

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

**Purificação de lipase de *Geotrichum sp.* por resina
cromatográfica de interação hidrofóbica.
Modelagem, simulação e validação de parâmetros**

Oscar Wilfredo Mendieta Taboada

Ingeniero Pesquero (UNP-Piura-PERÚ)

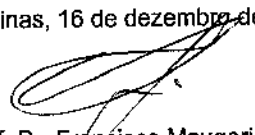
M.Sc. Tecnología de Alimentos (UNALM-Lima-PERÚ)

Orientador: Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

PARECER

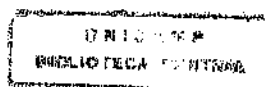
Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Oscar Wilfredo Mendieta Taboada, aprovada pela Comissão Julgadora em 16 de dezembro de 1999.

Campinas, 16 de dezembro de 1999.


Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
Presidente da Banca

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos requisitos
necessários para a obtenção do título de Doutor
em Engenharia de Alimentos**

Campinas, Dezembro de 1999



125231P
7/40 11/9
R 254

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	0523p
V. Ex.	
TOTAL	30/40119
PREÇO	278/00
G. D. ☒	
PREÇO	2611,00
DATA	28/01/00
N.º CPD	

MS23p

CM-00131898-3

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

1
O523p

Mendieta Taboada, Oscar Wilfredo

Purificação de lipase de *Geotrichum* sp. por resina cromatográfica de interação hidrofóbica. Modelagem, simulação e validação de parâmetros / Oscar Wilfredo Mendieta Taboada. – Campinas, SP: [s.n.], 1999.

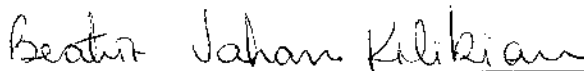
Orientador: Francisco Maugeri Filho
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Adsorção. 2.Análise cromatográfica. I.Maugeri Filho, Francisco. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

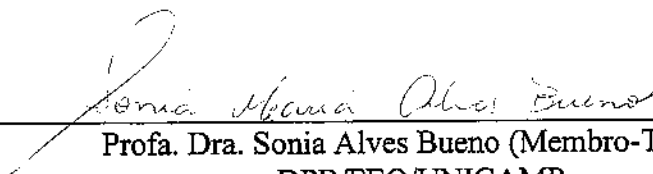
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho (Orientador)
DEA/FEA/UNICAMP



Profa. Dra. Beatriz Vahan Kilikian (Membro-Titular)
DEQ/EPUSP



Profa. Dra. Sonia Alves Bueno (Membro-Titular)
DPB/FEQ/UNICAMP



Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues (Membro-Titular)
DEA/FEA/UNICAMP



Prof. Dr. Rubens Maciel Filho (Membro-Titular)
DPQ/FEQ/UNICAMP

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

Dr. Silvio Andrietta (Membro-Suplente)
CPQBA/UNICAMP

DEDICATORIA

A meus filhos, alegria e motivação constante.

A Mari, minha mulher, companheira e amiga de todos os momentos.

A minhas mães Rene e Yola.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho pela orientação, apoio e amizade durante o desenvolvimento da Tese.

Aos membros da Banca Examinadora desta Tese, Profa. Dra. Beatriz V. Kilikian, Profa. Dra. Sonia Alves Bueno, Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues, Prof. Dr. Rubens Maciel Filho, Dr. Silvio Andrietta e Dr. Marlei Barboza, pelas valiosas sugestões que contribuíram grandemente para melhorar a qualidade deste trabalho.

A minhas amigas Eliana Setsuko Kamimura e Andrelina Pinheiro Santos pelas discussões e sugestões durante o desenvolvimento do trabalho, como também pela amizade e companheirismo.

Aos amigos Inês Martins, Isabel Curralero e Marlei Barboza pela ajuda inestimável e as sugestões no desenvolvimento do trabalho, particularmente a respeito do processo CARE.

A Fátima A. Costa, do Laboratório de Bioengenharia do DEA, pela ajuda durante a realização da parte experimental do trabalho, e a Liana, do Laboratório de Bioquímica do DEPAN pelas análises realizadas.

Aos amigos do laboratório Tomaz, Marco, Yemiko, Fabia, Mario, Caco, André, Suzana, Janaína, Luciano, Guilherme e Daniel, pela convivência e companheirismo.

Aos amigos Blanca, Nicolás, Aroldo, Roger, Jean, Raúl, Alfredo, Eliana, Carlos, Antonio e Doris pela amizade e companheirismo durante estes anos do meu doutorado.

Ao CNPq pela bolsa PEC/PG de doutorado.

A Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto, que me brindou apoio para a realização do curso de Doutorado.

SUMÁRIO

	página
SUMÁRIO.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE TABELAS.....	ix
NOMENCLATURA.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
 I INTRODUÇÃO.....	 1
 II REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	 5
2.1 Lipases.....	5
2.1.1 Propriedades.....	5
2.1.2 Produção de lipases microbianas.....	9
2.1.3 Aplicações	13
2.2 Purificação de proteínas.....	17
2.2.1 Aspectos gerais.....	17
2.2.2 Métodos de purificação de alta resolução.....	18
2.2.3 Cromatografia por Interação Hidrofóbica (HIC).....	19
2.2.3.1 Princípio do método.....	20
2.2.3.2 Fatores.....	22
2.2.3.3 Matrizes.....	25
2.2.3.4 Condições de operação.....	25
2.2.3.5 Aplicações da HIC na purificação de lipases microbianas.....	27
2.3 Processo CARE (Continuous Adsorption Recycle Extraction).....	33
2.4 Processo de adsorção e dessorção de proteínas.....	37
2.5 Otimização por análise de superfície de resposta.....	41

III	MODELAGEM MATEMÁTICA.....	45
3.1	Modelagem da cinética de adsorção de lipase em resina de interação hidrofóbica.....	45
3.2.	Modelagem matemática coluna cromatográfica.....	46
3.3	Modelagem matemática do processo CARE com três estágios.....	55
3.3.1	Estágio de adsorção.....	56
3.3.1.1	Balanço de massa na fase líquida.....	56
3.3.1.1.1	Balanço da enzima livre.....	56
3.3.1.1.2	Balanço para os contaminantes.....	57
3.3.1.1.3	Balanço para o sal.....	57
3.3.1.2	Balanço de massa na fase sólida.....	58
3.3.2	Estágio de lavagem.....	58
3.3.2.1	Balanço de massa na fase líquida.....	59
3.3.2.1.1	Balanço para enzima livre.....	59
3.3.2.1.2	Balanço para os contaminantes.....	59
3.3.2.1.3	Balanço para o sal.....	59
3.3.2.2	Balanço de massa na fase sólida.....	60
3.3.3	Estágio de dessorção.....	60
3.3.3.1	Balanço de massa na fase líquida.....	61
3.3.3.1.1	Balanço para enzima livre.....	61
3.3.3.1.2	Balanço para os contaminantes.....	61
3.3.3.1.3	Balanço para o sal.....	62
3.3.3.2	Balanço de massa na fase sólida.....	62
IV	MATERIAIS E MÉTODOS.....	65
4.1	Produção de lipase extracelular.....	65
4.1.1	Microrganismo.....	65
4.1.2	Ensaio de produção de lipase.....	65
4.1.3	Determinação de atividade lipolítica.....	66
4.1.4	Concentração de proteína.....	67
4.1.5	Determinação de massa seca.....	67
4.2	Purificação de lipase a partir de caldo bruto de fermentação.....	67

4.2.1	Meio adsorvente.....	67
4.2.2	Purificação de lipase em coluna cromatográfica.....	68
4.2.2.1	Purificação em coluna de troca iônica.....	68
4.2.2.2	Purificação em coluna de interação hidrofóbica.....	68
4.2.2.3	Eletroforese.....	69
4.2.3	Cinética de adsorção de lipase em butyl sepharose.....	69
4.2.4	Isotermas de adsorção.....	69
4.2.5	Determinação das constantes cinéticas k_1 e k_2	70
4.2.6	Determinação das curvas de ruptura.....	70
4.3	Determinações complementares.....	71
4.3.1	Determinação da porosidade do leite e a porosidade da partícula de resina.....	71
4.3.2	Densidade.....	73
4.3.3	Viscosidade.....	73
V	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
5.1	Resultados experimentais.....	75
5.1.1	Microrganismo.....	75
5.1.2	Produção de lipase extracelular por <i>Geotrichum sp</i>	77
5.1.3	Seleção do tipo de resina para purificação.....	80
5.1.4	Efeito da concentração de cloreto de sódio na purificação da lipase.....	83
5.1.5	Purificação de lipase em colunas de troca iônica (Q-Sepharose) e hidrofóbica (Butyl-Sepharose).....	85
5.1.6	Cinética de adsorção de lipase em Butyl-Sepharose.....	91
5.1.7	Isotermas de adsorção de lipase em Butyl-Sepharose.....	91
5.1.8	Determinação dos parâmetros cinéticos k_1 e k_2	93
5.1.9	Curvas de ruptura.....	95
5.1.10	Porosidade do leite e da resina utilizada.....	98
5.1.11	Densidade do caldo de fermentação a diferentes concentrações de Na Cl.....	100
5.1.12	Viscosidade do caldo de fermentação a diferentes concentrações de NaCl.....	101
5.2	Simulação de coluna cromatográfica hidrofóbica.....	101

VI	SIMULAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO CARE PARA PURIFICAÇÃO DE LIPASE.....	107
6.1	Simulação do processo CARE.....	107
6.2	Otimização do processo CARE para purificação de lipase	112
6.2.1	Resultados obtidos para o Rendimento (%)......	117
6.2.2	Resultados obtidos para o fator de purificação (FP)......	120
6.2.3	Resultados obtidos para a resposta otimizada (RO)......	122
VII	CONCLUSÕES.....	127
VIII	SUGESTÕES.....	129
IX	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131

ÍNDICE DE FIGURAS

	página
FIGURA 2.1 Representação esquemática da molécula de proteína indicando áreas hidrofóbicas.....	21
FIGURA 2.2 Modelos de adsorção de proteínas em matrizes hidrofóbicas	22
FIGURA 2.3 Esquema do processo CARE.....	34
FIGURA 2.4 Esquemas do processo CARE modificado.....	36
FIGURA 2.5 A influência do formato da curva de ruptura no desempenho de leitos fixos.....	41
FIGURA 2.6 Superfície de resposta para modelo de 2 ^a . ordem.....	43
FIGURA 3.1 Esquema de uma coluna cromatográfica.....	46
FIGURA 3.2 Esquema do processo CARE com três estágios.....	55
FIGURA 5.1 Microfotografia do <i>Geotrichum sp.</i>	75
FIGURA 5.2 Produção de lipase por <i>Geotrichum sp.</i> em meios contendo água de maceração de milho (AMM) e peptona.....	77
FIGURA 5.3 Produção de lipase por <i>Geotrichum sp.</i> em meio contendo extrato de levedura como fonte de nitrogênio.....	78
FIGURA 5.4 Produção de lipase por <i>Geotrichum sp.</i> em meio contendo água de maceração de milho (AMM) com correção do pH inicial do meio de fermentação.....	79
FIGURA 5.5 Produção de lipase por <i>Geotrichum sp.</i> em meio contendo água de maceração de milho (AMM) sem correção do pH.....	80
FIGURA 5.6 “Screening” de resinas hidrofóbicas na purificação de lipase.....	81
FIGURA 5.7 Efeito da concentração de cloreto de sódio sobre a adsorção de proteína e atividade lipolítica em coluna de Butyl Sepharose.....	84
FIGURA 5.8 Purificação de lipase de <i>Geotrichum sp.</i> em coluna de Q-Sepharose.....	85
FIGURA 5.9 Purificação de lipase de <i>Geotrichum sp.</i> em coluna de	

Butyl Sepharose.....	86
FIGURA 5.10 Lipase eluida da coluna hidrofóbica de Butyl Sepharose para análise por eletroforese.....	87
FIGURA 5.11 Eletroforese das frações coletadas na etapa de eluição durante a purificação de lipase de <i>Geotrichum sp.</i> utilizando coluna hidrofóbica de Butyl Sepharose.....	89
FIGURA 5.12 Cinética de adsorção de lipase em resina hidrofóbica de Butyl Sepharose em função da concentração de cloreto de sódio no caldo de fermentação.....	91
FIGURA 5.13 Isotermas de adsorção de lipase em resina hidrofóbica Butyl Sepharose em função da concentração de cloreto de sódio.....	92
FIGURA 5.14 Simulação da adsorção de lipase em resina hidrofóbica Butyl Sepharose em tanque agitado a diferentes concentrações de NaCl.....	93
FIGURA 5.15 Variação dos parâmetros cinéticos Q_m e k_d com a concentração de cloreto de sódio no caldo bruto de fermentação a purificar.....	94
FIGURA 5.16 Variação dos parâmetros cinéticos intrínsecos k_1 e k_2 com a concentração de cloreto de sódio no caldo de fermentação a purificar.....	95
FIGURA 5.17 Curvas de ruptura do caldo de fermentação contendo lipase de <i>Geotrichum sp.</i> em função da vazão e altura do leito de resina.....	96
FIGURA 5.18 Curvas de ruptura do caldo de fermentação contendo lipase de <i>Geotrichum sp.</i> em função da concentração de cloreto de sódio.....	97
FIGURA 5.19 Determinação da porosidade do leito de resina hidrofóbica Butyl Sepharose a través dos primeiros momentos versus [altura do leito/velocidade superficial].....	98
FIGURA 5.20 Determinação da porosidade de resina hidrofóbica Butyl Sepharose a través dos primeiros momentos versus [altura do leito/velocidade superficial].....	99
FIGURA 5.21 Relação entre HETP e Velocidade superficial para Butyl Sepharose.....	99
FIGURA 5.22 Curvas de ruptura em coluna cromatográfica hidrofóbica em função da concentração de cloreto de sódio.....	102

FIGURA 5.23	Curvas de ruptura em coluna cromatográfica hidrofóbica para diferentes alturas de leito e vazão constante de 1 mL/min.....	104
FIGURA 5.24	Curvas de ruptura em coluna cromatográfica hidrofóbica para diferentes alturas de leito e vazão constante de 0,6 mL/min.....	105
FIGURA 6.1	Perfil de concentração de lipase na saída de cada estágio.....	108
FIGURA 6.2	Perfil de contaminantes na saída de cada estágio.....	109
FIGURA 6.3	Perfil de concentração de cloreto de sódio em cada estágio.....	110
FIGURA 6.4	Perfil da enzima adsorvida à resina em cada estágio.....	110
FIGURA 6.5	Variação do comportamento da constante k_1 durante a purificação de lipase utilizando o processo CARE.....	111
FIGURA 6.6	Variação do comportamento da constante k_2 durante a purificação de lipase utilizando o processo CARE.....	112
FIGURA 6.7	Variação do comportamento da capacidade máxima de adsorção Q_m durante a purificação de lipase utilizando o processo CARE.....	112
FIGURA 6.8	Efeito das variáveis principais obtidos pelo planejamento experimental na resposta Rendimento (%).....	115
FIGURA 6.9	Efeitos das variáveis independentes sobre as variáveis resposta obtidos pelo planejamento fatorial de primeira ordem.....	117
FIGURA 6.10	Superfície de Resposta para Rendimento (%) em função de τ_{uh1} e τ_{uh3}	119
FIGURA 6.11	Superfície de Resposta para Rendimento (%) em função de τ_{uh2} e τ_{uh3}	119
FIGURA 6.12	Superfície de Resposta para Rendimento (%) em função de τ_{uh3} e τ_{aus}	119
FIGURA 6.13	Superfície de Resposta para Rendimento (%) em função de τ_{uh2} e τ_{aus}	119
FIGURA 6.14	Superfície de Resposta para Fator de purificação em função de τ_{uh1} e τ_{uh3}	121
FIGURA 6.15	Superfície de Resposta para Fator de purificação em função de τ_{uh2} e τ_{uh3}	121

FIGURA 6.16	Superfície de Resposta para Fator de purificação em função de Tauh3 e Taus.....	121
FIGURA 6.17	Superfície de Resposta para Fator de purificação em função de Tauh2 e Taus.....	121
FIGURA 6.18	Superfície de Resposta para RO em função de Tauh1 e Tauh3.....	123
FIGURA 6.19	Superfície de Resposta para RO em função de Tauh2 e Tauh3.....	123
FIGURA 6.20	Superfície de Resposta para RO em função de Tauh3 e Taus.....	123
FIGURA 6.21	Superfície de Resposta para RO em função de Tauh2 e Taus.....	123

ÍNDICE DE TABELAS

	página
TABELA 2.1 Temperatura e pH ótimos e Termo-tolerancia de Lipases microbianas.....	5
TABELA 2.2 Microrganismos produtores de lipase.....	11
TABELA 2.3 Áreas de aplicação industrial das lipases microbianas.....	16
TABELA 2.4 Métodos cromatográficos para purificação de proteínas em grande escala.....	18
TABELA 5.1 “Screening” de resinas hidrofóbicas para purificação de lipase de <i>Geotrichum sp.</i>	82
TABELA 5.2 Efeito da concentração de cloreto de sódio na purificação parcial de lipase de <i>Geotrichum sp.</i> utilizando coluna de Butyl Sepharose.....	85
TABELA 5.3 : Purificação de lipase de <i>Geotrichum sp.</i> em coluna de troca iônica.....	86
TABELA 5.4 Purificação de lipase de <i>Geotrichum sp.</i> usando coluna hidrofóbica de Butyl Sepharose.....	86
TABELA 5.5 Purificação de lipase de <i>Geotrichum sp.</i> usando coluna hidrofóbica de Butyl Sepharose (5 cm altura resina e 1 cm diâmetro coluna).....	87
TABELA 5.6 Valores dos parâmetros cinéticos para adsorção de lipase por Butyl Sepharose em função da concentração de NaCl.....	93
TABELA 5.7 Valores dos parâmetros cinéticos intrínsecos k_1 e k_2 na adsorção de lipase por Butyl Sepharose em função da concentração de NaCl.....	94
TABELA 5.8 Eficiência da coluna de Butyl Sepharose na recuperação de atividade lipolítica a diferentes condições de vazão e altura do leito.....	97
TABELA 5.9 Densidade do caldo de fermentação contendo lipase de <i>Geotrichum sp.</i> em diferentes concentrações de NaCl.....	100
TABELA 5.10 Viscosidade cinemática e absoluta do caldo de fermentação contendo lipase de <i>Geotrichum sp.</i> a diferentes concentrações de NaCl.....	101
TABELA 5.11 Parâmetros utilizados na simulação de coluna cromatográfica	

	hidrofóbica em diferentes concentrações de cloreto de sódio.....	102
TABELA 5.12	Parâmetros utilizados na simulação de coluna cromatográfica hidrofóbica em diferentes alturas de leito e vazão constante de 1,0 mL/min.....	103
TABELA 5.13	Parâmetros utilizados na simulação de coluna cromatográfica hidrofóbica em diferentes alturas de leito e vazão constante de 0,6 mL/min.....	104
TABELA 6.1	Valores utilizados na simulação do processo CARE para purificação de lipase de <i>Geotrichum sp.</i> a partir de caldo bruto.....	107
TABELA 6.2	Valores de operação obtidos por simulação do processo CARE para purificação de lipase de <i>Geotrichum sp.</i> a partir de caldo bruto.....	108
TABELA 6.3	Níveis das variáveis consideradas para o planejamento fatorial fracionário.....	113
TABELA 6.4	Matriz do planejamento fatorial fracionário para otimização do processo CARE para purificação de lipase.....	114
TABELA 6.5	Níveis das variáveis consideradas para o planejamento fatorial completo.....	115
TABELA 6.6	Matriz de planejamento para otimização do processo CARE para purificação de lipase.....	116
TABELA 6.7	Análise de variância para ajuste do modelo de 2 ^a . ordem para o Rendimento (%)......	118
TABELA 6.8	Análise de variância para ajuste do modelo de 2 ^a . ordem para o fator de purificação FP.....	120
TABELA 6.9	Análise de variância para ajuste do modelo de 2 ^a . ordem para RO.....	122
TABELA 6.10	Comportamento do sistema CARE sob diferentes condições de operação.....	124

NOMENCLATURA

sub-índices

1: primeiro estágio do processo	3: terceiro estágio do processo
2: segundo estágio do processo	0: valor inicial de alimentação

A – área da secção transversal da coluna	(m ²)
C ₀ – concentração de lipase na alimentação	(U/mL; U/litro; U /m ³)
C - concentração da lipase em solução	(U/mL; U/litro; U/m ³)
C* - concentração de equilíbrio da fase líquida	(U/mL; U/litro; U/m ³)
C _{TO} – concentração de contaminantes	(g/litro)
D - difusividade molecular da enzima	(m ² /h)
E – coeficiente de dispersão axial da enzima em solução	(m ² /h)
F - vazão de alimentação	(litro/h)
F _r - vazão de reciclo	(litro/h)
FC - fator de concentração	
FP - fator de purificação	
k ₁ - constante cinética de adsorção	(mL/U-min; litro/U-h)
k ₂ - constante cinética de dessorção	(min ⁻¹ , h ⁻¹)
k ₃ - constante cinética de dessorção	(min ⁻¹ ; h ⁻¹)
L - comprimento do leito da coluna	(m)
Q - quantidade de lipase adsorvida na resina	(U/kg; U/m ³ de resina)
Q _m - capacidade máxima de adsorção	(U/kg, U/m ³ resina)
Q* - quantidade de lipase adsorvida no equilíbrio	(U/kg, U/m ³ resina)
r _e - velocidade de reação da enzima livre	(U/litro h)
r _q - velocidade de reação da enzima adsorvida	(U/litro h)
R - radio da coluna tubular	(m)
RO – resposta otimizada	
Rs- taxa de adsorção de lipase pela resina	(U/m ³ resina h)
S - concentração de cloreto de sódio	(moles/litro)

v - velocidade de escoamento da solução de lipase	(m/h)
t - tempo	(h)
$Tauh1$ - tempo hidráulico no primeiro estágio	(h)
$Tauh2$ - tempo hidráulico no segundo estágio	(h)
$Tauh3$ - tempo hidráulico no terceiro estágio	(h)
$Taus$ - tempo hidráulico dos sólidos	(h)
U - unidades de atividade lipolítica	
V_L - volume de líquido	(litro)
V_s - volume de sólidos	(litro)
Z - distância	(m)

Letras gregas

ε - Porosidade (fração líquida)	
μ - viscosidade da solução que contém a enzima	(kg/m h)
τ - tempo de residência	(h)
ψ - razão entre vazões F_r/F_1	
γ - razão entre vazões F_1/F_2	
δ - razão entre vazões F_1/F_3	

TESE DE DOUTORADO

Autor: Oscar Wilfredo Mendieta Taboada
Título: Purificação de lipase de *Geotrichum sp.* por resina cromatográfica de interação hidrofóbica. Modelagem, simulação e validação de parâmetros
Orientador: Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
Departamento de Engenharia de Alimentos – DEA/FEA/UNICAMP, Dezembro 1999

RESUMO

As lipases (EC 3.1.1.3) são um grupo de enzimas com diversas aplicações na indústria farmacêutica, de química fina, óleoquímica e alimentar. Estas enzimas ocorrem em animais e plantas e podem ser produzidas por microrganismos como fungos e bactérias. A recuperação e purificação destas enzimas para serem utilizadas como biocatalisadores têm sido feita por diferentes métodos, entre eles, a cromatografia.

