

Área: Engenharia de Alimentos

ESTRATÉGIAS DE PURIFICAÇÃO DE INULINASE DE *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y – 7571 UTILIZANDO MUDANÇA DE FORÇA IÔNICA E PRECIPITAÇÃO

Rosicler Colet¹, Marcell F. Silva¹, Rogério M. Dallago¹, Marco Di Luccio², Helen Treichel³, Simone M. Golunski^{1*}

¹ Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões URI – Departamento de Engenharia de Alimentos

² Universidade Federal de Santa Catarina – Departamento de Engenharia Química

³ Universidade Federal Fronteira Sul – Erechim – RS

*E-mail: simonegolunski@gmail.com

RESUMO – Inulinase (EC 3.2.1.7), produzida pela cepa *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 por fermentação em estado sólido do bagaço de cana, foi isolada e purificada a partir da mudança de força iônica do meio com adição de NaCl e CaCl₂ seguida de precipitação com álcool n-propílico ou álcool iso-propílico. Os efeitos da concentração dos álcoois e a taxa de adição ao extrato enzimático bruto sobre o rendimento da purificação e fator de purificação foram avaliados utilizando a técnica de planejamento experimental. A precipitação causou uma ativação da enzima apresentando um fator de purificação de 2,4 vezes para ambos os álcoois avaliados. O fator de purificação foi afetado positivamente pela mudança de força iônica do meio com a adição de 0,5 mol.L⁻¹ de NaCl antes da precipitação com os álcoois (n-propílico ou iso-propílico). Um fator de purificação de 4,8 vezes e um rendimento da enzima de 78,1% pode ser observado através da adição de 0,5 mol.L⁻¹ de NaCl ao extrato bruto, seguido de precipitação com 50% (v/v) de álcool n-propílico, adicionado a uma vazão de 19,9 mL / min. Este estudo apresenta uma estratégia de purificação simples e eficaz quando comparada a algumas técnicas de cromatografia.

Palavras-chave: inulinase; precipitação; força iônica; purificação.

1 INTRODUÇÃO

Há um interesse considerável no desenvolvimento de processos eficientes de *downstream* para a recuperação e purificação de enzimas (RUIZ-RUIZ et al., 2012). Processos que permitam obter o máximo rendimento com o menor custo são extremamente desejáveis e representam uma área de pesquisa de grande interesse.

A inulinase é uma importante enzima empregada em vários processos, como na produção de frutose pela hidrólise enzimática da inulina, na obtenção de fruto-oligosacarídeos (FOS) e na síntese de

oligossacarídeos a partir da sacarose. Sua principal aplicação está relacionada à produção de xarope com alto teor de frutose (ETALLIBI e BARATTI, 2001; SANGEETHA et al., 2005). A frutose também é amplamente utilizada, em substituição à sacarose, em muitos alimentos, medicamentos e bebidas (GILL et al., 2006; CHEN et al., 2009).

A precipitação é comumente empregada para isolar e concentrar enzimas e outras macromoléculas. Esta técnica oferece a possibilidade de concentrar e purificar a macromolécula alvo geralmente a um custo acessível (BOERIS et al., 2009). Os processos de precipitação com sais e solventes são bastante utilizados em operações de concentração e pré-purificação de proteínas. A elevação da força iônica do meio com a adição de altas concentrações salinas pode provocar a perda de atividade enzimática. Solventes orgânicos também podem ser usados na precipitação de proteínas. No entanto, assim como os sais, podem causar a perda de atividade da enzima, e sua adequação deve ser verificada experimentalmente. Poucos estudos sistemáticos sobre o uso de sais e solventes no isolamento e pré-purificação de proteínas são encontrados na literatura (ZHANG et al., 2004; CORTEZ e PESSOA Jr, 1999).

