, E., MORIN, E., BELLEVILLE, M.P., RIOS, G.M. Ultrafiltration within downstream processing: some design considerations. *Chemical Engineering and Processing*, v. 42, n. 4, p. 299-309, 2003.
- ETTALIBI, M., BARATTI, J. C. Sucrose hydrolysis by the thermostable immobilized inulinases from *Aspergillus ficuum*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 28, n. 7, p. 596–601, 2001.
- GALAEV, I.Y., MATTIASSEN, B. Protein purification by affinity ultrafiltration. In: Wang, W.K. (ed.) *Membrane Separations in Biotechnology*. Second Edition, Revised and Expanded, Marcel Dekker Inc., p.1-62, 2001.

GHOSH, R. Protein bioseparation using ultrafiltration: theory, applications, new developments, Imperial College Press, London, England, 2003.

GHOSH, R., CUI, Z.F., Protein purification by ultrafiltration with pre-treated membrane. *Journal of Membrane Science*, v.167, p.47–53, 2000.

GILL P.K., MANHAS, R.K., SINGH, P. Purification and properties of a heat-stable exoinulinase isoform from *Aspergillus fumigatus*. *Bioresource Technology*, v.97, p. 894-902, 2006.

GLATZ, C.E. Precipitation. In: ASENJO JA, editor. Separation Processes in Biotechnology. New York: Marcel Dekker, 1990.

HUANG, R., KOSTANSKI, L.K., FILIPE, C.D.M., GHOSH, R. Environment-responsive hydrogel-based ultrafiltration membranes for protein bioseparation, *Journal of Membrane Science*, v.336, p.42–49, 2009.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 15, p. 680–685, 1970.

LIN, S-H., HUNG, C-L., JUANG, R-S. Effect of operating parameters on the separation of proteins in aqueous solutions by dead-end ultrafiltration, *Desalination*, v. 234, p.116–125, 2008.

MAZUTTI, M. A., BENDER, J. P., DI LUCCIO, M., TREICHEL, H. Optimization of inulinase production by solid state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, n. 1, p. 56–59, 2006.

MAZUTTI, M., CENI G., DI LUCCIO, M., TREICHEL, H. Production of inulinase by solid-state fermentation: effect of process parameters on production and preliminary characterization of enzyme preparations. *Bioprocess Biosyst Engineering*, v. 30, n. 5, p. 297-304, 2007.

MILLER, G. L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

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

PORTO, T.S., MEDEIROS e SILVA, G.M., PORTO, C.S., CAVALCANTI, M.T.H., NETO, B.B., LIMA-FILHO, J.L., CONVERTI, A., PORTO, A.L.F., PESSOA, JR.A. Liquid–liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. *Chemical Engineering and Processing*, v. 47, p. 716–721, 2008.

PRZYBYCIEN, T.M., PUJAR, N.S., STEELE, L.M. Alternative bioseparation operations: life beyond packed-bed chromatography. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 15, p. 469-478, 2004.

RISSO, F. V. A., MAZUTTI, M. A., TREICHEL, H., COSTA, F., MAUGERI, F., RODRIGUES, M. I. Comparison Between Systems for Synthesis of Fructooligosaccharides from Sucrose Using Free Inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. *Food Bioprocess Technol*, online first, DOI: 10.1007/s11947-009-0272-1, 2009.

ROHANI, M. M., ZYDNEY, A. L. Effect of surface charge distribution on protein transport through semipermeable ultrafiltration membranes, *Journal of Membrane Science*, v. 337, n. 1-2, p. 324–331, 2009.

SANGEETHA, P. T., RAMESH, M. N., PRAPULLA, S. G. Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosacharides. *Trends in Food Science & Technology*, v. 16, n. 10, p. 442-457, 2005.

SAXENA, A., TRIPATHI, B. P., KUMAR, M., SHAHI, V. K. Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: An overview. *Advances in Colloid and Interface Science*, v.145, p. 1–22, 2009.

SGUAREZI, C., LONGO, C., CENI, G., BONI, G., SILVA, M. F., DI LUCCIO, M., MAZUTTI, M. A., MAUGERI, F., RODRIGUES, M. I., TREICHEL, H. Inulinase production by agroindustrial residues: acid pretreatment of substrates and optimization of production. *Food Bioprocess and Technology*, v.2, p. 409-414, 2008.

SHARMA, A. D., GILL, P. K. Purification and characterization of heat-stable exo-inulinase from *Streptomyces* sp., *Journal of Food Engineering*, v. 79, p. 1172–1178, 2007.

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

ZHANG, T., GONG, F., PENG, Y., CHI, Z. Optimization for high-level expression of the *Pichia guilliermondii* recombinant inulinase in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant inulinase, *Process Biochemistry*, v. 44, n. 5, p. 1335–1339, 2009.