O presente trabalho trata sobre a produção e purificação de lipase do fungo *Geotrichum sp.* A produção de lipase foi realizada em meio complexo composto por água de maceração de milho (5%), nitrato de amônio (0,5%) e óleo de oliva (1%), obtendo-se valores elevados de atividade lipolítica em torno de 20 U/mL.

A recuperação da lipase presente no caldo de fermentação foi feita com Butyl Sepharose. As condições mais adequadas para a adsorção de lipase na resina hidrofóbica foram concentração de cloreto de sódio 2M e pH 7, sendo a eluição efetuada com tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7.

Estudou-se a cinética de adsorção e foram determinadas as isotermas de adsorção a diferentes concentrações de cloreto de sódio, na faixa de 0,5M a 2M, obtendo-se as constantes cinéticas Q_m e k_d através do ajuste dos valores experimentais à equação de Langmuir. Os valores das constantes k_1 e k_2 ($k_d=k_2/k_1$) foram obtidos por ajuste dinâmico utilizando o método de Runge-Kutta de 4ª ordem. As constantes cinéticas foram utilizadas para simulação de curvas de ruptura, que foram comparadas com curvas de ruptura

experimentais obtidas por injeção do caldo bruto de fermentação contendo diferentes teores de cloreto de sódio, em coluna cromatográfica de Butyl Sepharose montada num FPLC. O grau de ajuste entre as curvas experimentais e as simuladas foi bom.

Finalmente, foi realizada a simulação e a otimização do processo CARE (“Continuous Adsorption Recycle Extraction”), utilizando as constantes cinéticas de adsorção da lipase sobre Butyl Sepharose determinadas experimentalmente, obtendo-se faixas de operação que permitem ter rendimento (recuperação da enzima) em torno de 60% e fator de purificação de 14 vezes, mas o fator de concentração é baixo. Estes resultados indicam o potencial de aplicação do processo para purificação de lipase.

Palavras chave: Adsorção, recuperação, Butyl Sepharose, cromatografia

DOCTORATE THESIS

Author: Oscar Wilfredo Mendieta Taboada

Title: Purification of lipase from *Geotrichum sp.* by hydrophobic interaction chromatographic resin. Modeling, simulation and parameters validation

Major Professor: Dr. Francisco Maugeri Filho

Department of Food Engineering – DEA/FEA/UNICAMP, December 1999

ABSTRACT

Lipases (EC 3.1.1.3) are a group of enzymes with diverse applications in the pharmaceutical, fine chemistry, oil chemistry and food industries. These enzymes occur in animals and plants and can be produced by microorganisms such as fungi and bacteria. The recovery and purification of these enzymes for being used as biocatalysts have been carried out by different methods, among them, chromatography. The present work deals with the production and purification of lipase from *Geotrichum sp.* fungi. The production of lipase was carried out in a complex medium composed of corn steep liquor (5%), ammonium nitrate (0,5%) and olive oil (1%). The values obtained for the lipolytic activity were around 20 U/mL.

The recovery of lipase present in the fermentation broth was made using Butyl Sepharose. The best conditions for the lipase adsorption in the hydrophobic resin were a 2M sodium chloride concentration and pH 7, being the elution effected with a 10 mM sodium phosphate buffer at pH 7.

Adsorption kinetics was studied and the adsorption isotherms were determined at different sodium chloride concentrations, in the range of 0,5M to 2M. The kinetic constants Q_m and k_d were obtained by fitting the experimental values to the Langmuir equation. The constant values k_1 and k_2 ($k_d=k_2/k_1$) were obtained by dynamic fitting using the 4th order Runge-Kutta method. The kinetic constants were used for breakthrough curves simulation, and were compared with experimental breakthrough curves obtained by injection of the

fermentation raw broth containing different sodium chloride contents, in a Butyl Sepharose chromatographic column assembled in a FPLC. The degree of the fit between the experimental curves and the simulated ones was good.

Finally, the CARE process ("Continuous Adsorption Recycle Extraction") simulation and optimization was carried out using the kinetic constants of lipase adsorption on Butyl Sepharose determined experimentally. Operation ranges obtained allow yields (recovery of the enzyme) around 60% and a high purification factor (14 times), but the concentration factor is low. These results indicate a process application promising potential for lipase purification.

Keywords: Adsorption, recovery, Butyl Sepharose, chromatography

I-INTRODUÇÃO

A importância das enzimas de origem microbiana tem aumentado muito com o desenvolvimento dos processos biotecnológicos substituindo, em vários casos, as de origem animal ou vegetal. Isto ocorre pois elas apresentam como principal vantagem, um curto tempo de produção, podendo ser produzidas em qualquer época do ano e permitem a utilização de substratos de baixo custo além de demandar espaço relativamente pequeno para o processo fermentativo.

A produção de lipases via processo microbiológico, tem sido bastante pesquisada nas últimas décadas. Um grande número de microrganismos foram isolados como produtores eficientes de lipase e estudados exaustivamente sob os pontos de vista industrial e acadêmico.

Devido a sua versatilidade, as lipases têm sido aplicadas em diferentes processos biotecnológicos para produção de compostos de interesse industrial e em química fina. Nas reações de hidrólise, alcoólise e glicerólise proporcionam excelente rendimento, processo mais econômico e qualidade superior do produto final; além disso, alguns dos produtos formados não poderiam ser obtidos por processos químicos convencionais, sendo por tanto produzidos em processos que utilizam lipases devido a sua especificidade (posicional ou de ácidos graxos).

A lipase produzida por uma linhagem do fungo *Geotrichum sp.* apresenta elevada especificidade pela dupla ligação cis-9 dos ácidos graxos insaturados, razão pela qual é utilizada na indústria oleoquímica como catalisador nas reações de alcoólise e interesterificação. Esta lipase apresenta também alguma especificidade pela posição C2 dos triglicerídeos.

O interesse na utilização de lipases em alimentos vem-se destacando nos últimos anos. Entre as aplicações neste campo podemos mencionar hidrólise de gordura do leite para produção de aromas ("flavors") de vários tipos de queijos maturados sob condições controladas, hidrólise de lipídeos da gema do ovo, remoção de gordura em carnes e peixes,

obtenção de produtos com propriedades similares a manteiga de cacau, interesterificação de óleos e gorduras, além de ter aplicação na produção de aromas “naturais” (bioaromas), na indústria farmacêutica e outras.

Para o caso de aplicações de bioconversão industrial, catalisadores puros são desejáveis, pois além da elevada eficiência, o volume do reator é reduzido e diminuem as etapas de purificação do produto.

Entre os métodos de recuperação de bioprodutos de grande aplicação podemos mencionar a cromatografia de interação hidrofóbica (HIC), que pode ser aplicada à purificação de lipases pois estas apresentam um alto grau de hidrofobicidade, pouco usual entre as enzimas. Ao contrário da cromatografia de fase reversa na qual as biomoléculas são desnaturadas, na recuperação com resinas hidrofóbicas, as biomoléculas mantêm sua atividade biológica. O fator limitante na aplicação de métodos cromatográficos na recuperação de bioprodutos é o elevado custo desta tecnologia; somente em aplicações médicas ou analíticas o preço das enzimas permite a utilização de etapas cromatográficas no processo de purificação.

Um método alternativo de purificação é o processo CARE (“Continuous Adsorption Recycle Extraction”), no qual o produto é recuperado de maneira contínua e a resina cromatográfica é recirculada durante o processo; isto permite baixar os custos na etapa de purificação.

Os objetivos considerados no presente trabalho foram:

Selecionar um meio de cultura para produção de lipase por *Geotrichum sp.*;

Estudar e selecionar resinas cromatográficas de interação hidrofóbica (HIC) e as condições de adsorção e eluição de lipase;

Estudar a cinética de adsorção de lipase com o emprego de resina cromatográfica de interação hidrofóbica;

Simular o processo de adsorção de lipase em resina hidrofóbica em banho finito;

Simular e validar a purificação de lipase de *Geotrichum sp.* em coluna de leito fixo com resina de interação hidrofóbica;

Simular e otimizar por planejamento experimental, um processo contínuo (CARE), com resina de interação hidrofóbica, para purificação de lipase.

II-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1-Lipases

Enzimas lipolíticas, como lipases e estearases, constituem um importante grupo de enzimas associadas com o metabolismo e com a degradação de lipídeos. Estas enzimas são amplamente distribuídas na natureza estando presentes em tecidos e fluidos de origem animal, vegetal e em microrganismos (SHAHANI, 1975).

2.1.1-Propriedades

As lipases diferenciam uma das outras devido à suas propriedades físicas e características bioquímicas como: especificidade pelo substrato, condições ótimas de reação, sensibilidade a inibidores e necessidade de ativadores. BÖRGSTROM & BROCKMAN (1984) relataram que, dependendo do microrganismo produtor de lipase, a massa molecular desta enzima pode variar na faixa de 20000 a 200000 Da, apresentando atividade enzimática numa ampla faixa de pH (4-9) e temperatura (25-70 °C).

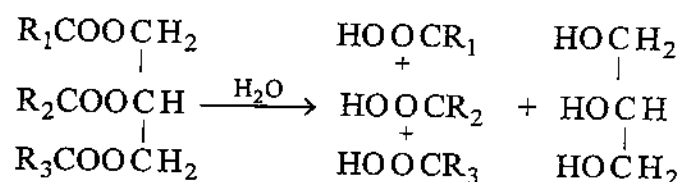
Algumas propriedades de diversas lipases microbianas (pH e temperatura ótimos e termo-tolerância) são apresentadas na Tabela 2.1 (SHAHANI, 1975).

TABELA 2.1. Temperatura e pH ótimos e termo-tolerância de lipases microbianas

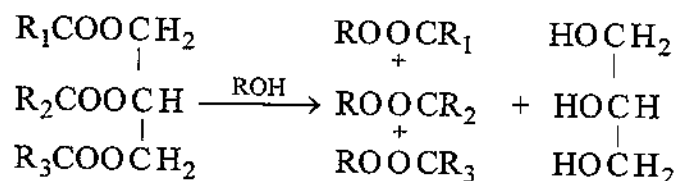
Fonte da lipase	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Termo-tolerância (tempo:temperatura)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	6,2-6,8	37	--
<i>Pseudomonas fragi</i>	7,0-7,2	32	15 min.:72 °C
<i>Rhizopus delemar</i>	5,6	35	15 min.:50 °C
<i>Aspergillus niger</i>	5,6	25	15 min.:45 °C
<i>Penicillium roqueforti</i>	8,0	37	10 min.:50 °C
<i>Staphylococcus aureus</i>	8,5	45	30 min.:70 °C
<i>Geotrichum candidum</i>	8,2	37	15 min.:60 °C
<i>Achromobacter lipolyticum</i>	7,0	37	40 min.:99 °C

A ação das lipases sobre óleos e gorduras é de clivagem das ligações ésteres de glicerídeos liberando ácidos graxos, monoglicerídeos ou diglicerídeos, ou ainda através das interesterificações de óleos e gorduras produzindo monoglicerídeos, ou diglicerídeos desejados ou alterando a composição de ácidos graxos, de óleos e gorduras. Por esta razão as lipases (glicerol éster hidrolases EC 3.1.1.3) apresentam enorme potencial de aplicação na indústria óleoquímica. Gorduras e óleos são produzidos mundialmente em cerca de 6×10^7 toneladas/ano e uma parte em reações de hidrólise, alcoólise e glicerólise (VULFSON, 1993). As lipases são capazes de catalisar as seguintes reações:

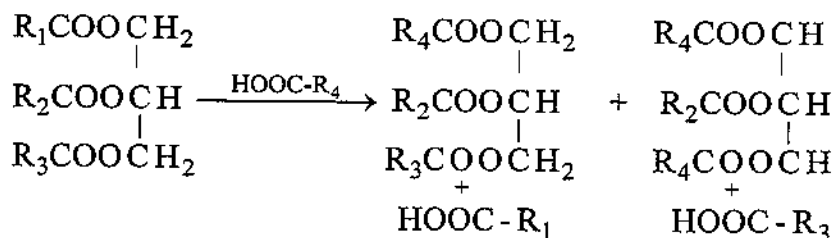
a-Hidrólise:



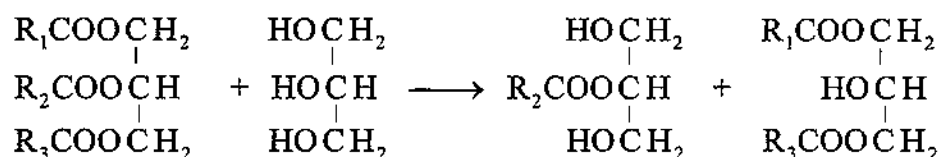
b-Alcoólise:



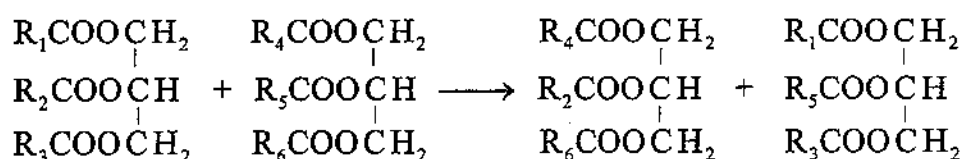
c-Acidólise:



d-Glicerólise:



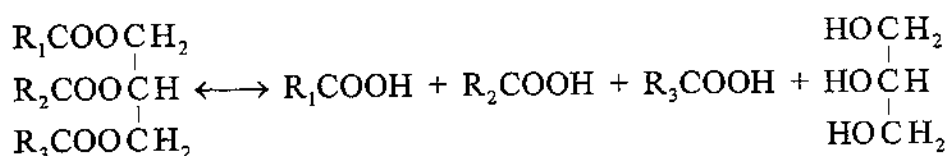
e-Transesterificação:



As lipases, de acordo com sua especificidade, estão divididas em três grupos, segundo MACRAE (1983) e FOGLIA *et al.* (1993):

1-Lipases não específicas

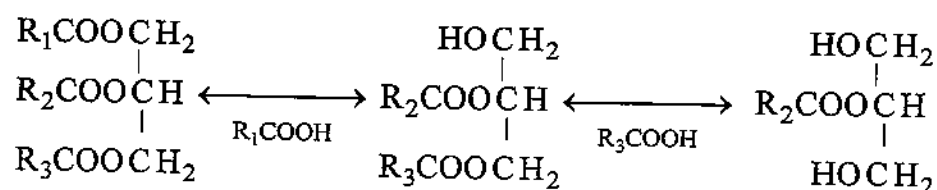
Catalisam a hidrólise completa dos triglicerídeos em ácidos graxos e glicerol, apresentando mono e di-glicerídios como intermediários, atuando de modo aleatório. As lipases de *Candida cylindracea*, *Corynebacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas fluorescens* têm sido comumente usadas para a síntese de acilglicerol, alcoólise e interesterificação de glicerídios:



2-Lipases 1,3-específicas

Catalisam a hidrólise dos ácidos graxos ligados ao C₁ e C₃ do glicerol, produzindo ácidos graxos e 2-monoglicerídios ou 1,2 ou 2,4-diglicerídios, ambos quimicamente instáveis, ocorrendo migração do grupo acil produzindo 1,3-diglicerídios e 1- ou 3-

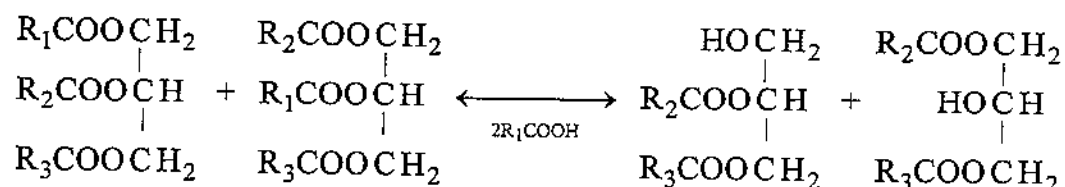
monoglicerídios. Neste grupo, temos como exemplo, as lipases produzidas pelo *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Mucor miehei* e por várias espécies de *Rhizopus*:



Uma lipase com especificidade para hidrolisar os ácidos graxos ligados ao C₂ do glicerol, é a lipase do *Geotrichum candidum* (SUGIHARA *et al.*, 1991a, 1993; SOBERON-CHÁVEZ & PALMEROS, 1994).

3-Lipases ácido graxo específicas

São específicas para hidrólise de ésteres com determinados ácidos graxos. Por exemplo, a lipase produzida pelo *Geotrichum candidum* que hidrolisa preferencialmente ésteres de ácidos graxos de cadeia longa insaturados, com dupla ligação *cis*, no C₉. Ésteres com ácidos graxos saturados ou sem insaturação no C₉, são lentamente hidrolisados. Devido à esta especificidade, lipase de *Geotrichum candidum* tem sido estudada para alcoólise de óleos selecionados que contém ácidos graxos poliinsaturados:



As enzimas lipolíticas também realizam a reação inversa da hidrólise, esterificando glicerol e ácidos graxos, podendo produzir glicerídeos desejados, desde que o meio tenha concentração restrita de água.

Estas propriedades determinam a importância biotecnológica das lipases. A relativa disponibilidade de grandes quantidades de enzimas microbianas obtidas por bioprocessos tem ampliado a pesquisa sobre o uso, com potencial industrial, de lipases produzidas por fungos e bactérias (TAIPA *et al.*, 1992).

Devido a sua versatilidade, as lipases têm sido aplicadas em diferentes sistemas para processos biotecnológicos de compostos de interesse industrial e em química fina. As reações de síntese catalisadas por lipases requerem uma quantidade reduzida de água em vez de sistemas anidros, pois a água é essencial para a catálise enzimática, devido à contribuição para as ligações não covalentes e pontes de hidrogênio preservando a estrutura protéica. A quantidade de água influencia na solubilidade do substrato e dos produtos, causando efeito sobre a posição de equilíbrio e rendimento químico (PIMENTEL, 1996).

2.1.2-Produção de lipases microbianas

As lipases são produzidas por uma grande variedade de microrganismos, geralmente são extracelulares e induzíveis, em alguns casos, pela inclusão de substratos no meio de cultura (SHAHANI, 1975). Alguns microrganismos produtores de lipase relatados pela literatura, são apresentados na Tabela 2.2.

Na Universidade Estadual de Campinas também existe grande interesse na produção de lipases microbianas. Várias pesquisas foram desenvolvidas neste campo nos últimos cinco anos junto aos Departamentos de Ciência de Alimentos, Engenharia de Alimentos e Química Orgânica. Apresenta-se a seguir uma breve resenha dos mesmos.

Uma enzima lipolítica extracelular, produzida por *Trichoderma sp.*, foi obtida por PASTORE (1992). A enzima, classificada como glicerol-mono éster hidrolase E.C. 3.1.1.3, hidrolisa eficientemente as ligações éster de monoleína, e do substrato paranitrofenil laurato, não tendo afinidade por trioleína. A lipase de *Trichoderma sp.* é termosensível e apresenta atividade ótima em tampão acetato pH 5,6 a 40-45°C e maior estabilidade na faixa de pH 5,0 a 7,0 em tampão acetato e fosfato, respectivamente.

Lipase extracelular de *Geotrichum sp.*, que hidrolisa preferencialmente ésteres de ácidos graxos de cadeia longa insaturada e não tem afinidade pelo substrato paranitrofenil laurato, foi obtida por MACÊDO (1995). A enzima purificada possui duas subunidades de peso molecular estimado em 52000 e 57000 daltons. Esta lipase apresentou atividade ótima na faixa de pH 5 a 8 a 45°C.

A produção de lipase extracelular pelo *Alcaligenes sp.* foi estudada por SOUSA (1996). A linhagem apresentou alta produção de lipase alcalina (8,5 U/min/mL) em meio composto por 2% de farinha de soja torrada, 1% de farinha de trigo, 0,5% de K_2HPO_4 , 1% de água de maceração de milho (corn steep liquor) e 0,2% de Na_2CO_3 . Na purificação foram detectadas 2 frações com atividade lipolítica. A fração I apresentou atividade ótima em pH 8 a 40 °C, em tanto que a fração II apresentou atividade ótima em pH 9 a 45 °C.

Uma lipase de *Aspergillus sp.* linhagem nº 1068, que hidrolisa preferencialmente gordura de coco, com pequena atividade contra óleo de oliva e apresenta afinidade pelo substrato p-nitrofenil-laurato, foi obtida por COSTA (1996). A enzima apresentou atividade ótima em pH 5,6 e 40 °C com óleo de oliva como substrato.

Com o intuito de otimizar a produção de lipases por fungos filamentosos, PIMENTEL (1996), isolou o *Penicillium citrinum* como melhor produtor de lipase, quando comparado com o *Gliocladium viride* 136B e *Fusarium lateritium* 48; o extrato enzimático bruto, concentrado e liofilizado, foi estável durante o armazenamento à temperatura ambiente por 8 meses, enquanto que o filtrado bruto do meio de cultura armazenado a 6°C apresentou meia-vida de 30-35 dias, e foi estável ao congelamento e descongelamento, perdendo 50% da atividade inicial.