Neste contexto, o objetivo deste estudo visa o desenvolvimento de uma estratégia de purificação da enzima inulinase de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, com base na mudança da força iônica do meio pela adição de sais (NaCl e CaCl₂), seguida por precipitação com álcoois (n-propílico e iso-propílico).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PRÉ-CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO POR PRECIPITAÇÃO

Os álcoois n-propílico ou iso-propílico foram adicionados, gota a gota, em uma alíquota do extrato bruto a uma taxa de alimentação determinada, utilizando uma bomba peristáltica (Masterflex). A solução do extrato enzimático foi mantida a 5 °C sob agitação constante durante todo o processo. Após a adição do solvente, o precipitado resultante foi centrifugado a 10.000 x g por 15 minutos a 5 °C. O precipitado foi coletado e dissolvido em tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,8 (RISSO et al., 2009). A atividade enzimática e a proteína total foram determinadas em todas as frações. Os efeitos da concentração dos álcoois estudados (10-90%) 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; GOLUNSKI et al., 2011). Os resultados foram analisados utilizando o software Statistica 8.0 (Stat Soft Inc. Tulsa, OK, EUA).

2.2 MUDANÇA DE FORÇA IÔNICA DAS SOLUÇÕES

Para os ensaios de mudança da força iônica do meio, foram utilizados os sais NaCl e CaCl₂ nas concentrações de 0,05; 0,1 e 0,5 mol/L. Para o NaCl a força iônica é igual à concentração do sal. Para as soluções de CaCl₂, as forças iônicas equivalentes a cada concentração estudada foram 0,26; 0,60 e 3,0 mol/L. Cada concentração foi adicionada ao extrato enzimático bruto e, após a diluição, este foi submetido à

precipitação com álcoois (n-propílico e iso-propílico), nas condições otimizadas pelo planejamento de experimentos. Após a adição dos álcoois, o precipitado resultante foi centrifugado a 10.000 x g durante 15 min a 5 °C. O precipitado foi recolhido e dissolvido em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,8. A atividade da enzima e proteína total foi determinada em todas as frações.

2.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E PROTEÍNA TOTAL

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).

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

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foi realizada a avaliação da precipitação da enzima inulinase utilizando um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2², cuja matriz com os valores reais e codificados para as variáveis independentes (concentração e vazão do álcool utilizado) e as respectivas respostas em termos de atividade específica, rendimento da enzima e o fator de purificação estão apresentados na Tabela 1.

A atividade específica do extrato enzimático bruto foi de 74,6 e 81,6 U/mg para os testes com o álcool n-propílico e iso-propílico, respectivamente. Geralmente é observado um aumento na atividade específica após a precipitação. Independente do álcool, as maiores atividades específicas foram encontradas no experimento 8, com 182,2 U/mg para o álcool n-propílico e 194,7 U/mg para o álcool iso-propílico. Os maiores rendimentos também foram encontrados no ensaio 8 (113,8% para o álcool n-propílico e 126,1% para o álcool iso-propílico). O menor rendimento foi obtido no ensaio 5, na menor concentração de álcool utilizada, o que sugere que baixas concentrações de álcool são incapazes de separar a enzima dos inibidores.

Para o álcool n-propílico, os maiores fatores de purificação foram encontrados nos ensaios 8, 7 e no ponto central. Os maiores fatores de purificação foram obtidos com a precipitação com álcool iso-propílico e foram observados no ensaio 8 seguido do pontos central. Os fatores de purificação encontrados neste estudo (em torno de 2,4) são maiores ($\cong 60\%$) do que os normalmente encontrados na literatura (FP = 1,75), utilizando diferentes solventes para a precipitação de enzimas (ZHAO et al., 2011). Todos os modelos propostos foram validados por meio da análise de variância (ANOVA), apresentando coeficientes de correlação (R) superiores a 0,91 e valor de F calculado maior do que o F tabelado, com 95 % de confiança.

Tabela 1. Matriz do DCCR 2² (valores reais e codificados) e respectivas respostas em termos de atividade específica, rendimento da atividade de inulinase e fator de purificação para precipitação com os álcoois n-propílico e iso-propílico.