O *Penicillium citrinum* também foi utilizado por RODRIGUES (1997) para produção de lipase a partir dos meios MEL (meio com extrato de levedura) e MSA (meio com sulfato de amônio). A lipase obtida manteve sua atividade inalterada após 60 dias de armazenamento a temperatura de 6 °C, quando condicionada no próprio extrato parcialmente purificado. O pH ótimo da enzima foi na faixa de 8,0-8,5 e a temperatura ótima 37 °C. A enzima foi imobilizada num suporte de dacron-hidrazida magnetizado, mostrando uma atividade específica de 73% da enzima solúvel, e utilizada na eliminação de resinas em lignocelulósicos.

MEDEIROS (1998), estudou através de planejamento experimental o efeito das variáveis independentes (glicose, água de maceração de milho, nitrato de amônio, óleo de oliva e óleo de soja) na produção de lipase por *Geotrichum sp.* Os melhores resultados foram obtidos quando se utilizou óleo de soja como indutor da produção de lipase.

TABELA 2.2. Microrganismos produtores de lipase

Microrganismo	Referência
<i>Achromobacter lipolyticum</i>	KILARA (1985)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	HAFERBURG & KLEBER (1982)
<i>Alcaligenes sp.</i>	SOUSA (1996)
<i>Aspergillus niger</i>	HATZINIKOLAOU <i>et al.</i> (1996), MACRIS <i>et al.</i> (1996)
<i>Aspergillus oryzae</i>	OHNISHI <i>et al.</i> (1994)
<i>Aspergillus sp.</i>	COSTA (1996)
<i>Bacillus acidocaldarius</i>	MANCO <i>et al.</i> (1994)
<i>Bacillus licheniformis</i>	SZTAJER <i>et al.</i> (1988)
<i>Bacillus sp.</i> IHI-91	BECKER <i>et al.</i> (1997)
<i>Bacillus thermocatenuatus</i>	RUA <i>et al.</i> (1997)
<i>Candida cylindracea</i>	CASTRO & ANDERSON (1995)
<i>Candida rugosa</i>	PASTORE (1992), RAO <i>et al.</i> (1993), GORDILLO <i>et al.</i> (1995), LOPEZ <i>et al.</i> (1996)
<i>Corynebacterium acnes</i>	KILARA (1985)
<i>Flavobacterium odoratum</i>	LABUSCHAGNE <i>et al.</i> (1997)
<i>Fusarium oxysporum</i>	RAPP (1995)
<i>Galactomyces geotrichum</i>	PHILIPS & PRETORIUS (1991)
<i>Geotrichum candidum</i>	ARENDS <i>et al.</i> (1986), BAILLARGEON <i>et al.</i> (1989), BAILLARGEON & MCCARTHY (1991), BAILLARGEON & SONNET (1991), HANG & WOODAMS (1990), IWAI <i>et al.</i> (1973), JACOBSEN <i>et al.</i> (1989a), SHIMADA <i>et al.</i> (1992), SIDEBOTTOM <i>et al.</i> (1991), TAHOUN <i>et al.</i> (1982), TSUJISAKA <i>et al.</i> (1973a,b), VEERARAGAVAN <i>et al.</i> (1990)
<i>Geotrichum sp.</i>	ASAHARA <i>et al.</i> (1993), IKEMOTO & OTA (1996), MACÊDO (1995), MEDEIROS (1998), MENDIETA <i>et al.</i> (1998a)
<i>Humicola lanuginosa</i>	OMAR <i>et al.</i> (1987)

TABELA 2.2 (Continuação). Microrganismos produtores de lipase

Microrganismo	Referência
<i>Lactobacillus brevis</i>	CHANDER <i>et al.</i> (1973)
<i>Lactobacillus casei</i>	LEE & LEE (1990)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	GOBETTI <i>et al.</i> (1996)
<i>Micrococcusfreundereichii</i>	LAWRENCE <i>et al.</i> (1967)
<i>Mucor miehei</i>	HUGE-JENSEN <i>et al.</i> (1987), GULYAMOVA & DAVRANOV (1993)
<i>Myxococcus xanthus</i>	KIMURA <i>et al.</i> (1983)
<i>Penicillium camembertii</i>	YAMAGUCHI & MASE (1991)
<i>Penicillium citrinum</i>	MALISZEWSKA & MASTALERZ (1992), PIMENTEL <i>et al.</i> (1994)
<i>Penicillium expansum</i>	STÖCKLEIN <i>et al.</i> (1993)
<i>Penicillium restrictum</i>	FREIRE <i>et al.</i> (1997)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CHARTRAIN <i>et al.</i> (1993), MARCIN <i>et al.</i> (1993)
<i>Pseudomonas fragi</i>	PABAI <i>et al.</i> (1995)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	HARRIS <i>et al.</i> (1990), SZTAJER <i>et al.</i> (1988)
<i>Propionibacterium acnes</i>	CASTRO & ANDERSON (1995)
<i>Rhizopus arrhizus</i>	CASTRO & ANDERSON (1995)
<i>Rhizopus delemar</i>	HAAS <i>et al.</i> (1992), MARTINEZ-CRUZ <i>et al.</i> (1993), PARK <i>et al.</i> (1988)
<i>Rhizopus niveus</i>	KOHNO <i>et al.</i> (1994)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SHIRAZI <i>et al.</i> (1998)
<i>Serratia marcescens</i>	HENRIETTE <i>et al.</i> (1993)
<i>Staphylococcus aureus</i>	CASTRO & ANDERSON (1995)
<i>Staphylococcus wernerii</i>	TALON <i>et al.</i> (1995)
<i>Streptococcus lactis</i>	KAMALY <i>et al.</i> (1990)
<i>Streptococcus cremoris</i>	KAMALY <i>et al.</i> (1990)

2.1.3-Aplicações

Em 1956, HARPER & LONG analisaram a influência de ácidos graxos livres em queijo provolone comercial, e verificaram que o tipo de ácido graxo formado dependia do tipo de lipase utilizada na sua produção, sendo que a intensidade do sabor desejável está relacionada com a concentração de ácido butírico produzido e ácido glutâmico liberado.

SEITZ em 1974, descreveu as diversas aplicações industriais para lipases microbianas entre elas, a aplicação de lipases em processamento de alimentos, principalmente em laticínios na produção de aromas em queijos. Microrganismos com atividade lipolítica presentes em leite não pasteurizado (*Pseudomonas fragi*, *P. fluorescens* e *Achromobacter lipolyticus*) são essenciais na produção de aromas em queijos devido a produção de ácidos graxos.

POSORSKE (1984), relatou as aplicações da lipase na indústria de óleos e gorduras tendo verificado que as enzimas em geral têm vantagens no processo industrial em relação aos processos químicos tradicionais, como por exemplo: 1) a especificidade, que permite o controle dos produtos elaborados e também evita a síntese de produtos secundários não desejados; 2) condições brandas de reação e redução do desperdício; 3) baixo custo.

Os principais setores em que as lipases são utilizadas na área de óleos e gorduras, são: a síntese de lipídios pela reversão da hidrólise, hidrólise enzimática de gorduras para a produção de ácidos graxos e a modificação enzimática de lipídios por interesterificação (CANTO, 1995).

O emprego de lipases na produção de queijos especiais é usual em empresas brasileiras, uma vez que essa enzima, que é natural no leite cru, é inativada durante a operação de pasteurização do leite, operação esta obrigatória em queijarias, sendo ilegal o uso de leite cru. Na produção de queijos Provolone, com peso superior a 8 kg, são utilizadas lipases com o objetivo de reduzir o período de cura a 45 dias; sem a lipase não se consegue o mesmo sabor, nem alongando-se o período de cura (CANTO, 1995).

A transformação do óleo de palma mediante interesterificação enzimática, em uma gordura com propriedades semelhantes à da manteiga de cacau, que é um produto de maior preço e com características específicas como o uso em chocolates, é indicada por vários autores (STEAD, 1986; HARWOOD, 1989; VULFSON, 1993; DAVRANOV, 1994; JAEGER *et al.*, 1994; CASTRO & ANDERSON, 1995; CANTO, 1995; GHOSH *et al.*, 1996). Também é possível, com o uso de lipases, modificar as características da margarina, podendo-se modificar seu ponto de fusão, untuosidade, vida-de-prateleira e as propriedades nutricionais do produto final (SCHMID & VERGER, 1998).

A produção de bebidas alcoólicas por processo fermentativo, como o “sake”, também envolve o uso de lipases que promovem a formação do aroma e aceleram a fermentação pela remoção de lipídios (SOUSA, 1996).

SEITZ (1974), GILBERT (1993), GANDHI (1997) e SOBERON-CHAVEZ & PALMEROS (1994), relatam a utilização de lipases em sistemas de detergentes. Lipases microbianas (*Candida lipolytica*, *Candida cylindracea* e *Pseudomonas stutzeri*), são preferidas em relação às obtidas de plantas ou fonte animal, devido a sua maior adequação para a incorporação em sistemas detergentes e estabilidade frente aos surfactantes iônicos presentes nas formulações de detergentes.

FUJII *et al.*, em 1986, estudaram o efeito da lipase de *Candida cylindracea* na remoção de óleo de oliva impregnado em tecido de algodão, visando a aplicação de lipases em detergentes para lavanderia. Resultados mostraram que à medida que a concentração de lipase aumentou, na presença de tensoativos, a remoção do óleo foi melhor. Os agentes tenso ativos mais adequados foram os não iônicos, quando a atividade da lipase é menos afetada. A temperatura ótima de lavagem foi de 37 °C que é a temperatura ótima desta enzima. Os dados mostram que a utilização de lipase de *C. cylindracea* na lavagem à 37 °C aumenta em 20% a remoção de óleo da fibra de algodão.

Na área farmacêutica, lipases podem ser utilizadas para promover a digestão de óleos e gorduras dos alimentos, atuando como enzimas digestivas e em “kits” para diagnóstico de triglicerídeos sanguíneos (SOUSA, 1996).

Um importante produto lipídico com grande potencial é o substituto sintético das gorduras. Tem grande procura já que pode substituir diversas gorduras e óleos altamente calóricos, além de possuir elevada estabilidade térmica e não ser absorvido pelo corpo (GANDHI, 1997).

Através da utilização de lipases pode-se sintetizar o açúcar não natural L-glucose, que tem uso potencial como adoçante não calórico (SOBERON-CHÁVEZ & PALMEROS, 1994).

O enriquecimento de triglicerídeos com ácidos graxos n-3 poliinsaturados (PUFA) em óleos de sardinha e de fígado de bacalhau, até 20% a mais que no óleo original é relatada por CASTRO & ANDERSON (1995) e GANDHI (1997).

A mais importante aplicação das lipases em química orgânica é a produção de compostos opticamente ativos ou compostos quirais (BJÖRKLING *et al.*, 1991; GILBERT, 1993; JAEGER *et al.*, 1994; CASTRO & ANDERSON, 1995; GHOSH *et al.*, 1996; SCHMID & VERGER, 1998). As lipases são utilizadas na síntese destes compostos pois são capazes de transformar álcoois racêmicos e ácidos carboxílicos através da hidrólise ou esterificação (SOBERON-CHÁVEZ & PALMEROS, 1994).

Uma aplicação analítica das lipases, na determinação de lipídeos, é o desenvolvimento de biosensores de lipase que podem ser utilizados para a diagnose de amostras clínicas, nas indústrias de alimentos e bebidas, na análise de poluentes (contaminação por pesticidas) e na indústria farmacêutica (BENJAMIN & PANDEY, 1998).

As lipases microbianas podem também ser utilizadas em cosméticos atuando na remoção de lipídios na epiderme (SEITZ, 1974).

Na indústria de polpa e papel o depósito de resinas sobre os cilindros de secagem é, em muitos casos, um problema sério que diminui a qualidade do papel e a produtividade. O tratamento da polpa com lipases permite uma considerável melhora na produtividade com aumento da qualidade (BJÖRKLING *et al.*, 1991; SCHMID & VERGER, 1998).

Diversas aplicações industriais das lipases microbianas, mencionadas por GODTFREDSSEN (1990), se encontram na Tabela 2.3.

TABELA 2.3. Áreas de aplicação industrial das lipases microbianas

Indústria	Efeito	Produtos
Alimentos lácteos	Hidrólise de gordura de leite Maduração do queijo Modificação da manteiga	Agentes saborizantes
Panificação	Melhora do sabor e aumento da vida de prateleira	Produtos de panificação
Bebidas	Melhora do aroma	Bebidas
Temperos	Melhora da qualidade	Maionese, cremes
Carne e peixe	Desenvolvimento de sabor e remoção da gordura	Produtos de carne e peixe
Óleos e gorduras	Transesterificação Hidrólise	Manteiga de cacau, margarina Ácidos graxos, glicerol, mono e diglicerídios
Química	Enantioseletividade Síntese	Compostos quirais Compostos químicos
Farmacêutica	Transesterificação Hidrólise Síntese	Lipídios especiais Ajudas da digestão Emulsificadores, umectantes
Saúde	Transesterificação	Alimentos saudáveis
Couro	Hidrólise	Produtos de couro
Papel	Hidrólise	Produtos de papel
Limpeza	Hidrólise	Agentes de limpeza (surfactantes)

2.2-Purificação de proteínas

2.2.1-Aspectos gerais

BAILEY & OLLIS, em 1986, afirmaram que o desafio dos próximos anos seria não só saber selecionar as melhores combinações de substratos, enzimas ou microrganismos e processo de fermentação, mas também o melhor processo de recuperação de um dado produto.

O objetivo principal na escolha da melhor estratégia de purificação é obter máximo rendimento com máxima pureza a custos minimizados. Para isso é necessário reduzir ao mínimo o número de etapas envolvidas (HARRIS & ANGAL, 1995).

A seqüência típica de operações para se obter um produto altamente purificado a partir do caldo de fermentação, segundo BAILEY & OLLIS (1986), é a seguinte:

1. Remoção dos insolúveis: filtração e centrifugação são as operações unitárias mais usadas nesta etapa, quase não ocorrendo concentração ou melhoramento da qualidade do produto.
2. Separação primária: extração por solvente, adsorção, precipitação e ultrafiltração são os mais conhecidos. Nesta etapa a concentração do produto desejado aumenta consideravelmente e substâncias de polaridades distintas são separadas do produto.
3. Purificação: precipitação fracionada, cromatografia, eletroforese e adsorção podem ser usadas nesta etapa. Estas técnicas são altamente seletivas para o produto, ocorrendo a remoção de impurezas com funcionalidade química e propriedades físicas semelhantes ao produto.
4. Separação final do produto: esta etapa depende da forma em que o produto será comercializada no mercado. Processos de cristalização, centrifugação e secagem (atomização, liofilização ou remoção por solvente orgânico) são etapas que podem ser usadas para a obtenção do produto seco.

Evidentemente essas etapas vão ser usadas de acordo com o tipo de produto, concentração e pureza desejadas.

2.2.2-Métodos de purificação de alta resolução

Segundo AFEYAN *et al.* (1989) os processos de purificação com alta resolução são normalmente realizados a partir de técnicas cromatográficas. Entre as várias técnicas de cromatografia disponíveis, as de troca iônica, afinidade e filtração por gel, são as mais usadas atualmente com aplicação em grande escala. A Tabela 2.4 apresenta diferentes alternativas para o uso da técnica de cromatografia em grande escala (ASENJO & PATRICK, 1990).

TABELA 2.4 Métodos cromatográficos para purificação de proteínas em grande escala

Propriedades físico-químicas	Operação	Características	Usos
Forças de Van der Waals, Pontes de Hidrogênio, Polaridade, Momento Dipolar	Adsorção	Alta resolução Alta velocidade Boa capacidade	Sorção a partir de caldo bruto de fermentação, fracionamento
Carga (Curva de titulação)	Troca iônica	Alta resolução Alta velocidade Boa capacidade	Sorção inicial, fracionamento
Hidrofobicidade na Superfície	Interação hidrofóbica	Boa resolução Velocidade e capacidade podem ser altas	Fracionamento parcial
Afinidade biológica	Cromatografia por afinidade	Excelente resolução Alta velocidade Alta capacidade	Fracionamento, adsorção a partir do caldo bruto
Ponto isoeletrico	Cromatografia de focalização	Altíssima resolução Alta velocidade Altíssima capacidade (limitada pelo tamanho)	Fracionamento, adsorção a partir do caldo bruto
Peso molecular	Filtração por gel	Resolução moderada Baixa capacidade Excelente para desalinização	Desalinização, remoção de solvente
Interações hidrofóbicas e hidrofílicas	Cromatografia líquida fase reversa	Excelente resolução Capacidade intermediária	Fracionamento

Não há regras pré-estabelecidas para determinar quais técnicas devem ser usadas para uma dada separação e purificação, no entanto, a experiência mostra que (BJURSTROM, 1985): cromatografia de troca iônica pode ser usada em qualquer etapa do processo, mas é freqüentemente empregada como uma técnica inicial, já que é capaz de reter uma grande quantidade de proteínas. Cromatografia de afinidade pode ser usada em qualquer estágio, mas é mais particularmente eficiente quando concentrações baixas do produto estiverem presentes em grandes volumes de solução contendo muitos contaminantes. Filtração em gel é mais adequada para o estágio final de purificação, se poucos contaminantes estiverem presentes e se o volume do processo não for muito grande.

2.2.3-Cromatografia de interação hidrofóbica (HIC)

Embora seja menos seletiva que a cromatografia por afinidade, é uma técnica simples com aplicabilidade muito ampla, não sendo limitada somente à separação de biomoléculas. É uma excelente complementação para cromatografia por troca iônica e permeação em gel. Considerando que relativamente poucas proteínas se ligam às cadeias alifáticas curtas imobilizadas em baixas concentrações de sal, a cromatografia por hidrofobicidade pode ser utilizada para diversos tipos de proteínas, toda vez que as interações hidrofóbicas aumentam sua intensidade com aumento na concentração de sal. A adsorção requer freqüentemente a presença de íons “salting-out” tais como cloreto de sódio e sulfato de amônio. A influência de certos íons na estrutura da proteína foi primeiro descrita por HOFMEISTER em 1888 (citado por HARRIS & ANGAL, 1995). Íons “salting-out” diminuem a disponibilidade de moléculas de água na solução, aumentam a tensão superficial e as interações hidrofóbicas. Ao contrário, íons “salting-in” ou caotrópicos como tiocianato impedem a interação não-iônica (HARRIS & ANGAL, 1995). Consequentemente em alta concentração do sal, a maioria das proteínas podem ser adsorvidas por grupos hidrofóbicos fixos na matriz.

A vantagem da cromatografia de interação hidrofóbica sobre a cromatografia de troca iônica está no fator hidrofóbico que é muito mais seletivo já que o grau de hidrofobicidade utilizado pode ser variado, enquanto que para a troca iônica a escolha está limitada a positivo ou negativo (HOFSTEE & OTILLIO, 1978). A eficácia da HIC é geralmente reduzida pela presença de contaminantes hidrofóbicos na alimentação.

2.2.3.1-Princípio do método

Interação hidrofóbica é a tendência das cadeias alifáticas ou de outras estruturas não polares de se associarem quando estão em água (YON, 1978). HOFSTEE (1973) e SHALTIEL & ER-EL (1973), propuseram o termo “cromatografia hidrofóbica” com a implícita consideração que a interação entre as proteínas e os ligantes hidrofóbicos imobilizados é similar à associação de pequenas moléculas orgânicas alifáticas em água. PORATH *et al.* (1973) sugeriram um efeito de “salting out” na adsorção hidrofóbica, ampliando as observações iniciais feitas por TISELIUS em 1948. Eles também sugeriram que “a força impulsora é o ganho de entropia a partir de mudanças na estrutura da água que rodeia e interage com os grupos hidrofóbicos”.

Este conceito foi depois estendido e formalizado por HJERTÉN (1977), quem fundamentou sua teoria na bem conhecida relação termodinâmica: $\Delta G = \Delta H - T \Delta S$. Ele considerou que o deslocamento das moléculas ordenadas de água dos arredores dos ligantes hidrofóbicos e das proteínas origina um incremento na entropia (ΔS) resultando num valor negativo para a energia livre (ΔG) do sistema. Isto implica que a interação ligante hidrofóbico-proteína é termodinamicamente favorável.

Uma teoria alternativa está baseada no paralelismo entre o efeito dos sais neutros no “salting out” e a HIC. De acordo com MELANDER & HORVATH (1977), a interação hidrofóbica é responsável pelo aumento na tensão superficial da água a partir da estrutura formada pela dissolução de sais. De fato, uma combinação dos dois mecanismos e sua extensão tem sido explorada antes que os adsorventes hidrofóbicos fossem sintetizados. SRINIVASAN & RUCKENSTEIN (1980) propuseram que a interação hidrofóbica é devida às forças de atração de Van der Waals que ocorrem entre as proteínas e os ligantes imobilizados. A base desta teoria é que as forças de atração de Van der Waals entre proteínas e ligantes aumenta na presença de sais que favorecem o “salting out”.

As proteínas são compostas por cadeias de aminoácidos, com grupos laterais ligados, alguns dos quais são hidrofóbicos. Os aminoácidos alanina, valina, leucina e isoleucina têm cadeias hidrocarbonadas ligadas; a prolina tem um hidrocarboneto cíclico

ligado; a fenilalanina, tirosina e triptofano têm anéis aromáticos ligados. As proteínas ordenam-se em soluções aquosas para atingir a mínima energia livre colocando muitos dos seus grupos hidrofóbicos dentro de si e os grupos com carga, no exterior. Alguns grupos hidrofóbicos que ficam expostos, originam regiões hidrofóbicas disponíveis para se associar com grupos hidrofóbicos de uma matriz (OCHOA, 1978; WHEELWRIGHT, 1991, PESLIAKAS *et al.*, 1992), como indicado na Figura 2.1 (SHALTIEL, 1984). Diferentes modelos de adsorção de proteínas em matrizes hidrofóbicas, sugeridos por SHALTIEL (1974) e OCHOA (1978), são apresentados na Figura 2.2.

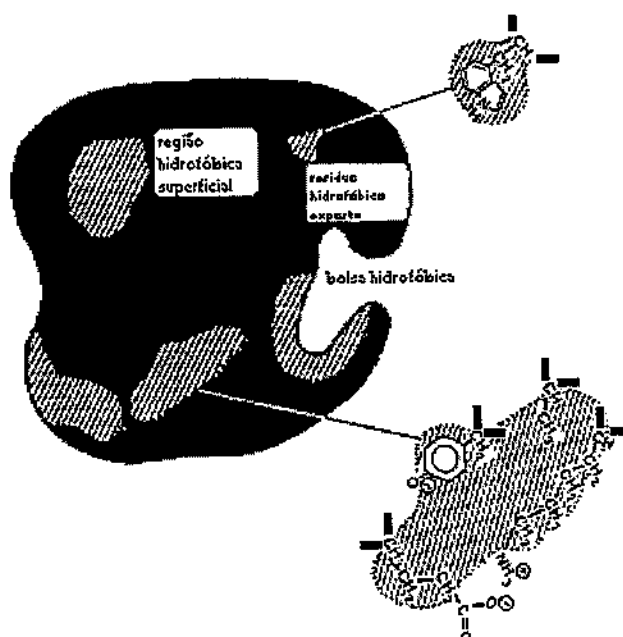


Figura 2.1. Representação esquemática da molécula de proteína indicando áreas hidrofóbicas

O modelo simplista da estrutura terciária de uma proteína confere uma envoltura externa essencialmente hidrofílica em volta de um núcleo hidrofóbico. No entanto, a hidrofobicidade da superfície ocorre devido a presença, na superfície, de cadeias de aminoácidos não polares como alanina, metionina, triptofano e fenilalanina. Provavelmente a hidrofobicidade da superfície não somente ajuda estabilizar a conformação da proteína, mas forma a base das interações específicas relacionadas com a função biológica da proteína (HARRIS & ANGAL, 1995). Os aminoácidos da superfície hidrofóbica são usualmente organizados em blocos, intercalados com domínios mais hidrofílicos. O número, tamanho e distribuição destas regiões não iônicas é uma

característica de cada proteína e pode portanto ser usada como uma base para sua separação (HARRIS & ANGAL, 1995).

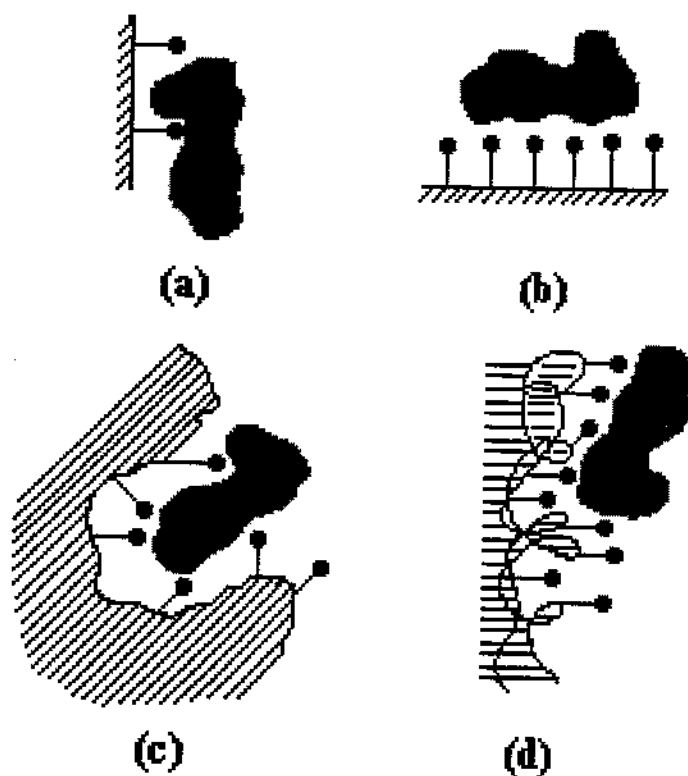


Figura 2.2. Modelos de adsorção de proteínas em matrizes hidrofóbicas (OCHOA, 1978). (a) Modelo sugerido por SHALTIEL (1974); (b) e (c) Adsorção multiponto; (d) Forças hidrofóbicas de intensidade diferente devido às irregularidades da superfície da matriz.

2.2.3.2-Fatores que influenciam na cromatografia de interação hidrofóbica

Os principais fatores a levar em conta quando se faz a escolha de um meio hidrofóbico para um processo de separação, são:

1. Tipo de ligante e grau de substituição, expresso em μmol de ligante/ml de gel hidrofóbico;
2. Tipo e concentração do sal;
3. pH;
4. Temperatura.

Tipo de ligante e grau de substituição

O tipo de ligante imobilizado (alquila ou arila) determina a seletividade da adsorção sobre o adsorvente hidrofóbico (HOFSTEE, 1973; SHALTIEL & ER-EL, 1973; HOFSTEE & OTILLIO, 1978). Geralmente, ligantes com cadeia alquila apresentam um comportamento hidrofóbico “puro” enquanto que ligantes arila apresentam um comportamento “misto” onde as interações hidrofóbicas e aromáticas são possíveis (HOFSTEE & OTILLIO, 1978). Foi também estabelecido que, para um grau constante de substituição, a capacidade do adsorvente HIC para ligar proteína aumenta com o aumento do comprimento da cadeia do hidrocarboneto (HOFSTEE & OTILLIO, 1978; YON, 1978). A escolha entre ligantes alquila ou arila é empírica e deve ser estabelecida através de “screening” para cada problema específico de separação.

A capacidade de ligar proteína do adsorvente HIC aumenta com o aumento do grau de substituição do ligante imobilizado. Para um grau elevado de substituição de ligante, a capacidade aparente do adsorvente permanece constante (é atingido um patamar) mas a força das interações aumenta. Os solutos ligados sob essas circunstâncias são difíceis de serem eluídos devido às múltiplas ligações (JENNISEN & HEELMEYER, 1975; MAISANO *et al.*, 1985).

A retenção de uma proteína é dependente da densidade do ligante e do tamanho da molécula. FAUSNAUGH *et al.* (1984) acharam que proteínas grandes foram mais fortemente retidas por matrizes com elevada densidade de ligante; moléculas pequenas mostraram menor impacto da densidade do ligante na retenção, resultado que é provavelmente devido ao elevado número de regiões hidrofóbicas das moléculas maiores. A densidade do ligante também tem influência na resolução, ainda que não necessariamente de uma maneira preditiva.

Tipo e concentração do sal

A adição de vários tipos de sais (“salting-out”) no tampão de equilíbrio e na amostra em solução promove as interações proteína-ligante na cromatografia de interação hidrofóbica (PORATH *et al.*, 1973; PÅHLMAN *et al.*, 1977; NARHI *et al.*, 1989;

ARAKAWA & NARHI, 1991). Quando a concentração dos sais aumenta, a quantidade de proteína ligada também cresce, quase linearmente, até uma concentração específica do sal, e continua aumentando de maneira exponencial em concentrações mais elevadas.

Um aumento significativo na capacidade de adsorção pode ser notado quando a concentração do sal está acima do ponto de precipitação. Este fenômeno é provavelmente devido à precipitação de proteínas sobre a coluna. Isto tem um efeito negativo na seletividade do adsorvente hidrofóbico.

O efeito dos sais na adsorção hidrofóbica pode ser explicado em referência às series de HOFMEISTER para a precipitação de proteínas ou por sua influência positiva em aumentar a tensão superficial da água.

pH

Em geral, um aumento no pH debilita as interações hidrofóbicas (PORATH *et al.*, 1973; HJERTÉN, 1973), provavelmente como resultado de um aumento na força dos grupos com carga elétrica, ocasionando então um aumento na hidrofiliidade das proteínas. Por outro lado, um decréscimo no pH resulta num aumento aparente das interações hidrofóbicas. Assim, as proteínas que não se ligam ao adsorvente a pH neutro, poderiam se ligar a pH ácido (HALPERIN *et al.*, 1981). HJERTÉN *et al.* (1986), acharam que a retenção de proteínas muda mais drasticamente em valores de pH acima de 8,5 e/ou abaixo de 5, que no intervalo de pH compreendido entre 5 e 8.

Temperatura

Baseado na teoria desenvolvida para a interação de solutos hidrofóbicos em água, HJERTÉN (1976) considerou que a ligação de proteínas em adsorventes hidrofóbicos é favorecida pela entropia [$\Delta G = (\Delta H - T \Delta S) \approx T \Delta S$], o que implica que a interação aumenta com o aumento da temperatura. É interessante notar que as forças de atração de Van der Waals, as quais estão presentes nas interações hidrofóbicas, também aumentam com o aumento da temperatura. Embora, o efeito oposto foi indicado por VISSER & STRATING (1975) que acharam que o papel da temperatura na HIC é de natureza

complexa. Esta aparente discrepância deve-se, provavelmente, aos efeitos da temperatura na conformação estrutural das diferentes proteínas e nas respectivas solubilidades em soluções aquosas.

2.2.3.3-Matrizes

É importante ressaltar a contribuição do material que conforma a matriz. Os dois tipos de suporte mais freqüentemente utilizados são carboidratos fortemente hidrofílicos, por exemplo agarose com ligações cruzadas, com uma cadeia alifática ligada para dar hidrofobicidade, ou materiais copolímeros sintéticos (WHEELWRIGHT, 1991). A seletividade de um suporte copolímero não será exatamente a mesma quando comparado com um suporte baseado na agarose contendo o mesmo tipo de ligante. Para obter o mesmo tipo de resultados utilizando uma matriz de agarose ou um suporte copolímero, é necessário modificar as condições de adsorção e eluição.

Adsorventes hidrofóbicos típicos disponíveis comercialmente incluem compostos com cadeias alifáticas lineares com 4, 6, 8 e 10 átomos de carbono, como também as mesmas cadeias contendo um grupo amino terminal. O potencial de variação da natureza do substituinte é infinita, mas o comportamento de cada um é similar. Os grupos mais utilizados são phenyl-, butyl-, octyl- ou hexyl-, e aminohexyl- dando origem a matrizes (géis) diversas (SHALTIEL, 1984).

2.2.3.4-Condições de operação

A cromatografia de interação hidrofóbica proporciona uma poderosa ferramenta para separação de moléculas, aplicável à purificação de muitas proteínas. O emprego desta técnica é ideal quando a mesma é utilizada imediatamente após a precipitação com sal, onde a força iônica da amostra aumentará as interações hidrofóbicas. No processo de purificação onde a proteína alvo é eluída em um gradiente de força iônica decrescente, ela pode ser seguida por uma troca iônica com pouca necessidade de mudança no tampão.

A chance de se ter uma boa separação em uma coluna hidrofóbica é grande devido a: primeiro, a capacidade para proteínas é muito alta, na mesma faixa que os trocadores

iônicos (10-100 mg/cm³); segundo, a adsorção é realizada em altas concentrações de sal, não sendo necessário trocar o tampão de uma amostra antes de sua aplicação na coluna hidrofóbica, necessitando somente acrescentar sal o suficiente para garantir a ligação do componente requerido. As recuperações são freqüentemente excelentes devido a ação estabilizadora do sal (SCOPES, 1988).

A operação das colunas hidrofóbicas é muito similar à da coluna de troca iônica. A coluna é primeiro equilibrada, a amostra é adsorvida à matriz, o produto é eluído, a coluna é regenerada para remover algumas proteínas remanescentes e preparada para ser reutilizada. A coluna é reequilibrada e pode, então, iniciar-se um novo ciclo de processo (HARRIS & ANGAL, 1995).

As proteínas são eluídas da matriz hidrofóbica por redução da força da ligação hidrofóbica através de mudanças na fase móvel, como diminuição do teor salino (PORATH, 1986), ou por alteração da conformação da proteína. Regulando as variáveis da fase móvel como concentração do sal, tipo do sal e pH, a retenção pode ser afetada. O emprego de detergentes suaves ou baixas concentrações de agentes desnaturantes podem mudar a estrutura da proteína o suficiente para ser liberada da matriz.

Segundo HARRIS & ANGAL (1995), a variedade de condições que podem ser utilizadas para eluição em matrizes hidrofóbicas, confere à HIC grande capacidade para a separação de misturas complexas de proteínas. Dentro destas incluem-se as seguintes:

- a) Redução da força iônica usando um gradiente de eluição;
- b) Aumentando o pH, a maioria das proteínas ganham carga negativa e tornam-se mais hidrofílicas sob condições levemente alcalinas;
- c) Reduzindo a temperatura, teoricamente promoveria a eluição, entretanto o efeito da temperatura é muito pequeno para ser usado como um agente de eluição;
- d) Métodos de deslocamento por adição de um componente o qual tenha uma atração mais forte pelo ligante ou torna a proteína mais hidrofílica:
 - d1. Álcoois alifáticos, como por exemplo propanol, butanol e etileno glicol. Eles reduzem a polaridade da solução e promovem ruptura das interações hidrofóbicas.

- d2. Aminas alifáticas, como por exemplo, butilamina. Têm o efeito de reduzir a polaridade da solução causando dessorção. As aminas podem-se ligar à proteína ou aos grupos da matriz hidrofóbica.
- d3. Detergentes iônicos, como sulfato duodecil de sódio, e não iônicos como Tween 20 ou Triton X-100. Os detergentes iônicos são mais facilmente removidos da coluna após dessorção da proteína, mas podem causar desnaturação da proteína. Os detergentes não iônicos são mais suaves e podem ser usados em concentração de 1 a 3% sem causar perda de atividade.

Como a interação hidrofóbica está baseada num processo de adsorção leve, as frações protéicas obtidas usualmente são ativas biologicamente. Isto contrasta com a cromatografia de fase reversa na qual as proteínas são continuamente eluídas num estado desnaturado (BERGGRUND *et al.*, 1994).

2.2.3.5-Aplicações da HIC na purificação de lipases microbianas

No processo de purificação, a remoção de células do meio é obtida por centrifugação ou filtração; a solução livre de células é então concentrada por ultrafiltração, precipitação ou extração com solventes orgânicos. Depois de serem concentradas e parcialmente isoladas as lipases microbianas extracelulares são purificadas por uma combinação de métodos cromatográficos (TAIPA *et al.*, 1992). Diferentes procedimentos de purificação de lipases microbianas, que incluem cromatografia de interação hidrofóbica, relatados na literatura são descritos a seguir.

Um dos procedimentos de purificação foi elaborado e adaptado à natureza hidrofóbica da lipase de *Pseudomonas sp.* ATCC 21808. A preparação de lipase bruta foi concentrada por ultrafiltração, seguida por cromatografia de troca iônica em Q-Sepharose e cromatografia de interação hidrofóbica em Octyl Sepharose. A eluição da enzima foi feita com 2-propanol com rendimento de 56% e fator de purificação de 159 vezes. O 2-propanol foi então removido da coluna de Q-Sepharose. A eletroforese em SDS-PAGE revelou uma banda simples de proteína com peso molecular de 35 000 Da (KORDEL & SCHMID, 1990).

Lipase produzida por *Pseudomonas fluorescens* foi purificada por precipitação com sulfato de amônio e cromatografia com DEAE-celulose e Octyl Sepharose CL-4B. Esta lipase foi purificada quase 3390 vezes e a recuperação da atividade original foi de 21%. O peso molecular da lipase estimado por eletroforese em SDS-PAGE foi de 45000 Da (SZTAJER *et al.*, 1991).

Depois de ser precipitada com sulfato de amônio e submetida à ultrafiltração e diluição até 1 mg/mL, lipase de *S. aureus* foi incubada com Octyl Sepharose CL-4B (1 grama de gel/10 mg de proteína) durante 20 horas a 4-8 °C, sob agitação suave. O gel lavado e equilibrado foi colocado numa coluna, sendo a lipase eluída com um gradiente linear de Triton X-100. A recuperação de atividade foi de 83% e o fator de purificação de 109 vezes (JÜRGENS & HUSSER, 1981).

TYSKI *et al.* (1983) aplicou um procedimento multi-etapa que envolve precipitação com sulfato de amônio e cromatografia em Phenyl Sepharose CL-4B, seguida por filtração em gel através de Sepharose CL-4B, para purificação de lipase de uma linhagem de *S. aureus*. Uma segunda cromatografia em Sepharose CL-4B da preparação de lipase foi realizada como último passo de purificação.

Uma lipase termoestável de *Bacillus sp.* foi purificada 7762 vezes, com recuperação do 9%, usando método de fracionamento com sulfato de amônio, seguido de tratamento com acrinol e cromatografia seqüencial em colunas de DEAE-Sephadex A-50, Toyopearl HW-55F e butyl Toyopearl 650M. A enzima purificada é uma proteína monomérica com peso molecular de 22000 Da e pI de 5,1 (SUGIHARA *et al.*, 1991b).

Uma metodologia de somente dois passos, para purificação de lipase de *Bacillus pumillus*, utilizando cromatografia de interação hidrofóbica é relatado por MATHIS *et al.* (1988). A solução enzimática bruta foi aplicada em coluna hidrofóbica de Pluronic L-94 (copolímero de polietilenglicol e polipropilenglicol) em Sepharose 6B, eliminando-se os contaminantes com NaCl 3M. A eluição foi efetuada diminuindo a concentração de NaCl na fase móvel até 0,2M. A recuperação de atividade foi de 86% e o fator de purificação de 140 vezes.

Utilizando coluna hidrofóbica de butyl Sepharose equilibrada com tampão tris 50mM (pH 8) contendo 0,1M NaCl, RUA *et al.* (1997) purificaram lipase de *Bacillus thermocatenulatus*. A eluição foi feita com ácido cólico 1%, no mesmo tampão. O fator de purificação obtido foi de 28 vezes e a recuperação de 51%.

A utilização de gel hidrofóbico (1,4-butanodiol diglicidil éter acoplado a Sepharose CL-6B), para purificação de lipase de *Chromobacterium viscosum*, é relatada por QUEIROZ *et al.* (1995). Foi utilizada lipase comercial (3880 U/mg), sendo a recuperação de atividade de 89% e a recuperação de proteína de 79%, com fator de purificação de 1,3 vezes. Em experimentos realizados com gel hidrofóbico PEG 10000-Sepharose CL-6B e a mesma preparação lipolítica comercial, foi recuperado 75% da proteína e 79% da atividade lipolítica com fator de purificação de 1,1 vezes (QUEIROZ *et al.*, 1996).

Vários métodos cromatográficos (cromatografia em Q-Sepharose, filtração em gel Sephacryl 200, cromatografia hidrofóbica em Phenyl Superose e cromatografia em resina Mono-Q) foram utilizados para purificação de lipase de *Lactobacillus plantarum* 2739. A recuperação global foi de 8% e o fator de purificação de 482 vezes. O peso molecular da enzima, determinado através de SDS-PAGE, foi de 65 kDa (GOBETTI *et al.*, 1996).

RUA & BALLESTEROS (1994) relatam a purificação de lipase de *Candida rugosa* em coluna hidrofóbica de Phenyl Sepharose e colunas de Sephadex G-25 e Sephacryl HR-100. A recuperação global foi de 50% e o fator de purificação de 9,6 vezes.

Lipase produzida por *Aspergillus* foi purificada por troca iônica em coluna de CM-52 celulose, troca aniônica em coluna de DEAE-celulose e cromatografia hidrofóbica em Octyl Sepharose, atingindo-se uma recuperação de 25%. A lipase de *Aspergillus* apresentou uma banda simples em gel de poliacrilamida SDS, com peso molecular de 47800 Da (TOMBS & BLAKE, 1982).

Uma solução lipolítica de *Aspergillus niger* foi purificada por precipitação com sulfato de amônio, interação hidrofóbica (butyl Toyopearl 650M), filtração em gel (Sephadex G-75), cromatografia de troca aniônica (DEAE-Sepharose CL-6B) e adsorção

sobre hidroxiapatita. Com este procedimento a lipase foi purificada quase 600 vezes, quando comparada com o caldo bruto, com recuperação de 34%. A preparação enzimática final deu uma banda simples em SDS-PAGE. O peso molecular estimado da enzima foi de 35000 Da e o pI de 4,1 (SUGIHARA *et al.*, 1988).

Duas isoenzimas lipolíticas (I e II) foram isoladas e purificadas a partir de lipase bruta de *Aspergillus niger*, por uma combinação de cromatografia de troca iônica em DEAE-Trisacryl-M, filtração em gel Sephadex G-50 e cromatografia hidrofóbica em Phenyl Sepharose CL-4B (ANTONIAN, 1988).

Com o objetivo de obter cristais de lipase de *Geotrichum candidum* para análise com raios X, uma amostra desta lipase foi purificada até homogeneidade (MENGE *et al.*, 1990). O procedimento de purificação envolve cromatografia de troca iônica em Q-Sepharose e interação hidrofóbica em Phenyl Sepharose. A enzima obtida foi uma glicoproteína com peso molecular de 61600 Da.

A purificação de lipase de *Geotrichum sp.* foi descrita por SUGIHARA *et al.* (1990). Após fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex A-50 e exclusão em Sephadex G-100, a amostra foi injetada em coluna hidrofóbica de butyl Toyopearl 650M, obtendo-se duas frações I e II. A recuperação foi de 81%, com fator de purificação de 1,05 vezes, para a lipase I, enquanto que para a lipase II a recuperação foi de 12%, com fator de purificação de 1,02 vezes. A massa molar, estimada por SDS-PAGE, e o ponto isoelétrico da lipase I foram 64 kDa e 4,3 respectivamente; para a lipase II a massa molar foi de 66 kDa e o pI de 4,3.

Lipase comercial de *Geotrichum candidum* GC-20, dissolvida em sulfato de amônio 1M pH 6,8, foi purificada em coluna de Octyl Sepharose. A recuperação de atividade foi de 112% e o fator de purificação de 9 vezes. A enzima purificada resultou ser uma glicoproteína composta de cinco isoenzimas que variam em massa molar, estimada por SDS-PAGE, (64, 62 e 59 kDa) e ponto isoelétrico (4,40, 4,47, 4,58, 4,67 e 4,72) (BAILLARGEON, 1990).

O emprego da resina hidrofóbica Octyl Sepharose para purificação parcial de

lipase de *G. candidum* NRRL Y-553, é relatado por BAILLARGEON & McCARTHY (1991). Após incubação do caldo bruto com Octyl Sepharose, durante 30 minutos sob agitação suave, o gel foi lavado e empacotado em coluna. A eluição foi realizada com gradiente linear de Emulphogene BC-720 em água. A recuperação de atividade atingiu 96%, enquanto que o fator de purificação foi de 14 vezes. Através da determinação do pI foram identificadas cinco isoenzimas (pI 4,88, 4,78, 4,65, 4,57 e 4,52). Os pesos moleculares estimados por SDS-PAGE oscilam entre 64 kDa e 57 kDa.