Ensaio	*Conc %	Vazão (mL/min)	Álcool n-propílico			Álcool iso-propílico		
			Atividade Específica (U/mg)	Rendimento Atividade %	*FP	Atividade Específica (U/mg)	Rendimento Atividade %	*FP
Enzima bruta	-	-	74.6	100	1.0	81.6	100	1.0
1	-1 (22)	-1 (2.97)	100.9	41.7	1.3	41.0	21.9	0.5
2	+1 (78)	-1 (2.97)	141.2	94.0	1.9	11.8	88.6	1.4
3	-1 (22)	+1 (17)	152.6	42.3	2.0	48.3	27.3	0.6
4	+1 (78)	+1 (17)	144.0	99.9	1.9	128.1	89.4	1.6
5	-1.41 (10)	0 (10)	9.6	3.0	0.1	7.4	2.22	0.1
6	+1.41 (90)	0 (10)	150.8	105.9	2.0	107.9	84.9	1.3
7	0 (50)	-1.41 (0.09)	162.2	100.3	2.2	114.9	83.9	1.4
8	0 (50)	+1.41 (19.9)	182.2	113.8	2.4	194.7	126.1	2.4
9	0 (50)	0 (10)	159.1	100.0	2.1	151.0	98.2	1.8
10	0 (50)	0 (10)	157.1	101.5	2.1	149.4	97.4	1.8
11	0 (50)	0 (10)	157.0	99.4	2.1	151.2	100.0	1.8

*conc: concentração; *FP: fator de purificação

O efeito da mudança da força iônica do meio foi avaliada pela adição de diferentes concentrações de NaCl e CaCl₂ ao extrato bruto, e posterior precipitação com álcoois. Os resultados estão apresentados na Tabela 2. Nos ensaios, com CaCl₂, a maioria das concentrações do sal resultou em rendimentos de atividade superiores a 100%. Os máximos rendimentos foram observados utilizando CaCl₂ e álcool iso-propílico (0,10 e 0,50 mol / L, respectivamente) e álcool n-propílico (0,05 mol / L).

Considerando os fatores de purificação, todos os ensaios utilizando sais resultaram em FP superior a 2,4 vezes, valor de referência, uma vez que também foi conseguido usando o etanol em estudos realizados por nosso grupo de pesquisa (GOLUNSKI et al., 2011). Cabe ressaltar que quando foi testado 0,5 mol / L de NaCl e uma concentração de 50% de álcool n-propílico numa vazão de 19,9 mL/min (condição otimizada), foi observado um FP de 4,8 vezes. O FP e os rendimentos obtidos em nosso estudo são comparáveis ou superiores aos encontrados na literatura. Li et al. (2012) encontraram um FP de 3,4 vezes e um rendimento de 51,1% após a purificação de uma endo-inulinase utilizando cromatografia DEAE-Sepharose. Zhang et al. (2009) obtiveram um FP de 2,53 vezes e um rendimento de 46% na purificação de inulinase recombinante, utilizando cromatografia de afinidade. Deste modo, os resultados apresentados em nosso estudo mostraram um grande potencial de aplicação da metodologia proposta como uma estratégia de purificação simples e de baixo custo.

Tabela 2. Efeito da mudança de força iônica sobre o extrato enzimático seguido de precipitação com solventes orgânicos.