Duas etapas cromatográficas sucessivas (cromatografia de troca iônica em Q-Sepharose FF e cromatografia hidrofóbica em Phenyl Sepharose CL-4B), foram utilizadas por HEDRICH *et al.* (1991) para purificação de lipase comercial de *G. candidum*. A recuperação global de atividade foi de 42%, com fator de purificação de 13,2 vezes. O peso molecular estimado mediante SDS-PAGE foi de 61,6 kDa, enquanto que a determinação do ponto isoelétrico indicou a presença de cinco diferentes frações (pI 4,46, 4,50, 4,55, 4,66 e 4,76).

As lipases produzidas por uma linhagem de *G. candidum* ATCC 34614 foram recuperadas do caldo bruto filtrado, misturado com NaCl na concentração 2M, após incubação com Phenyl Sepharose durante 16 horas a 4 °C. Depois da lavagem da resina com tampão contendo 2M NaCl e posterior empacotamento em coluna, as lipases foram eluídas com etilenoglicol em água a 60%. A recuperação de atividade foi de 76%. Os pesos moleculares das duas frações obtidas foram 50,1 kDa e 55,5 kDa, com pI de 4,61 e 4,47, respectivamente (SIDEBOTTOM *et al.*, 1991).

Após os passos iniciais de purificação (fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephadex, filtração em gel Sephadex G100), solução enzimática contendo lipase de *G. candidum*, foi injetada em coluna de butyl Toyopearl 650S. Depois de uma segunda cromatografia em coluna Bakerbond propyl-HI, a lipase foi eluída com gradiente decrescente de sal. Foram obtidas quatro frações com atividade lipolítica, sendo a recuperação de atividade de 78%, 6,6%, 7% e 1%, com fatores de purificação de 1, 1, 3 e 1,7 vezes, respectivamente. Os pesos moleculares das diferentes frações, obtidos por SDS-PAGE, foram 66 kDa (I), 66 kDa (II), 64 kDa (III) e 56 kDa (IV), (SUGIHARA *et al.*, 1993).

Lipase produzida por uma linhagem de *Geotrichum sp.* FO 401B, pré-purificada por precipitação com acetona, cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Toyopearl 650M e concentrada por ultrafiltração, foi injetada em coluna hidrofóbica butyl Toyopearl 650M. Foram obtidas três frações com atividade lipolítica (A, B e C) sendo a recuperação de atividade de 10,3%, 6,4% e 32,2%, respectivamente e os fatores de purificação de 57,9 e 79,4 para as frações A e C. As massas molares das frações A e C, estimadas por SDS-PAGE, foram 62 kDa e 58 kDa, respectivamente (ASAHARA *et al.*, 1993).

Um método de purificação de lipase, similar ao descrito por ASAHARA *et al.* (1993), foi aplicado para purificação de lipase de *Geotrichum sp.* FO 274A. Foram determinadas três frações (A, B e C) com atividade lipolítica. A recuperação de atividade foi de 7,1%, 18,3% e 51,3%, enquanto que o fator de purificação foi de 19, 39 e 74 vezes para as frações A, B e C, respectivamente (IKEMOTO & OTA, 1996).

Duas maneiras de purificação parcial de lipase extracelular produzida por uma linhagem selecionada de *Mucor miehei*, foram relatadas por HUGE-JENSEN *et al.*, (1987). Lipase A foi purificada 15 vezes, comparada com a lipase bruta em pó, com 57% de recuperação, por cromatografia em DEAE-celulose e cromatografia de afinidade em coluna de Con A-Sepharose. A lipase B foi purificada da lipase bruta em pó, por cromatografia em DEAE-Sepharose e cromatografia hidrofóbica em Phenyl Sepharose, com um fator de purificação de 8 vezes e recuperação de atividade de 32%.

Lipase de uma linhagem de *Penicillium citrinum* foi purificada por precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de filtração em gel utilizando coluna de Superose 6 e cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) em coluna de Phenyl Superose. A recuperação e o fator de purificação foram de 15,2% e 379 vezes, respectivamente. A lipase de *P. citrinum* forma um dímero de 63000 Da, determinado através de SDS-PAGE; o análise do dímero apresenta duas subunidades com pesos moleculares (31000 e 33000 Da) e pontos isoelétricos similares (4,8 e 5,0) (KRIEGER *et al.*, 1999).

Uma lipase extracelular de *Penicillium simplicissimum*, previamente concentrada por filtração e precipitação com sulfato de amônio, foi purificada por cromatografia de interação hidrofóbica em coluna de Phenyl Sepharose. Foram obtidas recuperação de

25,7% e purificação de 3000 vezes. A enzima apresentou peso molecular de 56000 Da, determinado por SDS-PAGE (SZTAJER *et al.*, 1991).

Cromatografia em coluna hidrofóbica de Phenyl Sepharose CL-4B, após precipitação com sulfato de amônio, foi utilizada para purificar lipase de *Penicillium expansum* DSM 1994. A recuperação foi de 5% com fator de purificação de 219 vezes (STÖCKLEIN *et al.*, 1993).

Depois de ser precipitada com sulfato de amônio, centrifugada e redissolvida em tampão fosfato de sódio, lipase de *Rhizomucor miehei* foi purificada utilizando colunas cromatográficas de Phenyl Sepharose 6 FF e DEAE-Sepharose. A purificação final foi de 42 vezes, com 32% de recuperação (YAN WU *et al.*, 1996).

Através de cromatografia em hidroxiapatita, Octyl Sepharose e Sephacryl S-200, lipase de *Rhizopus japonicus* NR400 foi purificada até homogeneidade. Uma purificação final de 93 vezes foi obtida, com recuperação de 31%. A lipase purificada apresentou uma banda simples em SDS-PAGE, com peso molecular de 30000 Da (SUZUKI *et al.*, 1986).

Uma preparação bruta de lipase de *Ustilago maydis* ATCC 14826 foi injetada em coluna de troca iônica S-Sepharose, obtendo-se duas frações (I e II) com atividade lipolítica. A lipase I foi aplicada em coluna de butyl Sepharose, com recuperação global de 12%. A lipase II foi purificada com recuperação de 13,5%, em colunas de DEAE-Sepharose e butyl Sepharose (LANG *et al.*, 1991).

2.3-Processo CARE (Continuous Adsorption Recycle Extraction)

PUNGOR *et al.* (1987) propuseram um processo de extração contínua com reciclo utilizando o princípio de cromatografia por afinidade, onde a purificação é conduzida em dois reatores agitados, interligados em série, e não em um leito fixo de partículas adsorventes. Este processo, conhecido como CARE - "Continuous Adsorption Recycle Extraction", foi proposto com a finalidade de superar algumas limitações operacionais relativas à cromatografia por afinidade em leito fixo, tais como: alto custo, dificuldade de operação em grande escala, dificuldade na ampliação de escala e operação contínua, além de limitações difusionais.

O processo CARE, esquematicamente representado na Figura 2.3, consiste de dois reatores, um de adsorção e outro de dessorção, com reciclo do suporte. O reator de adsorção é alimentado a partir do fermentador contendo a enzima a ser purificada e seus contaminantes. Neste estágio, a enzima é ligada ao suporte enquanto que os contaminantes são eliminados utilizando tampão de lavagem. O suporte junto com a enzima são bombeados ao segundo estágio, onde ocorre a dessorção com tampão de eluição. A seguir, o suporte é reciclado ao estágio de adsorção. Os dois reatores são perfeitamente agitados e o adsorvente permanece nos reatores devido a presença de um filtro macroporoso. O produto é removido continuamente através do filtro retentor. (PUNGOR *et al.*, 1987; GORDON & COONEY, 1988; GORDON & COONEY, 1989; AFEYAN *et al.*, 1989; GORDON *et al.*, 1990a).

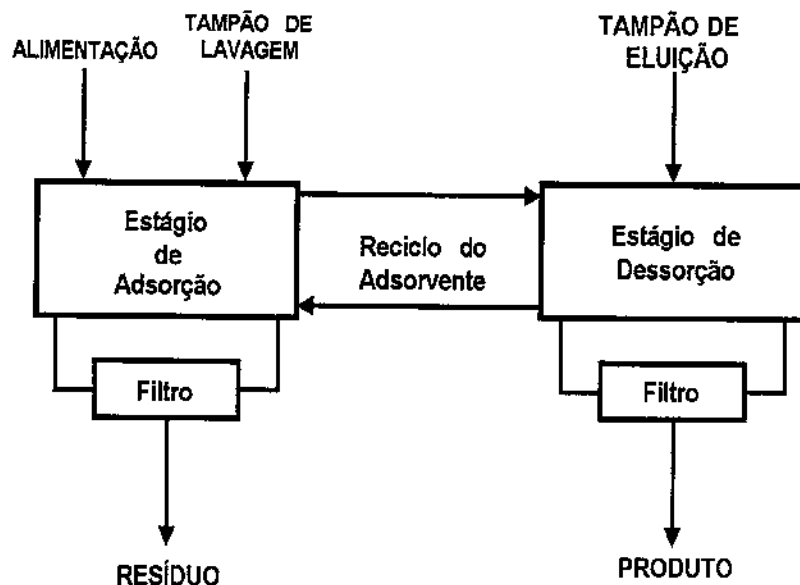


FIGURA 2.3 Esquema do processo CARE duplo estágio

Este processo foi inicialmente aplicado por PUNGOR *et al.* (1987) utilizando adsorção por afinidade, na recuperação e purificação de β -galactosidase (proteína intracelular) produzida por *Escherichia coli*, usando como ligante p-aminobenzil-1-thio- β -D-galactopiranosido-agarose (PABTG, gel de agarose).

A versatilidade do processo CARE é demonstrada no trabalho experimental de

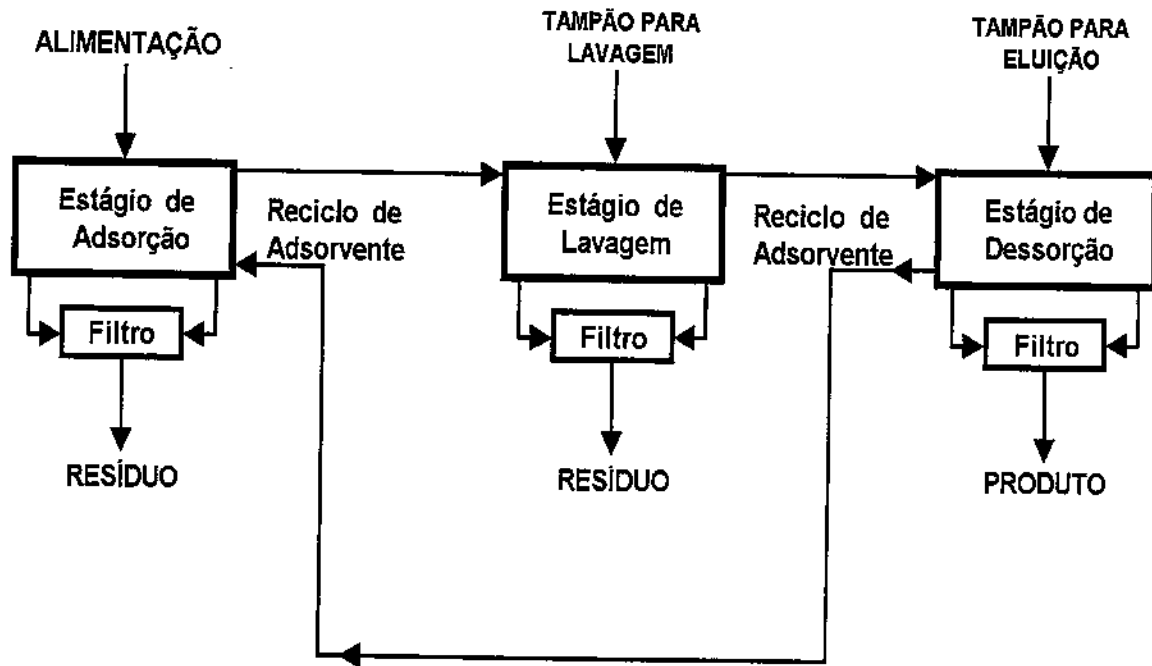
GORDON & COONEY (1990) pela extensão do conceito de um sistema de processo contínuo de adsorção por afinidade para adsorção por troca iônica, aplicado também para a purificação de β -galactosidase. Diferindo da purificação por afinidade, mais de uma proteína é adsorvida na fase sólida, necessitando então do uso de mais de um estágio de dessorção.

O processo CARE, duplo estágio, foi simulado e otimizado por RODRIGUES (1993), utilizando dados cinéticos de adsorção e dessorção da lisozima obtidos por CHASE (1984a), obtendo um fator de purificação de 22 vezes e rendimento de 85%.

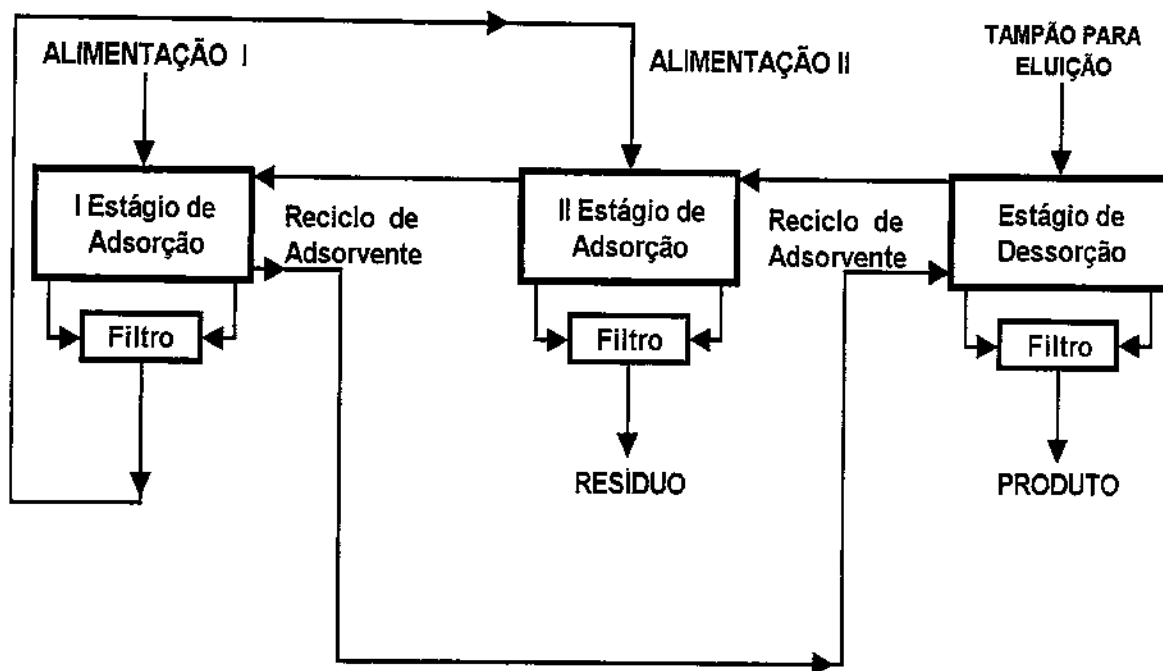
Este mesmo processo foi estudado para purificação de cefalosporina C, sendo avaliado através de simulação e otimizado, com base no comportamento cinético de adsorção e dessorção da cefalosporina C em resina Amberlite XAD-2. O processo apresentou recuperação em torno de 80%, fator de purificação de 10 vezes e fator de concentração de 1,6 vezes (BARBOZA, 1998).

Uma modificação do processo CARE duplo estágio, foi proposta para a produção de dextrana. A simulação do processo foi feita baseada na adsorção e dessorção da enzima dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL-B512F, responsável pela síntese do polímero, em resina DEAE-celulose. Através da otimização por análise de superfície de resposta foram obtidos rendimentos na faixa de 80-90% (CURRALERO *et al.*, 1998).

GORDON *et al.* (1990b) apresentaram duas configurações alternativas para o processo CARE. O projeto básico com dois estágios de contato foi modificado pela adição de um estágio de lavagem intermediário, bem como pela combinação de dois estágios de adsorção, operando em contracorrente seguido por um estágio de dessorção, conforme ilustrado nas Figuras 2.4 (a) e 2.4 (b), respectivamente. Os resultados experimentais mostraram que a introdução de um estágio de lavagem resulta no aumento de purificação, enquanto a adição de um segundo estágio de adsorção resulta num maior rendimento do processo, quando comparados com o processo básico (2 estágios). A configuração alternativa do processo CARE com três estágios foi simulada e otimizada por MARTINS *et al.* (1995), utilizando dados para adsorção de lisozima obtidos por CHASE (1984a); o fator de purificação deste sistema está entre 500 e 800, enquanto que o rendimento esteve na faixa de 75 a 79%.



(a)



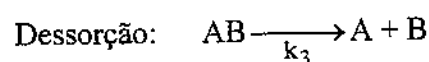
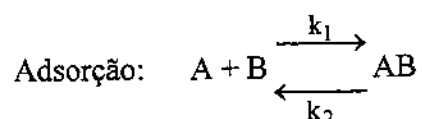
(b)

Figura 2.4-Esquemas do processo CARE modificado (Gordon *et al.*, 1990b)
a) Com estágio de lavagem intermediário b) Com dois estágios de adsorção

2.4-Processo de adsorção e dessorção de proteínas em suportes hidrofóbicos

A literatura apresenta vários modelos matemáticos descrevendo a adsorção de solutos em suportes sólidos. Segundo AFEYAN *et al.* (1989) uma descrição matemática deve combinar equações para as etapas de transferência de massa, ou seja, difusão do soluto através de uma película estagnada em volta das partículas do adsorvente e difusão dentro dos poros do suporte sólido, bem como a etapa de adsorção bioquímica.

CHASE (1984b) descreve o processo de adsorção e dessorção como uma reação reversível de 2ª ordem e irreversível de 1ª ordem, respectivamente:



onde A, B e AB são a proteína a ser adsorvida, adsorvente e proteína adsorvida, respectivamente. Em relação ao estágio de dessorção, resultados de AFEYAN *et al.* (1989) indicam que a dessorção da proteína é muito mais rápida que o processo de adsorção e pode ser descrita como instantânea.

Processos de adsorção de proteínas por afinidade são normalmente descritos por isotermas de Langmuir (BELTER *et al.*, 1988), como também os processos de adsorção por troca iônica envolvendo a adsorção de apenas uma proteína e a adsorção em resinas de interação hidrofóbica. No caso de troca iônica, onde normalmente mais de uma proteína adsorve na superfície do adsorvente, além de existir uma competitividade entre as proteínas para a adsorção, deve-se considerar alguns fatores como peso molecular das proteínas e interações inter-proteínas, aumentando assim a complexidade do modelo da isoterma de

adsorção (SKIDMORE & CHASE, 1990).

Recentemente BASTIDA *et al.* (1998) relataram a purificação, imobilização e hiperativação, em somente um passo, de diferentes lipases microbianas comerciais, utilizando como suporte Octyl Sepharose CL-4B. A adsorção foi maior em ausência de sulfato de amônio quando comparada com tampão fosfato 10 mM, comportamento inverso ao indicado para adsorção hidrofóbica “convencional”. A hiperativação pode se dever às mudanças na estrutura da enzima, que pode reconhecer grupos hidrofóbicos da interface sólida. SABUQUILLO *et al.* (1998) descreveram comportamento similar durante a adsorção seletiva de lipases comerciais de *Rhizopus niveus* e *Candida rugosa* em adsorventes hidrofóbicos (butyl-, phenyl- e octyl-agarose). FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.* (1998) conseguiram imobilizar diferentes lipases microbianas comerciais por adsorção seletiva em baixas forças iônicas, sobre suportes hidrofóbicos; as lipases assim adsorvidas apresentaram hiperativação após a adsorção.

As interações hidrofóbicas desempenham o maior papel na adsorção de lipases sobre membranas hidrofóbicas devido possuírem elevada hidrofobicidade, pouco usual entre as enzimas (BALCÃO *et al.*, 1996). A desidratação das regiões hidrofóbicas tanto nas proteínas como nos adsorventes pode contribuir para incrementar significativamente a força de adsorção (GELUK *et al.*, 1992).

A adsorção de lipase de *Staphylococcus hyicus* sobre Fractogel TSK butyl-650 foi descrita por WENZIG *et al.* (1993). Esta resina foi escolhida porque a lipase apresenta afinidade natural por materiais hidrofóbicos devido ao seu sítio ativo catalítico no qual as substâncias hidrofóbicas são os substratos preferidos.

BALCÃO *et al.* (1996) realizaram com sucesso experiências de adsorção de dez preparações de lipases comerciais sobre fibras ocas hidrofóbicas de polipropileno, a pH 7,0 e 40 °C, a baixas forças iônicas.

Para descrever os dados de equilíbrio de adsorção entre proteínas e géis cromatográficos, a equação de Langmuir tem sido utilizada em diversas pesquisas, com

bom índice de acerto. Para adsorção em géis de troca iônica podemos mencionar os trabalhos de GELUK *et al.* (1992), LEWUS *et al.* (1998) e WEAVER & CARTA (1996); para géis de afinidade pode-se indicar os trabalhos desenvolvidos por CHASE (1984a), CHASE (1984b), HORSTMANN & CHASE (1989), NORIEGA *et al.* (1997), KAMIMURA *et al.* (1999), e para géis hidrofóbicos as pesquisas feitas por KERZEL & MERSMANN (1992), KERZEL *et al.* (1992), MALCATA *et al.* (1992), MARTINELLE *et al.* (1995), GITLESEN *et al.* (1997), MENDIETA *et al.* (1998b).

MALCATA *et al.* (1992) relataram a adsorção física de lipase comercial de *Aspergillus niger* sobre fibras ocas de polipropileno microporoso, em seis diferentes temperaturas. A lipase foi seletivamente adsorvida quando comparada com outras proteínas da preparação bruta. A isoterma de Langmuir descreveu com bom grau de ajuste os valores de equilíbrio.

Um estudo da adsorção de lipase de *Staphylococcus carnosus* foi realizado por KERZEL & MERSMANN (1990), utilizando diversos adsorventes (troca iônica, afinidade e hidrofobicidade). Os melhores resultados de adsorção e dessorção foram obtidos com gel hidrofóbico TSK butyl-650, com diferentes concentrações de sulfato de amônio. KERZEL *et al.* (1992) continuaram estas pesquisas com lipase de *S. carnosus* e gel hidrofóbico. Os dados de equilíbrio obtidos foram bem representados pela equação de Langmuir.

A adsorção de diversas lipases comerciais sobre polipropileno em pó, EP-100, foi relatada por GITLESEN *et al.* (1997). Foi atingido um nível de saturação de 220 mg por grama de suporte. Os dados de equilíbrio, tanto da proteína como da atividade lipolítica, foram bem ajustados pela isoterma de Langmuir. A adsorção não foi significativamente influenciada pelas mudanças no pH do tampão de adsorção, o que indica que as interações hidrofóbicas são as forças mais importantes nesta adsorção.

O fenômeno de ativação interfacial em lipases de *Candida antarctica* e *Humicola lanuginosa* foi estudado por MARTINELLE *et al.* (1995), através da adsorção em cubetas hidrofóbicas de poliestireno. Os dados experimentais da adsorção foram ajustados adequadamente pela isoterma de Langmuir. A adsorção destas lipases, em superfícies hidrofóbicas de sílica, foi relatada por WANNERBERGER & ARNEBRANT (1997).

O comportamento na adsorção de leitos empacotados pode-se caracterizar através da curva de ruptura (“breakthrough”), que indica a quantidade de proteína que pode ligar-se. Para obter a curva de ruptura, a solução contendo o produto desejado é bombeada através da coluna cromatográfica até que a solução na saída apresente uma atividade mensurável da enzima. A relação C/C_0 (concentrações de saída e alimentação) atinge no máximo o valor da unidade.

Na Figura 2.5 são apresentadas curvas de ruptura, que seriam obtidas para uma mesma coluna empacotada, dependendo das condições de operação. Como regra, a área à esquerda da curva é uma medida da capacidade de carregamento do leito, enquanto que a área à direita corresponde à concentração de enzima não ligada. Assim, uma linha vertical representará o caso ideal, carregamento máximo sem perda de produto. Na prática, para operar perto da idealidade deve-se reduzir a velocidade superficial, mas isto pode consumir muito tempo. Assim, levando-se em conta a economia do processo, é necessário adotar uma solução de compromisso (WENZIG *et al.*, 1993).

Entre os fatores que influenciam o formato e a posição da curva de ruptura têm sido considerados a vazão através do leito, a concentração do adsorbato na alimentação, o valor da constante de dissociação k_d que descreve a reação de adsorção, a taxa constante das reações de adsorção/dessorção, e a desigual distribuição da vazão através da área transversal do leito (CHASE, 1988).

Na literatura aparecem muitos trabalhos relatando curvas de ruptura para soluções contendo enzimas ou proteínas e resinas de troca iônica (WEAVER & CARTA, 1996; LEWUS *et al.*, 1998), resinas hidrofóbicas (KUBOTA *et al.*, 1997) ou de afinidade (CHASE, 1984b; ARVE & LIAPIS, 1988; NORIEGA *et al.*, 1997).

A simulação das curvas de “breakthrough” para diferentes sistemas tem sido feita utilizando a solução analítica dada por THOMAS (1944) para as equações de taxa de adsorção, balanço de massa para a fase móvel e balanço de massa para a fase estacionária (CHASE, 1984a; CHASE, 1984b; NORIEGA *et al.*, 1997); solução numérica em diferenças finitas (KAMIMURA, 1995; WEAVER *et al.*, 1996) ou solução numérica com colocação ortogonal (ARVE & LIAPIS, 1988).

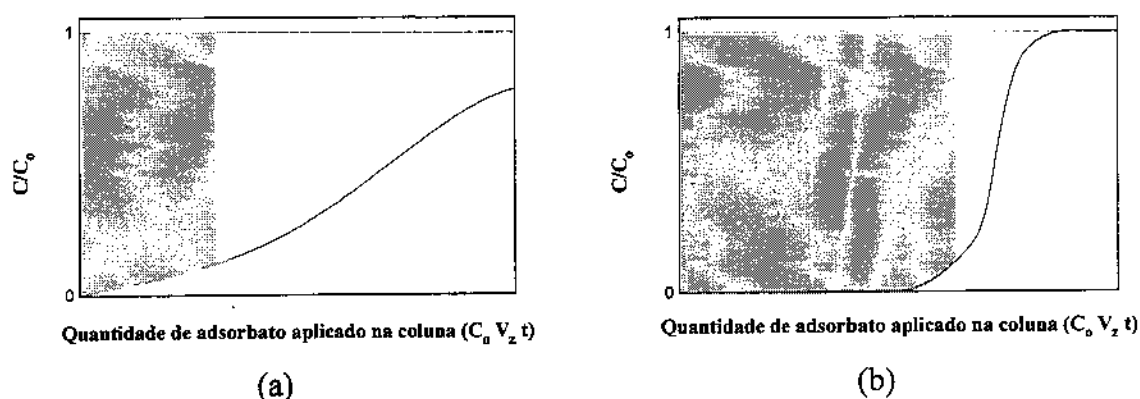


Fig. 2.5 A influência do formato da curva de ruptura no desempenho de leitos fixos. (a) tipo de curva obtida em coluna empacotada, (b) curva mais inclinada, na vertical, obtida na mesma coluna com alterações das condições de operação. A capacidade total dos leitos é a mesma em ambos os casos. As áreas sombreadas indicam a quantidade de adsorbato que teria sido adsorvido na coluna se o carregamento terminasse quando $C/C_0 = 0,1$. (CHASE, 1984b)

2.5-Otimização por análise de superfície de resposta

A Análise de Superfície de Resposta tem como base o método de planejamento fatorial e consiste num grupo de técnicas usadas para o estudo das relações entre uma ou mais respostas medidas analiticamente e um número de variáveis de entrada que possam ser controladas. Estas técnicas são usadas para elucidar as seguintes questões (BOX *et al.*, 1978):

- como uma resposta é afetada sobre uma região de interesse por um dado conjunto de variáveis de entrada,
- quais conjuntos de variáveis de entrada resultarão num produto dentro das especificações desejadas,
- quais os valores das variáveis de entrada que levarão ao melhor valor para uma resposta específica e como é a superfície de resposta próxima a este ponto.

Em processos multivariáveis, como os bioquímicos, onde a importância de cada variável deve ser determinada, a otimização é uma ferramenta de trabalho necessária para melhor compreensão do sistema, verificando-se individualmente o efeito de cada variável operacional no rendimento e produtividade.

Para aplicar o método de Análise de Superfície de Resposta é necessário inicialmente programar ensaios através de um planejamento fatorial. Este 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 possíveis combinações. Como primeira etapa é usual um planejamento experimental com 2 níveis, nível (-1) e nível (+1), para cada variável. Assim, para “n” variáveis envolvidas no estudo, o número de experimentos que deve ser realizado para investigar todas as combinações possíveis é igual a 2^n .

Com os resultados obtidos do planejamento é possível calcular os efeitos principais e de interação das variáveis sobre as respostas, determinar quais são os efeitos mais significativos e ajustar empiricamente um modelo linear ou de 1ª. ordem, correlacionando-se as variáveis e as respostas:

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i$$

Se o modelo de 1ª. ordem não apresentar uma boa correlação com os dados experimentais é possível complementar o planejamento fatorial inicial realizando-se mais $2n$ ensaios segundo configuração “estrela” (KHURI & CORNELL, 1987) para obter um modelo quadrático ou de 2ª. ordem:

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{i=1}^k b_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k b_{ij} x_i x_j$$

Nos modelos de 1ª e 2ª ordem b_0 , b_i , b_{ii} , b_{ij} são coeficientes constantes.

Uma superfície de resposta ajustada com um modelo de 2ª ordem é apresentada na Figura 2.6.

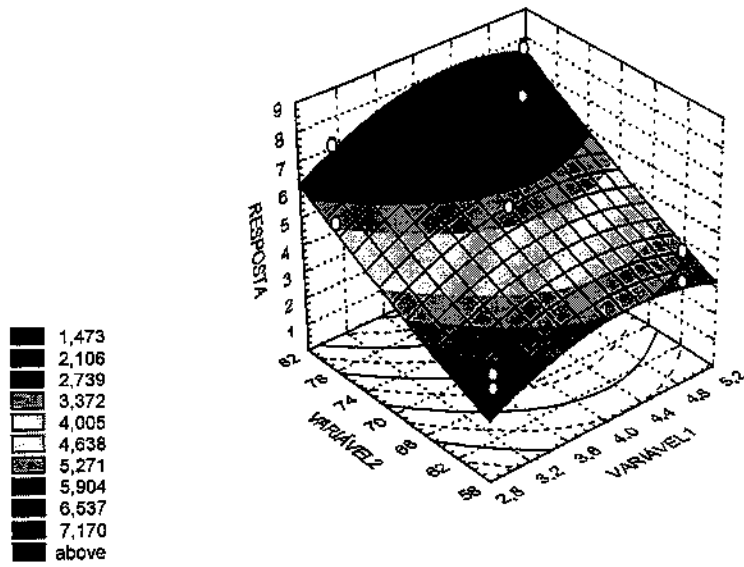
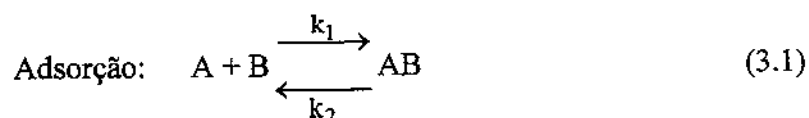


FIGURA 2.6. Superfície de resposta para modelo de 2^a ordem

III. MODELAGEM MATEMÁTICA

3.1-Modelagem da cinética de adsorção de lipase em resina de interação hidrofóbica

A adsorção de lipases em resinas hidrofóbicas, em função do teor de sal utilizado, pode ser representada pela equação (3.1):



onde A, B e AB são a enzima a ser adsorvida, adsorvente e enzima adsorvida, respectivamente. As constantes cinéticas (k_1 , k_2) representam não somente as constantes cinéticas de adsorção intrínsecas, como também incluem a contribuição a resistência externa à transferência de massa. Assim, estes efeitos estão agregados num único coeficiente que pode ser determinado experimentalmente em laboratório. Esta aproximação apesar de uma descrição física menos rigorosa torna a formulação matemática mais tratável. Deve-se levar em conta que no caso da cromatografia de interação hidrofóbica, a concentrações elevadas de sal o valor de k_1 aumenta enquanto que o valor de k_2 diminui, favorecendo a adsorção; para teores baixos de sal o comportamento é inverso, aumenta k_2 e diminui k_1 , sendo favorecida a dessorção.

As limitações de transferência de massa interna podem ser negligenciados sem perda de precisão (PUNGOR *et al.*, 1987), já que proteínas de alto peso molecular, como as lipases, são na maior parte adsorvidas nos sítios hidrofóbicos localizados na superfície do gel, dificultando sua difusão dentro deste.

A velocidade de reação da enzima adsorvida (r_q), para a reação de adsorção anteriormente apresentada, é dada pela equação 3.2.

$$r_q = \frac{dQ}{dt} = k_1 C(Q_m - Q) - k_2 Q \quad (3.2)$$

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

Em equilíbrio a interação é descrita por:

$$\frac{dQ}{dt} = k_1 C^* (Q_m - Q^*) - k_2 Q^* = 0 \quad (3.3)$$

No equilíbrio, então, a equação da velocidade de reação corresponde a isoterma de Langmuir, conforme equação 3.4.

$$Q^* = \frac{Q_m C^*}{k_d + C^*} \quad (3.4)$$

3.2-Modelagem matemática coluna cromatográfica

Um processo isotérmico de adsorção de lipase em Butyl Sepharose em uma coluna (Figura 3.1) foi descrito matematicamente em termos das equações diferenciais obtidas do balanço de massa e da cinética do processo. Foi utilizado o método numérico de Crank-Nicholson acoplado a uma rotina de Runge-Kutta de quarta ordem para resolver as equações diferenciais, como indicado por KAMIMURA (1995) e KAMIMURA & MAUGERI (1995). O objetivo foi verificar se este modelo descreve bem os dados experimentais obtidos (curvas de ruptura).

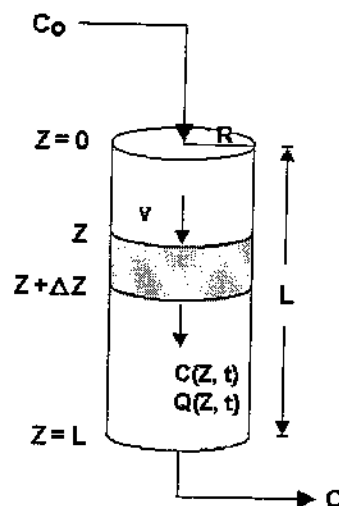


FIGURA 3.1-Esquema de uma coluna cromatográfica

C_0 – concentração de lipase na alimentação	[U lipase/m ³ solução]
C - concentração de lipase em solução	[U lipase/m ³ solução]
L - comprimento do leito da coluna	[m]
Q - concentração de lipase adsorvida na resina	[U/m ³ de resina]
R - raio da coluna tubular	[m]
v - velocidade de escoamento da solução de lipase	[m/h]
Z - distância	[m]
t - tempo	[h]

Definindo um volume diferencial de controle (VDC) na coluna, desde Z até ΔZ , e a seguinte nomenclatura adicional:

A – área da secção transversal da coluna	[m ²]
E – coeficiente de dispersão axial da enzima em solução	[m ² /h]
R_s - taxa de adsorção de lipase pela resina	[U/m ³ resina h]
ε - Porosidade do leito de resina	[m ³ sol./m ³ leito]

Os termos de balanço de massa são:

Lipase em solução que entra no (VDC) por convecção	$v C A \varepsilon \Big _Z$
--	-----------------------------

Lipase em solução que entra no (VDC) por difusão	$- E \left(\frac{\partial C}{\partial z} \right) A \varepsilon \Big _Z$
--	--

Lipase em solução que sai do (VDC) por convecção	$v C A \varepsilon \Big _{Z+\Delta Z}$
--	--

Lipase em solução que sai do (VDC) por difusão	$- E \left(\frac{\partial C}{\partial z} \right) A \varepsilon \Big _{Z+\Delta Z}$
--	---

Lipase adsorvida na resina no (VDC)	$R_s \pi R^2 \Delta Z (1 - \varepsilon)$
-------------------------------------	--

Acúmulo de lipase em solução no (VDC)	$\frac{\partial C}{\partial t} \pi R^2 \Delta Z \varepsilon$
---------------------------------------	--

A equação de balanço de massa torna-se portanto:

$$\left[v C A \varepsilon \Big|_Z + \left(-E \frac{\partial C}{\partial z} \right) A \varepsilon \Big|_Z \right] - \left[v C A \varepsilon \Big|_{Z+\Delta Z} + \left(-E \frac{\partial C}{\partial z} \right) A \varepsilon \Big|_{Z+\Delta Z} \right] -$$

$$R_s \pi R^2 \Delta Z (1-\varepsilon) = \frac{\partial C}{\partial t} \pi R^2 \Delta Z \varepsilon \quad (3.5)$$

onde: $A = \pi R^2$

Dividindo-se pela área A e por ΔZ tem-se:

$$\frac{v C \varepsilon \Big|_Z - v C \varepsilon \Big|_{Z+\Delta Z}}{\Delta Z} + \frac{-E \varepsilon \frac{\partial C}{\partial z} \Big|_Z + E \varepsilon \frac{\partial C}{\partial z} \Big|_{Z+\Delta Z}}{\Delta Z} - (1-\varepsilon) R_s = \varepsilon \frac{\partial C}{\partial t} \quad (3.6)$$

Tomando o limite com $\Delta Z \rightarrow 0$ e considerando que o coeficiente de dispersão axial (E) e a porosidade do leito (ε) são constantes ao longo da coluna tem-se:

$$-v \varepsilon \frac{\partial C}{\partial z} + E \varepsilon \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} - (1-\varepsilon) R_s = \varepsilon \frac{\partial C}{\partial t} \quad (3.7)$$

Rearranjando tem-se:

$$\varepsilon \frac{\partial C}{\partial t} \Big|_{Ac} = -v \varepsilon \frac{\partial C}{\partial z} + E \varepsilon \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} - (1-\varepsilon) R_s \quad (3.8)$$

Considerando que: $R_s = \frac{\partial Q}{\partial t}$, a equação de balanço de massa na coluna de adsorção pode ser escrita da maneira seguinte:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -v \frac{\partial C}{\partial z} + E \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} - \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \frac{\partial Q}{\partial t} \quad (3.9)$$

A expressão cinética para adsorção da lipase em resina pode ser escrita como:

$$\frac{\partial Q}{\partial t} = [k_1 C (Q_m - Q) - k_2 Q] = -\frac{\partial C}{\partial t} \frac{\varepsilon}{(1 - \varepsilon)} \quad (3.10)$$

onde:

k_1, k_2, Q_m : constantes cinéticas do modelo de adsorção

Como o sistema de equações consiste de uma equação diferencial parcial e uma equação diferencial ordinária, é possível aplicar simultaneamente o método de Crank-Nicholson e Runge-Kutta de quarta ordem para equação diferencial parcial e equação diferencial ordinária respectivamente.

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -v \frac{\partial C}{\partial z} + \frac{(1 - \varepsilon)}{\varepsilon} \frac{\partial C_s}{\partial t} + E \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \quad (3.11)$$

Com as seguintes condições inicial e de contorno:

Condição inicial:

$$t = 0 \Rightarrow C = 0$$

Condição de contorno na entrada da coluna:

$$Z = 0 \Rightarrow \frac{v}{\varepsilon} C - E \frac{\partial C}{\partial z} = 0$$

Condição de contorno na saída da coluna:

$$Z = L \Rightarrow \frac{\partial C}{\partial z} = 0 \quad \begin{cases} C_{i+1,j} = C_{i,j} \\ C_{i+1,j+1} = C_{i,j+1} \end{cases}$$

Com as seguintes condições inicial e de contorno para $C(z,t)$ e $Q(z,t)$:

$$\begin{array}{lll} C_{0,0} = C_0 & Q_{0,0} = 0 & C_{0,j} = C_0 \quad \forall j \\ C_{i,0} = 0 \text{ para } i > 1 & Q_{i,0} = 0 \text{ para } i > 1 & Q_{0,j} = 0 \quad \forall j \end{array}$$

As derivadas da concentração de lipase em solução, segundo Crank-Nicholson são:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{C_{i,j+1} - C_{i,j}}{\Delta t} \quad (3.12)$$

$$\frac{\partial C}{\partial z} = \frac{1}{2} \left\{ \frac{C_{i+1,j+1} - C_{i-1,j+1}}{2 \Delta Z} + \frac{C_{i+1,j} - C_{i-1,j}}{2 \Delta Z} \right\} \quad (3.13)$$

$$\frac{\partial^2 C}{\partial z^2} = \frac{1}{2} \left\{ \frac{C_{i+1,j} - 2C_{i,j} + C_{i-1,j}}{(\Delta Z)^2} + \frac{C_{i+1,j+1} - 2C_{i,j+1} + C_{i-1,j+1}}{(\Delta Z)^2} \right\} \quad (3.14)$$

Substituindo-se as equações (3.12), (3.13) e (3.14) na equação (3.11) tem-se:

$$\begin{aligned} \frac{C_{i,j+1} - C_{i,j}}{\Delta t} = & -v \frac{1}{2} \left\{ \frac{C_{i+1,j+1} - C_{i-1,j+1}}{2 \Delta Z} + \frac{C_{i+1,j} - C_{i-1,j}}{2 \Delta Z} \right\} + \\ & E \frac{1}{2} \left\{ \frac{C_{i+1,j} - 2C_{i,j} + C_{i-1,j}}{(\Delta Z)^2} + \frac{C_{i+1,j+1} - 2C_{i,j+1} + C_{i-1,j+1}}{(\Delta Z)^2} \right\} - \\ & \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} [k_1 C_{i,j} (Q_m - Q_{i,j}) - k_2 Q_{i,j}] \end{aligned} \quad (3.15)$$

Rearranjando a equação (3.15) tem-se:

$$\begin{aligned} - \left[\frac{v}{4 \Delta Z} + \frac{E}{2 (\Delta Z)^2} \right] C_{i-1,j+1} + \left[\frac{E}{(\Delta Z)^2} + \frac{1}{\Delta t} \right] C_{i,j+1} + \left[\frac{v}{4 \Delta Z} - \frac{E}{2 (\Delta Z)^2} \right] C_{i+1,j+1} = \\ \left[\frac{v}{4 \Delta Z} + \frac{E}{2 (\Delta Z)^2} \right] C_{i-1,j} + \left[\frac{1}{\Delta t} - \frac{E}{(\Delta Z)^2} - \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) k_1 (Q_m - Q_{i,j}) \right] C_{i,j} + \\ \left[\frac{E}{2 (\Delta Z)^2} - \frac{v}{4 \Delta Z} \right] C_{i+1,j} + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) k_2 Q_{i,j} \end{aligned} \quad (3.16)$$

Tomando-se:

$$\alpha = \left[\frac{v}{4 \Delta Z} + \frac{E}{2 (\Delta Z)^2} \right] \quad (3.17)$$

$$\beta = \left[\frac{E}{(\Delta Z)^2} + \frac{1}{\Delta t} \right] \quad (3.18)$$

$$\varphi = \left[\frac{v}{4 \Delta Z} - \frac{E}{2 (\Delta Z)^2} \right] \quad (3.19)$$

$$\theta = \left[\frac{1}{\Delta t} - \frac{E}{(\Delta Z)^2} \right] \quad (3.20)$$

Obtém-se a equação geral:

$$-\alpha C_{i-1,j+1} + \beta C_{i,j+1} + \varphi C_{i+1,j+1} = \alpha C_{i-1,j} - \varphi C_{i+1,j} + \left[\theta - \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) k_1 (Q_m - Q_{i,j}) \right] C_{i,j} + \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} k_2 Q_{i,j} \quad (3.21)$$

Levando-se em consideração a resistência à transferência de massa externa e considerando regime permanente:

$$R_s = j = K (C - C_s) \quad (3.22)$$

Para um reator de leito fixo tem-se:

$$j = \frac{N_{Sh}}{N_{Re} N_{Sc}} (N_{Sc})^{2/3} \quad (3.23)$$

onde:

$$N_{Sh} = \frac{K dp}{D v} \quad (3.24)$$

sendo D a difusividade molecular da enzima.