Álcool	Espécies de Sal	Concentração	Proteína	Atividade	Atividade	Rendimento	Fator
		Sal (mol/L)	Total (mg/mL)	Total (U/mL)	Específica (U/mg)	Atividade (%)	Purificação FP
*	*	*	0,238	25,6	107,6	100	1,0
n-propílico	NaCl	0,05	0,165	52,2	315,1	81,5	2,9
n-propílico	NaCl	0,10	0,155	50,4	323,8	78,8	3,0
n-propílico	NaCl	0,50	0,098	50,0	516,6	78,1	4,8
*	*	*	0,331	20,7	62,6	100	1,0
iso-propílico	NaCl	0,05	0,216	51,3	236,2	98,5	3,8
iso-propílico	NaCl	0,10	0,232	52,5	227,2	101,3	3,6
iso-propílico	NaCl	0,50	0,200	46,6	232,6	89,8	3,7
*	*	*	0,228	15,4	6,4	100	1,0
n-propílico	CaCl ₂	0,05	0,205	46,4	226,4	120,7	3,3
n-propílico	CaCl ₂	0,10	0,175	45,1	257,3	117,4	3,8
n-propílico	CaCl ₂	0,50	0,199	21,4	107,6	55,6	1,6
*	*	*	0,234	17,3	74,3	100	1,0
iso-propílico	CaCl ₂	0,05	0,237	43,6	183,4	100,7	2,5
iso-propílico	CaCl ₂	0,10	0,222	56,2	253,3	129,8	3,4
iso-propílico	CaCl ₂	0,50	0,228	52,1	229,6	120,4	3,1

* extrato enzimático bruto

4 CONCLUSÃO

Este estudo propõe uma estratégia para purificação da enzima inulinase produzida por fermentação em estado sólido, utilizando-se duas técnicas de baixo custo com base na mudança de força iônica do extrato enzimático bruto, seguido de precipitação utilizando álcool n-propílico ou iso-propílico. O FP aumentou 2,4 vezes, dependendo da concentração de álcool utilizado. Este processo resultou na ativação da enzima, provavelmente devido à remoção de inibidores. Os resultados mostraram que um FP de 4,8 vezes e um rendimento de 78,1%, foi obtido após a mudança de força iônica, seguida de precipitação. Estes resultados são promissores, quando comparados com os que são atualmente apresentados na literatura, mostrando que a purificação da enzima a partir de técnicas simples e de baixo custo pode ser mais eficiente do que outros métodos de maior custo.

5 REFERÊNCIAS

BENDER, J.P.; MAZUTTI, M.A.; LUCCIO, M. DI; TREICHEL, H. Extraction of inulinase obtained by solid state fermentation of sugarcane bagasse by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 149, p.195–203, 2008.

BOERIS, V.; ROMANINI, D.; FARRUGGIA, B.; PICO, G. Purification of chymotrypsin from bovine pancreas using precipitation with a strong anionic polyelectrolyte. **Process Biochemistry**, v. 44 p, 588-592, 2009.

BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

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

ETTALIBI, M.; BARATTI, J. C. Sucrose hydrolysis by thermostable immobilized inulinases from *Aspergillus ficuum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, n. 7, p. 596-601, 2001.

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.

GOLUNSKI, S., ASTOLFI, V., CARNIEL, N., OLIVEIRA, D., DI LUCCIO, M., MAZUTTI, M. A., TREICHEL, H. Ethanol precipitation and ultrafiltration of inulinases from *Kluyveromyces marxianus*. **Separation and Purification Technology**, v. 78, p. 261-265, 2011.

LI, Y.; LIU, G.; WANG, K.; CHI, Z.; MADZAK, C. Overexpression of the endo-inulinase gene from *Arthrobacter* sp. S37 in *Yarrowia lipolytica* and characterization of the recombinant endo-inulinase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 74, p. 109-115, 2012.

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

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

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 Technology**, 2009, online first, DOI: 10.1007/s11947-009-0272-1.

RUIZ-RUIZ, F.; BENAVIDES, J.; AGUILAR, O.; RITO-PALOMARES, M. Aqueous two-phase affinity partitioning systems: Current applications and trends. **Journal of Chromatography A**, v. 1244, p. 1-13, 2012.

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

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

ZHAO, M.; MU, W.; JIANG, B.; ZHOU, L.; ZHANG, T.; LU, Z.; JIN, Z.; YANG, R. Purification and characterization of inulin fructotransferase (DFA III-forming) from *Arthrobacter aureescens* SK 8.001. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 1757-1764, 2011.