Segundo YOUNG *et al.* (1980), citado por LIAPIS *et al.* (1989), a difusividade molecular da enzima pode ser obtida pela expressão seguinte:

$$D = 8,34 \times 10^{-8} \left[\frac{T}{\left(\mu M^{1/3} \right)} \right] \quad (3.25)$$

onde:

T : temperatura absoluta (300 K)

μ : viscosidade da solução que contém o adsorvato (kg/mh)

M: peso molecular da enzima (avaliado em 60 000 daltons)

De acordo com LIAPIS *et al.* (1989):

$$N_{Sc} = \frac{\mu}{\rho D v} \quad (3.26)$$

$$N_{Re} = \frac{\rho v dp}{\mu} \quad (3.27)$$

Substituindo-se os números adimensionais na equação (3.23), tem-se:

$$j = \frac{K}{v} \left(\frac{\mu}{\rho D} \right)^{2/3} \quad (3.28)$$

Isolando o coeficiente global de transferência de massa (K) tem-se:

$$K = j v \left(\frac{\mu}{\rho D} \right)^{-2/3} \quad (3.29)$$

Introduzindo a correlação de DWIVEDI & UPADHYAY (1977), para $N_{Re} < 10$:

$$j = \frac{1,1068}{\varepsilon} \left(\frac{\rho v dp}{\mu} \right)^{-0,72} \quad (3.30)$$

Substituindo-se a correlação acima na expressão do coeficiente global de transferência de massa:

$$K = v \frac{1,1068}{\varepsilon} \left(\frac{\rho v dp}{\mu} \right)^{-0,72} \left(\frac{\mu}{\rho D} \right)^{-2/3}$$

ou

$$K = v \frac{1,1068}{\varepsilon} (N_{Re})^{-0,72} (N_{Sc})^{-2/3} \quad (3.31)$$

Voltando às equações (3.10) e (3.22) para obter a expressão para a concentração na superfície da resina:

$$-\frac{\partial C}{\partial t} = [k_1 C_s (Q_m - Q) - k_2 Q] \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \quad (3.10)$$

$$j = K(C - C_s) = R_s = -\frac{\partial C}{\partial t} = [k_1 C (Q_m - Q) - k_2 Q] \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \quad (3.22)$$

Assim, isolando-se C_s :

$$C_{s,i,j} = \frac{K C_{i,j} + k_2 Q_{i,j} \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon}}{K + k_1 (Q_m - Q_{i,j}) \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon}} \quad (3.32)$$

Substituindo-se a equação (3.32) na equação (3.9) obtém-se a equação:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -v \frac{\partial C}{\partial z} + \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} - K \left[C - \frac{K C_{i,j} + k_2 Q_{i,j} \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon}}{K + k_1 (Q_m - Q_{i,j}) \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon}} \right] \quad (3.33)$$

Finalmente, a equação geral assume a seguinte expressão:

$$-\alpha C_{i-1,j+1} + \beta C_{i,j+1} + \varphi C_{i+1,j+1} = \alpha C_{i-1,j} - \varphi C_{i+1,j} + \left\{ \theta - \left[K + \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} k_1 (Q_m - Q_{i,j}) \right] \right\} C_{i,j} + k_2 Q_{i,j} \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \left[\left(\frac{2\alpha - 2\varphi - \beta + \theta}{K} \right) + 1 \right] \quad (3.34)$$

3.3-Modelagem matemática do processo CARE com três estágios

O processo CARE considerado no presente trabalho consiste de três reatores de igual volume, um de adsorção, um de lavagem e outro de dessorção. O reator de adsorção é alimentado a partir do fermentador (F_1), contendo a enzima a ser purificada (C_0) e seus contaminantes (C_{T0}). Neste estágio a enzima é ligada ao suporte sendo enviada ao segundo estágio (C_1) onde ocorre a lavagem com adição de tampão com sal (F_2) para eliminar parte dos contaminantes. Então é enviada ao terceiro estágio, onde ocorre a dessorção com tampão sem sal (F_3). Os três reatores são bem agitados e o adsorvente que é reciclado com vazão (F_r), permanece nos reatores devido a presença de um filtro macroporoso. O produto (C_3) é removido continuamente através do filtro retentor (GORDON *et al.*, 1990b).

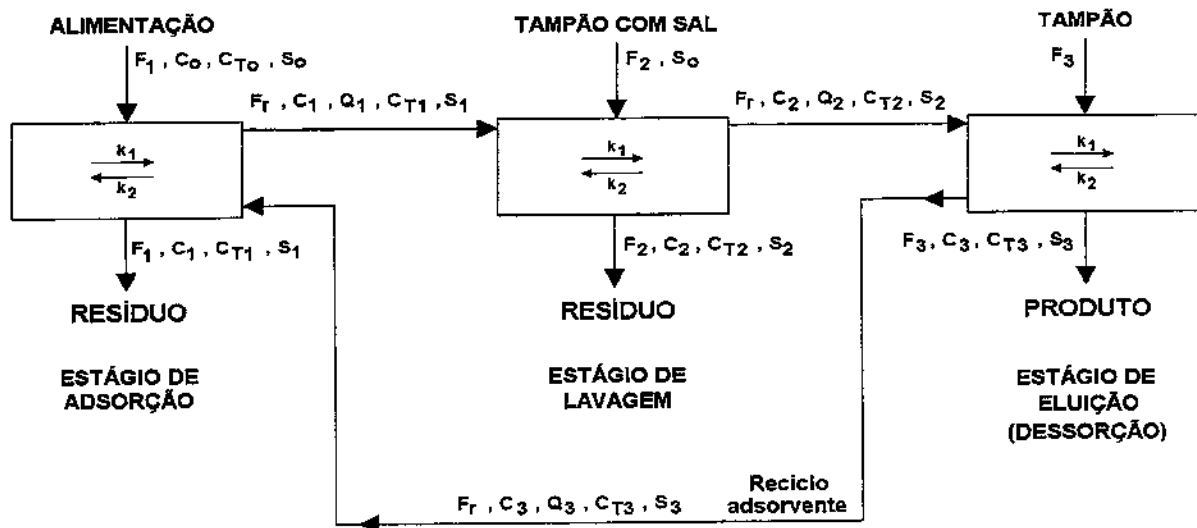


FIGURA 3.2-Esquema do processo CARE com três estágios

A modelagem foi feita considerando que os reatores são perfeitamente agitados e que a adsorção ocorre na superfície do suporte, desconsiderando-se a resistência da película à transferência de massa, como indicado por MARTINS *et al.* (1995). Baseado nas correntes indicadas na Figura 3.2, foram feitos os balanços de massa para cada estágio, levando em conta as equações cinéticas que representam a adsorção e dessorção. Como o processo é isotérmico, mudanças de energia não foram consideradas, e a queda de pressão no sistema foi considerada desprezível.

Foi considerado também nesta modelagem, que nos três estágios existe um equilíbrio entre adsorção e dessorção, cujas constantes (k_1 e k_2) variam com a concentração de sal presente no sistema.

3.3.1-Estágio de adsorção



$$B = Q_m - Q_1 \quad (3.36)$$

$$r_e = -r_q = [k_2 Q_1 - k_1 C_1 (Q_m - Q_1)] \quad (3.37)$$

3.3.1.1-Balanço de massa na fase líquida

3.3.1.1.1-Balanço da enzima livre

$$V_L \frac{dC_1}{dt} = (F_1 C_o + F_r C_3) - (F_1 C_1 + F_r C_1) + r_e V_L \quad (3.38)$$

$$\frac{dC_1}{dt} = \frac{F_1}{V_L} (C_o - C_1) + \frac{F_r}{V_L} (C_3 - C_1) + [k_2 Q_1 - k_1 C_1 (Q_m - Q_1)] \quad (3.39)$$

Definindo:

$$\tau_1 = \frac{V_L}{F_1} \quad (3.40)$$

$$\psi = \frac{F_r}{F_1} \quad (3.41)$$

Temos:

$$\frac{dC_1}{dt} = \frac{C_o - C_1}{\tau_1} + \frac{\psi}{\tau_1} (C_3 - C_1) + [k_2 Q_1 - k_1 C_1 (Q_m - Q_1)] \quad (3.42)$$

Utilizando a relação de volumes (ε) para transformar todos os termos nas mesmas unidades dimensionais:

$$\varepsilon = \frac{V_L}{V_L + V_s} \quad (3.43)$$

Assim:

$$\frac{dC_1}{dt} = \frac{C_o - C_1}{\tau_1} + \frac{\psi}{\tau_1} \varepsilon (C_3 - C_1) + [k_2 Q_1 - k_1 C_1 (Q_m - Q_1)] \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right) \quad (3.44)$$

3.3.1.1.2-Balanco para os contaminantes

Para os contaminantes assumiu-se que eles são inertes e que não ocorre adsorção no suporte. Desta forma o balanço de massa é descrito pelas equações abaixo.

$$V_L \frac{dC_{T1}}{dt} = (F_1 C_{To} + F_r C_{T3}) - (F_1 C_{T1} + F_r C_{T1}) \quad (3.45)$$

$$\frac{dC_{T1}}{dt} = \frac{F_1}{V_L} (C_{To} - C_{T1}) + \frac{F_r}{V_L} (C_{T3} - C_{T1}) \quad (3.46)$$

$$\frac{dC_{T1}}{dt} = \frac{C_{To} - C_{T1}}{\tau_1} + \frac{\psi}{\tau_1} \varepsilon (C_{T3} - C_{T1}) \quad (3.47)$$

3.3.1.1.3- Balanco para o sal

A mesma consideração feita para os contaminantes é valida também para a concentração de sal:

$$V_L \frac{dS_1}{dt} = (F_1 S_o + F_r S_3) - (F_1 S_1 + F_r S_1) \quad (3.48)$$

$$\frac{dS_1}{dt} = \frac{F_1}{V_L} (S_o - S_1) + \frac{F_r}{V_L} (S_3 - S_1) \quad (3.49)$$

$$\frac{dS_1}{dt} = \frac{S_o - S_1}{\tau_1} + \frac{\psi}{\tau_1} (S_3 - S_1) \quad (3.50)$$

Escrevendo todos os termos nas mesmas unidades:

$$\frac{dS_1}{dt} = \frac{S_o - S_1}{\tau_1} + \frac{\psi \varepsilon}{\tau_1} (S_3 - S_1) \quad (3.51)$$

3.3.1.2- Balanço de massa na fase sólida

$$V_s \frac{dQ_1}{dt} = F_r Q_3 - F_r Q_1 + r_q V_s \quad (3.52)$$

$$\frac{dQ_1}{dt} = \frac{F_r}{V_s} (Q_3 - Q_1) + [k_1 C_1 (Q_m - Q_1) - k_2 Q_1] \quad (3.53)$$

Fazendo:

$$\frac{F_r}{V_s} = \psi \frac{F_1}{V_s} = \frac{\psi}{\tau_1} \left(\frac{\varepsilon}{1 - \varepsilon} \right) \quad (3.54)$$

$$\frac{dQ_1}{dt} = \frac{\psi}{\tau_1} \left(\frac{\varepsilon}{1 - \varepsilon} \right) (Q_3 - Q_1) + [k_1 C_1 (Q_m - Q_1) - k_2 Q_1] \quad (3.55)$$

Igualando as unidades em todos os termos:

$$\frac{dQ_1}{dt} = \frac{\psi \varepsilon}{\tau_1} (Q_3 - Q_1) + [k_1 C_1 (Q_m - Q_1) - k_2 Q_1] \quad (3.56)$$

3.3.2-Estágio de lavagem



$$B^1 = Q_m - Q_2 \quad (3.58)$$

$$r_e = -r_q = [k_2 Q_2 - k_1 C_2 (Q_m - Q_2)] \quad (3.59)$$

3.3.2.1-Balanco de massa na fase líquida

3.3.2.1.1- Balanco para a enzima livre

$$V_L \frac{dC_2}{dt} = (F_r C_1 - F_r C_2) - F_2 C_2 + r_e V_L \quad (3.60)$$

Fazendo:

$$\gamma = \frac{F_1}{F_2} \quad (3.61)$$

Obtemos:

$$\frac{dC_2}{dt} = \frac{\psi \varepsilon}{\tau_1} (C_1 - C_2) - \frac{C_2}{\gamma \tau_1} + [k_2 Q_2 - k_1 C_2 (Q_m - Q_2)] \quad (3.62)$$

Transformando todos os termos nas mesmas unidades dimensionais:

$$\frac{dC_2}{dt} = \frac{\psi \varepsilon}{\tau_1} (C_1 - C_2) - \frac{C_2}{\gamma \tau_1} + [k_2 Q_2 - k_1 C_2 (Q_m - Q_2)] \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right) \quad (3.63)$$

3.3.2.1.2-Balanco para os contaminantes

$$V_L \frac{dC_{T2}}{dt} = F_r C_{T1} - (F_r C_{T2} + F_2 C_{T2}) \quad (3.64)$$

$$\frac{dC_{T2}}{dt} = \frac{F_r}{V_L} (C_{T1} - C_{T2}) - \frac{F_2}{V_L} C_{T2} \quad (3.65)$$

$$\frac{dC_{T2}}{dt} = \frac{\psi}{\tau_1} \varepsilon (C_{T1} - C_{T2}) - \frac{C_{T2}}{\gamma \tau_1} \quad (3.66)$$

3.3.2.1.3- Balanco para o sal

$$V_L \frac{dS_2}{dt} = (F_2 S_0 + F_r S_1) - (F_2 S_2 + F_r S_2) \quad (3.67)$$

$$\frac{dS_2}{dt} = \frac{F_2}{V_L} (S_o - S_2) + \frac{F_r}{V_L} (S_1 - S_2) \quad (3.68)$$

$$\frac{dS_2}{dt} = \frac{S_o - S_2}{\gamma \tau_1} + \frac{\psi}{\tau_1} (S_1 - S_2) \quad (3.69)$$

Escrevendo todos os termos nas mesmas unidades:

$$\frac{dS_2}{dt} = \frac{S_o - S_2}{\gamma \tau_1} + \frac{\psi \varepsilon}{\tau_1} (S_1 - S_2) \quad (3.70)$$

3.3.2.2-Balço de massa na fase s3lida

$$V_s \frac{dQ_2}{dt} = F_r Q_1 - F_r Q_2 + r_q V_s \quad (3.71)$$

$$\frac{dQ_2}{dt} = \frac{F_r}{V_s} (Q_1 - Q_2) + [k_1 C_2 (Q_m - Q_2) - k_2 Q_2] \quad (3.72)$$

$$\frac{dQ_2}{dt} = \frac{\psi}{\tau_1} \left(\frac{\varepsilon}{1 - \varepsilon} \right) (Q_1 - Q_2) + [k_1 C_2 (Q_m - Q_2) - k_2 Q_2] \quad (3.73)$$

Escrevendo os termos com as mesmas unidades dimensionais:

$$\frac{dQ_2}{dt} = \frac{\psi \varepsilon}{\tau_1} (Q_1 - Q_2) + [k_1 C_2 (Q_m - Q_2) - k_2 Q_2] \quad (3.74)$$

3.3.3-Est3gio de dessorç3o



$$B^{II} = Q_m - Q_3 \quad (3.76)$$

$$r_e = -r_q = [k_2 Q_3 - k_1 C_3 (Q_m - Q_3)] \quad (3.77)$$

3.3.3.1-Balanço de massa na fase líquida

3.3.3.1.1-Balanço para a enzima livre

$$V_L \frac{dC_3}{dt} = F_r C_2 - (F_3 C_3 + F_r C_3) + r_e V_L \quad (3.78)$$

$$\frac{dC_3}{dt} = \frac{F_r}{V_L} (C_2 - C_3) - \frac{F_3 C_3}{V_L} + [k_2 Q_3 - k_1 C_3 (Q_m - Q_3)] \quad (3.79)$$

Considerando:

$$\delta = \frac{F_1}{F_3} \quad (3.80)$$

Obtemos:

$$\frac{dC_3}{dt} = \frac{\psi}{\tau_1} (C_2 - C_3) - \frac{C_3}{\tau_1 \delta} + [k_2 Q_3 - k_1 C_3 (Q_m - Q_3)] \quad (3.81)$$

Escrevendo todos os termos nas mesmas unidades dimensionais:

$$\frac{dC_3}{dt} = \frac{\psi \varepsilon}{\tau_1} (C_2 - C_3) - \frac{C_3}{\tau_1 \delta} + [k_2 Q_3 - k_1 C_3 (Q_m - Q_3)] \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right) \quad (3.82)$$

3.3.3.1.2-Balanço para os contaminantes

$$V_L \frac{dC_{T3}}{dt} = F_r C_{T2} - (F_r C_{T3} + F_3 C_{T3}) \quad (3.83)$$

$$\frac{dC_{T3}}{dt} = \frac{F_r}{V_L} (C_{T2} - C_{T3}) - \frac{F_3}{V_L} C_{T3} \quad (3.84)$$

$$\frac{dC_{T3}}{dt} = \frac{\psi}{\tau_1} (C_{T2} - C_{T3}) - \frac{C_{T3}}{\tau_1 \delta} \quad (3.85)$$

Igualando as unidades temos:

$$\frac{dC_{T3}}{dt} = \frac{\psi \varepsilon}{\tau_1} (C_{T2} - C_{T3}) - \frac{C_{T3}}{\tau_1 \delta} \quad (3.86)$$

3.3.3.1.3-Balço para o sal

$$V_L \frac{dS_3}{dt} = F_r S_2 - (F_3 S_3 + F_r S_3) \quad (3.87)$$

$$\frac{dS_3}{dt} = \frac{F_r}{V_L} (S_2 - S_3) - \frac{F_3}{V_L} S_3 \quad (3.88)$$

$$\frac{dS_3}{dt} = \frac{\psi}{\tau_1} (S_2 - S_3) - \frac{S_3}{\tau_1 \delta} \quad (3.89)$$

Igualando as unidades:

$$\frac{dS_3}{dt} = \frac{\psi \varepsilon}{\tau_1} (S_2 - S_3) - \frac{S_3}{\tau_1 \delta} \quad (3.90)$$

3.3.3.2-Balço de massa na fase s3lida

$$V_s \frac{dQ_3}{dt} = F_r Q_2 - F_r Q_3 + r_q V_s \quad (3.91)$$

$$\frac{dQ_3}{dt} = \frac{F_r}{V_s} (Q_2 - Q_3) + [k_1 C_3 (Q_m - Q_3) - k_2 Q_3] \quad (3.92)$$

$$\frac{dQ_3}{dt} = \frac{\psi}{\tau_1} \left(\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) (Q_2 - Q_3) + [k_1 C_3 (Q_m - Q_3) - k_2 Q_3] \quad (3.93)$$

Igualando as unidades:

$$\frac{dQ_3}{dt} = \frac{\psi \varepsilon}{\tau_1} (Q_2 - Q_3) + [k_1 C_3 (Q_m - Q_3) - k_2 Q_3] \quad (3.94)$$

Também foram definidos o tempo de residência hidráulico (τ_h) e o tempo de residência de sólidos (τ_s), nos três reatores, como indicado nas equações seguintes, nas quais os índices numéricos representam os diferentes estágios (BARBOZA, 1998):

$$\tau_{h1} = \frac{V_1}{F_1 + F_r \varepsilon} \quad , \quad \tau_{h2} = \frac{V_2}{F_2 + F_r \varepsilon} \quad , \quad \tau_{h3} = \frac{V_3}{F_3 + F_r \varepsilon}$$

$$\tau_{s1} = \frac{V_1}{F_r \varepsilon} \quad , \quad \tau_{s2} = \frac{V_2}{F_r \varepsilon} \quad , \quad \tau_{s3} = \frac{V_3}{F_r \varepsilon}$$

Considerando que os reatores contém o mesmo volume ($V_1 = V_2 = V_3 = V_L$) obtem-se finalmente:

$$\tau_{h1} = \frac{V_L}{F_1 + F_r \varepsilon} \quad (3.95)$$

$$\tau_{h2} = \frac{V_L}{F_2 + F_r \varepsilon} \quad (3.96)$$

$$\tau_{h3} = \frac{V_L}{F_3 + F_r \varepsilon} \quad (3.97)$$

$$\tau_{s1} = \tau_{s2} = \tau_{s3} = \frac{V_L}{F_r \varepsilon} \quad (3.98)$$

Para analisar a performance do processo ou seja, seletividade, rendimento e concentração, tem-se as seguintes relações:

Fator de purificação (FP):

$$FP = \frac{(C_3/C_{T3})}{(C_o/C_{To})} \quad (3.99)$$

Rendimento REND (%):

$$REND = \frac{C_3 F_3}{C_o F_1} \quad (3.100)$$

Fator de concentração FC:

$$FC = \frac{C_3}{C_o} \quad (3.101)$$

IV-MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são descritos os procedimentos experimentais utilizados para a produção de lipase em fermentador por *Geotrichum sp.*, a adsorção da lipase, presente no caldo de fermentação obtido, sobre resina hidrofóbica Butyl Sepharose e também para purificação da enzima em coluna cromatográfica hidrofóbica.

4.1-Produção de lipase extracelular

4.1.1-Microrganismo

Utilizou-se uma linhagem de *Geotrichum sp.*, considerada boa produtora de lipase, isolada por MACÊDO (1995) no Laboratório de Bioquímica de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

4.1.2-Ensaio de produção de lipase

Os ensaios de produção de lipase foram realizados em fermentador Bioflo III (New Brunswick Scientific) de 5 litros de capacidade. As condições de operação foram: agitação, 400 rpm; aeração, 1 VVM e temperatura de 30 °C.

Com o propósito de obter elevada atividade lipolítica no caldo bruto de fermentação, foram testados três meios diferentes, descritos a seguir:

Meio (1), composto por 5% de água de maceração de milho (“corn steep liquor”), 0,5% de nitrato de amônio, 1% de óleo de oliva (marca Galo). Este meio apresentou uma pequena diferença em relação ao meio indicado por TSUJISAKA *et al.* (1973b), ao ser substituído o óleo de soja por óleo de oliva.

Meio (2), composto por 5% de peptona, 0,5% de nitrato de amônio, 1% de óleo de oliva (marca Galo).

Meio (3), preparado de acordo com SIDEBOTTOM *et al.* (1991), composto por 5,0 g/l de extrato de levedura, 1,5 g/l KH_2PO_4 , 1,0 g/l NH_4Cl , 1,2 g/l MgSO_4 , 17,0 mg/l ZnSO_4 , 17,0 mg/l MnSO_4 , 17,0 mg/l FeSO_4 , 25,0 g/l de óleo de oliva (marca Galo).

O inóculo foi desenvolvido num meio contendo 0,3% de extrato de levedura, 0,2% NH_4OH , 1,5% de farinha desengordurada e 1% de farinha de trigo, e foi utilizado após 72 horas de incubação (MACÊDO, 1995). Em ensaios posteriores, o inóculo foi desenvolvido num meio de composição similar ao utilizado na produção. Em todos os casos foi utilizada uma quantidade de inóculo correspondente a 10% do volume do meio de fermentação.

Durante os testes de produção foram efetuados controlos de atividade lipolítica, teor de proteína e crescimento celular avaliado como massa seca.

Atingida a máxima atividade lipolítica, o micélio foi eliminado utilizando centrífuga Sorvall RC 26 Plus a 10000 g, por 15 minutos a 5 °C, e armazenado a -20 °C.

4.1.3 - Determinação da atividade lipolítica

Na determinação da atividade lipolítica foi adotado o método indicado por MACÊDO (1995). O método é baseado na titulação dos ácidos graxos livres produzidos pela ação da enzima lipase, presente no caldo bruto de fermentação, sobre os triglicerídeos do óleo de oliva emulsionados em goma arábica.

Em frascos de 100 mL foram adicionados 2 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM com pH 7,0 e 5 mL de emulsão preparada com 75% de goma arábica a 7% e 25% de óleo de oliva v/v. Neste sistema foi acrescentado 1 ml de caldo bruto contendo a lipase, e a seguir incubado em banho-maria (Dubnoff Modelo 145) termostatizado a 37 °C por 30 minutos, com agitação recíproca. Após a incubação, a reação foi interrompida pela adição de 15 mL de mistura acetona:etanol 1:1 v/v e os ácidos graxos liberados foram titulados com uma solução de NaOH 0,05N, utilizando-se fenolftaleína como indicador.

Uma unidade de atividade lipolítica foi definida como a quantidade de enzima que

libera 1 μmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições descritas no parágrafo anterior.

O cálculo da atividade da enzima foi feito utilizando-se uma curva padrão de ácido oléico.

4.1.4 - Concentração de proteína

Foi determinada pelo método de LOWRY *et al.* (1951), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão.

4.1.5 - Determinação da massa seca

Foi pesado um volume conhecido do caldo de fermentação, centrifugado a 10000g durante 10 minutos numa centrífuga Sorvall RC 26 Plus. O centrifugado foi lavado uma vez com água destilada e depois resuspendido num volume pequeno de água destilada, colocado numa placa de Petri, previamente pesada, e secado em estufa a 100°C até atingir peso constante (HENRIETTE *et al.*, 1993).

4.2-Purificação de lipase a partir de caldo bruto de fermentação

4.2.1-Meio adsorvente

Para a seleção da resina hidrofóbica a ser utilizada na purificação da lipase de *Geotrichum sp.*, foi realizado um “screening” de resinas de interação hidrofóbica (Phenyl-, Octyl- e Butyl Sepharose) utilizando um “kit” de colunas (HiTrap[®] Test Kit da Pharmacia LKB) contendo 1 mL de cada resina, e um sistema de cromatografia FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography). Foram injetados 2 mL de caldo bruto e determinou-se a recuperação de atividade lipolítica e o fator de purificação após a eluição da lipase retida na coluna. Utilizou-se uma concentração 2M de cloreto de sódio tanto no caldo bruto como no tampão de lavagem; sendo feita a eluição com tampão fosfato de sódio 10 mM sem NaCl.

O material adsorvente selecionado foi a Butyl Sepharose 4 FF (Pharmacia LKB). Esta é uma resina de interação hidrofóbica, produzida acoplando butyl glycidyl éter às

partículas esféricas de agarose, com tamanho médio de 90 μm . (BERGGRUND *et al.*, 1994).

Com o objetivo de determinar a concentração adequada de sal para conseguir a recuperação da lipase mantendo sua boa atividade lipolítica, foram testadas diferentes concentrações de NaCl (1M, 2M, 3M e 4M) e avaliadas através do fator de purificação e porcentagem de recuperação da enzima.

Os ensaios foram realizados num sistema FPLC, da Pharmacia LKB, composto por um controlador LCC-501, duas bombas P-500 de alta precisão, coletor de amostras Frac-100, espectrofotômetro UV, válvula de injeção MV-7 e um integrador Varian 4270 (Varian, Palo Alto, CA).

4.2.2-Purificação de lipase em coluna cromatográfica

4.2.2.1-Purificação em coluna de troca iônica

Foi feita num sistema FPLC, utilizando coluna de Q-Sepharose FF HiLoad 16/10 de 10 x 1,6 cm de diâmetro interior, pré-empacotada (Pharmacia). A coluna foi equilibrada com tampão fosfato 10 mM, pH 7,5, até obter uma linha de base constante no monitor conectado ao espectrofotômetro (280 nm). A amostra (10 mL), no caso caldo bruto de fermentação com pH ajustado em 7,5 utilizando NaOH 1N e filtrado em membrana de 0,45 μm de diâmetro de poros (Millipore), foi aplicada numa vazão de 0,5 mL/min. Após lavagem com tampão fosfato 10 mM pH 7,5, para voltar à linha de base, foi feita a eluição com gradiente salino linear de NaCl (0M - 1M) em tampão fosfato 10 mM pH 7,5, numa vazão de 1 mL/min. As diferentes frações foram coletadas no coletor de amostras do equipamento, determinando-se a atividade lipolítica e teor de proteína segundo os métodos descritos anteriormente.

4.2.2.2-Purificação em coluna de interação hidrofóbica

Utilizou-se uma coluna de 1 cm de diâmetro interior e altura de leito de 5 cm, montada num sistema FPLC. A Butyl Sepharose foi colocada na coluna, lavada com

tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,0 e equilibrada com tampão fosfato 10 mM pH 7,0 contendo 2M de cloreto de sódio. A amostra, contendo NaCl na concentração 2M e pH ajustado em 7,0, previamente filtrada em membrana Millipore de 0,45 μ m de diâmetro de poros, foi aplicada com vazão de 1 mL/min. A eluição foi feita com tampão fosfato de sódio 10 mM. As frações foram coletadas determinando-se o teor de proteína e a atividade lipolítica.

4.2.2.3-Eletroforese

A eletroforese em dodecyl sulfato de sódio-gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada usando o método de LAEMMLI (1970), em diferentes frações coletadas na saída da coluna de Butyl Sepharose durante a etapa de dessorção das proteínas presentes nas amostras aplicadas. Os padrões utilizados foram Phosphorylase B (94000 Da), albumina (67000 Da), Ovoalbumina (43000 Da), anhidrase carbônica (30000 Da), inibidor de tripsina (20000 Da) e lactoalbumina (14400 Da).

4.2.3- Cinética de adsorção de lipase em Butyl Sepharose

Cloreto de sódio foi adicionado ao caldo bruto contendo lipase, até atingir concentrações 0,5, 1,0 e 2,0M do sal; ajustando o pH no valor 7 exceto na maior concentração para a qual foi também adotado pH 6, com o objetivo de verificar se uma mudança na força iônica tinha efeito na capacidade de adsorção da resina. Colocou-se 50 mL das soluções enzimáticas mais 10 gramas da resina de interação hidrofóbica num reator encamisado de 70 mL de volume total, com agitação mecânica (120 rpm), mantendo-se a temperatura constante a 15 °C, com ajuda de um banho de recirculação externa. A relação entre massa de resina e volume de solução (caldo bruto filtrado) foi de 1:5. Foram retiradas amostras de 1 mL da fase líquida, a diferentes tempos, determinando-se a atividade lipolítica. Foi considerado como tempo de equilíbrio quando o valor de atividade lipolítica no sobrenadante permaneceu constante.

4.2.4 - Isotermas de adsorção

As isotermas de adsorção foram determinadas para diferentes concentrações de

cloreto de sódio no caldo bruto de fermentação (0,5M, 1M e 2M), sendo pH ajustado no valor 7,0. Quantidades iguais de Butyl Sepharose (1 grama) foram distribuídas em frascos com tampa. Em cada frasco foi adicionado um volume de 5 ml do caldo bruto filtrado diluído a diferentes valores de atividade lipolítica. Os frascos foram mantidos sob agitação (120 rpm), a 15°C, num “shaker” Psycrotherm (New Brunswick Scientific). Quando se atingiu o tempo necessário para se alcançar o equilíbrio de adsorção, em torno de 4 horas, foi quantificada a atividade enzimática da fase líquida em cada frasco. Com o valor da atividade enzimática no equilíbrio (C^*) e subtraindo da atividade inicial (C_0), obtém-se a concentração de enzima adsorvida. Os valores de Q^* foram calculados utilizando a expressão:

$$Q^* = \frac{(C_0 - C^*)}{\text{massa}_{\text{resina}}} V_{\text{sol}} \quad (4.1)$$

A partir dos valores de C^* (U/ml) e Q^* (U/g), para cada ponto de equilíbrio, foi construída a curva que representa a isoterma de adsorção. Estes dados foram ajustados ao modelo de Langmuir conforme a equação 3.4, através de regressão não linear, determinando-se então os parâmetros Q_m e k_d ($k_d = k_2/k_1$).

4.2.5-Determinação das constantes cinéticas k_1 e k_2

Para a determinação das constantes k_1 e k_2 foi utilizado o método numérico de Runge-Kutta de 4ª ordem para a resolução da equação 3.3, simulando uma curva de cinética de adsorção desde o tempo zero até o estabelecimento do equilíbrio. Assim, atribuindo um valor inicial para k_1 é obtido, consequentemente, k_2 , visto k_d ser conhecido; e através de método iterativo são determinados k_1 e k_2 , impondo o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados, da solução da equação 3.3 aos pontos experimentais.

4.2.6-Determinação das curvas de ruptura

As curvas de ruptura foram obtidas utilizando um FPLC com coluna hidrofóbica de Butyl Sepharose. Foram feitos ensaios para diferentes alturas de leito (2,5 cm - 7,5 cm)

e vazões (0,2 mL/min - 1,0 mL/min), mantendo constante a concentração de sal (2M NaCl) e pH (7,0) do caldo bruto de fermentação aplicado e a temperatura de operação (15 °C). Nas diferentes frações coletadas determinou-se a atividade lipolítica. Também foram realizados ensaios para diferentes concentrações de cloreto de sódio (0M - 2M) mantendo-se constantes a altura do leito (5 cm), vazão (1 mL/min), pH (7,0) e temperatura de operação (15 °C); nas diferentes frações coletadas determinou-se atividade lipolítica.

A eficiência (ϕ) foi calculada utilizando a equação:

$$\phi = \frac{Q_{ads.(C/C_0=0,9)}}{Q_{aplicado(C/C_0=0,9)}} \quad (4.2)$$

onde: $Q_{ads.}$ é a quantidade de atividade lipolítica adsorvida pelo leito de resina, até que a atividade lipolítica na saída da coluna seja igual a 0,9 da atividade lipolítica inicial; $Q_{aplicado}$ é a quantidade de atividade lipolítica injetada na coluna até que a atividade lipolítica na saída atinja um valor igual a 0,9 da atividade lipolítica inicial.

Na integração numérica necessária para o cálculo da eficiência na retenção de lipase, para as diferentes condições operacionais consideradas, foi utilizado Origin MicroCal 4.0.

4.3-Determinações complementares

Estas determinações foram feitas por serem necessárias para outras etapas deste trabalho, principalmente para as simulações tanto em coluna cromatográfica como no sistema contínuo CARE.

4.3.1- Determinação da porosidade do leito e a porosidade da partícula de resina

As porosidades, do leito e das partículas de resina, foram determinadas pelo método dos momentos (NAKANISHI *et al.*, 1977; SIROTTI & EMERY, 1983; ARNOLD *et al.*, 1985), utilizando Dextran Blue 0,2% (m/v) em tampão fosfato de sódio 10 mM, como traçador de alto peso molecular, e acetona 1% (v/v) em tampão fosfato de sódio

10mM como traçador de baixo peso molecular. Os ensaios foram realizados num FPLC com vazões compreendidas entre 0,1 mL/min e 1 mL/min, em colunas contendo 1 mL e 5 mL de Butyl Sepharose. As leituras de absorvância foram feitas com espectrofotômetro UV a 280 nm.

O método dos momentos consiste em determinar o valor do primeiro momento para o sistema, inicialmente sem a presença do leito de resina, e depois quando já o leito de resina se encontra no sistema. O valor do primeiro momento pode ser calculado pela equação (4.3):

$$\mu_1 = \frac{\int_0^{\infty} t C(t) dt}{\int_0^{\infty} C(t) dt} \quad (4.3)$$

onde: μ_1 é o primeiro momento para o sistema, t é o tempo do experimento, e $C(t)$ é a concentração do traçador, na saída da coluna, medida como absorvância.

O primeiro momento para o leito é dado pela diferença entre os primeiros momentos do sistema completo contendo resina (μ_1^r) e do sistema sem resina (μ_1^o):

$$\mu_1^L = \mu_1^r - \mu_1^o = \frac{H}{u_o} [\varepsilon + (1 - \varepsilon)\sigma] + \frac{t_o}{2} \quad (4.4)$$

onde: H é a altura do leito, u_o é a velocidade superficial do líquido, ε é a porosidade do leito, σ é a porosidade da partícula e t_o o tempo de injeção. A velocidade superficial do líquido pode ser calculada pela relação:

$$u_o = \frac{\text{vazão}}{\text{seção reta da coluna cromatográfica}}$$

A porosidade do leito é obtida através da determinação do primeiro momento utilizando o traçador de alto peso molecular, para garantir que não ocorra a entrada do mesmo nos poros da resina. Neste caso a porosidade da partícula pode ser considerada zero e a equação (4.4), torna-se:

$$\mu_1^L = \mu_1^r - \mu_1^o = \frac{H}{u_o} \varepsilon + \frac{t_o}{2} \quad (4.5)$$

Desta forma, a porosidade do leito é determinada através do primeiro momento para vários valores de velocidade superficial do líquido. A inclinação da reta obtida no gráfico de primeiro momento no leito em função de H/u_o é igual a porosidade do leito (ε).

A porosidade da partícula é determinada pelos primeiros momentos do traçador de baixo peso molecular, obtidos para diferentes valores de velocidade superficial do líquido. A inclinação da reta obtida no gráfico de primeiro momento em função de H/u_o é $[\varepsilon + (1-\varepsilon)\sigma]$ e, por tanto, a porosidade da partícula é obtida desta inclinação substituindo o valor da porosidade do leito.

A altura do prato teórico (HETP) está relacionada com o desempenho da coluna cromatográfica, e pode ser determinada com o primeiro e segundo momento dos pulsos do traçador de baixo peso molecular injetados na coluna, utilizando a equação (4.6):

$$HETP = \frac{\mu_2}{\mu_1^2} H \quad (4.6)$$

onde o segundo momento está dado por:

$$\mu_2 = \frac{\int_0^\infty (t - \mu_1)^2 C(t) dt}{\int_0^\infty C(t) dt} \quad (4.7)$$

4.3.2-Densidade

Para determinação da densidade da resina e das soluções enzimáticas foi utilizado o método do picnômetro, segundo as recomendações de MOHSENIN (1986).

4.3.3-Viscosidade

A determinação de viscosidade cinemática das soluções contendo lipase, a serem purificadas, foi feita utilizando viscosímetro capilar Cannon-Fenske N° 50. A temperatura foi mantida constante (15 °C) colocando-se o viscosímetro num banho de água.

V-RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste Capítulo estarão sendo enfocados os resultados experimentais, assim como os resultados das simulações de adsorção de lipase em coluna de resina hidrofóbica.

5.1-Resultados experimentais

5.1.1-Microrganismo

Na Figura 5.1 apresenta-se a microfotografia do microrganismo utilizado na fermentação para produção de lipase. Através das características morfológicas do micélio, com hifas segmentadas que se quebram em artrosporas cilíndricas com extremos arredondados (CONANT *et al.*, 1972; ASAHARA *et al.*, 1993; MACÊDO, 1995) o microrganismo foi identificado como pertencente ao gênero *Geotrichum*.

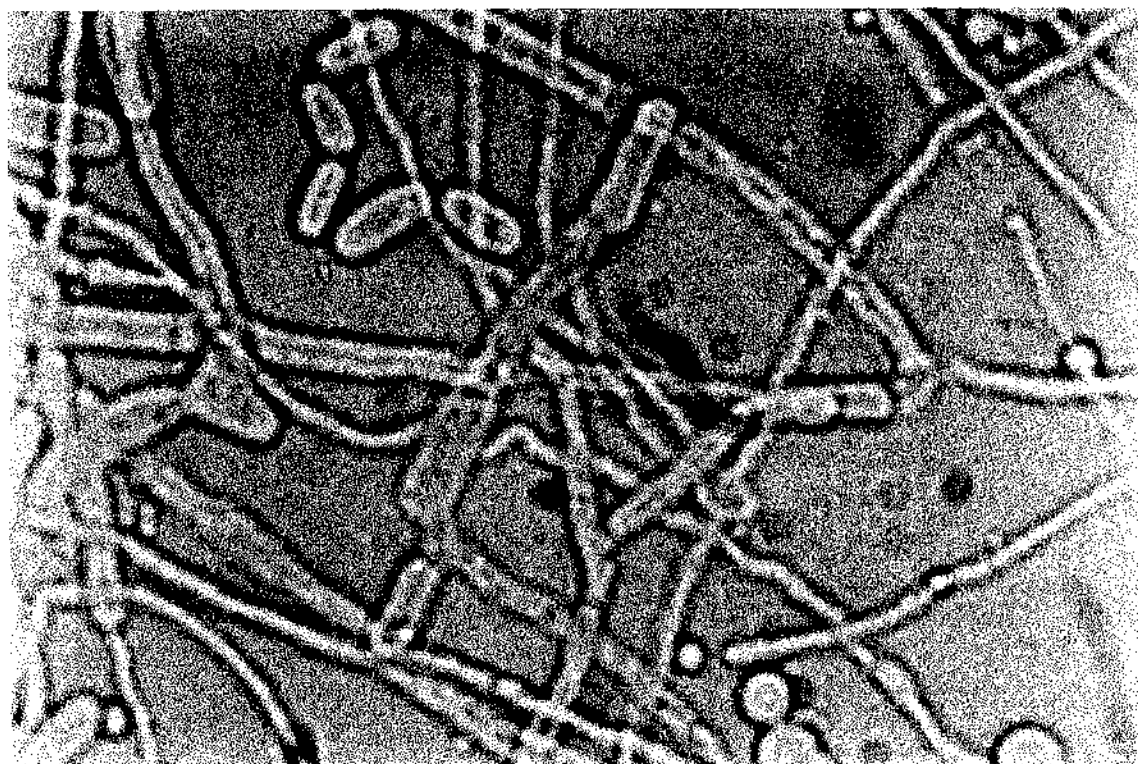


FIGURA 5.1-Microfotografia (1000x) do *Geotrichum* sp. após 12 horas de fermentação em meio complexo (sob as condições: agitação 400 rpm, aeração 1 VVM e temperatura 30 °C)

5.1.2-Produção de lipase extracelular por *Geotrichum sp.*

A produção de lipase nos meios (1) e (2), medida pela atividade lipolítica no caldo de fermentação, é apresentada na Figura 5.2. O inóculo foi desenvolvido num meio contendo 0,3% de extrato de levedura, 0,2% NH_4OH , 1,5% de farinha desengordurada e 1% de farinha de trigo, e foi utilizado após 72 horas de incubação (MACÊDO, 1995). Atingiu-se um máximo de 25 U/mL, num período aproximado de 24 horas de fermentação, quando utilizada água de maceração de milho (AMM) como fonte de nitrogênio orgânico (meio (1)). Para o meio (2), contendo peptona, a máxima atividade lipolítica foi de 20 U/mL, obtida num período de 20 horas. Pode-se observar que após o tempo de atividade enzimática máxima, esta diminui, devido possivelmente a ação de proteases produzidas pelo microrganismo (BAILLARGEON *et al.*, 1989).

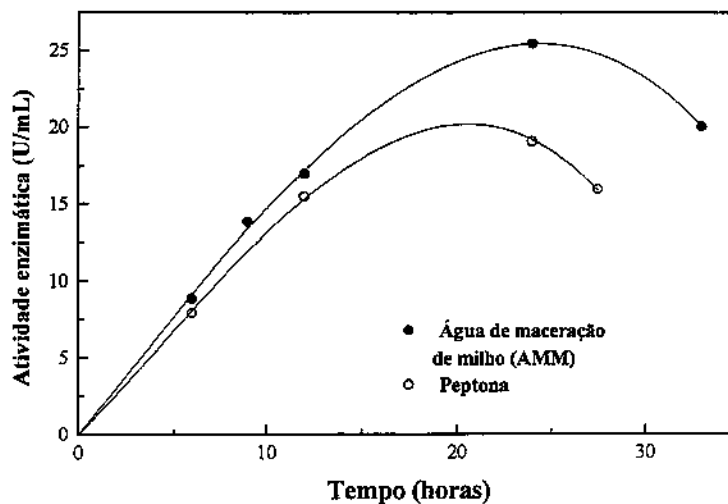


Figura 5.2-Produção de lipase por *Geotrichum sp.* em meios contendo água de maceração de milho (AMM) e peptona.

A Figura 5.3 mostra comportamento similar na produção de lipase, utilizando meio (3), quando comparado aos meios contendo AMM e peptona. O inóculo foi desenvolvido no meio indicado por MACÊDO (1995), e foi utilizado após 72 horas de incubação. A atividade atingiu um valor máximo em torno de 20 U/mL, após 14 horas de fermentação, e depois deste tempo notou-se uma queda de quase 50% no valor da atividade lipolítica. Esta queda na atividade lipolítica coincidiu com o aumento no pH (mantido

constante em 4,5 com a adição de NH_4OH 1M) e com o aumento na massa celular. Estes dois fatores podem ter originado a produção de proteases por parte do microrganismo, que provocaram a queda de atividade lipolítica. Deve-se notar que quando o valor do pH permaneceu constante, foi mínimo o aumento da massa celular. Este comportamento é similar ao relatado por SIDEBOTTOM *et al.* (1991) na produção de lipase por *Geotrichum candidum*, utilizando um meio de composição similar ao meio (3), mas contendo maior quantidade de extrato de levedura (20 g/L).

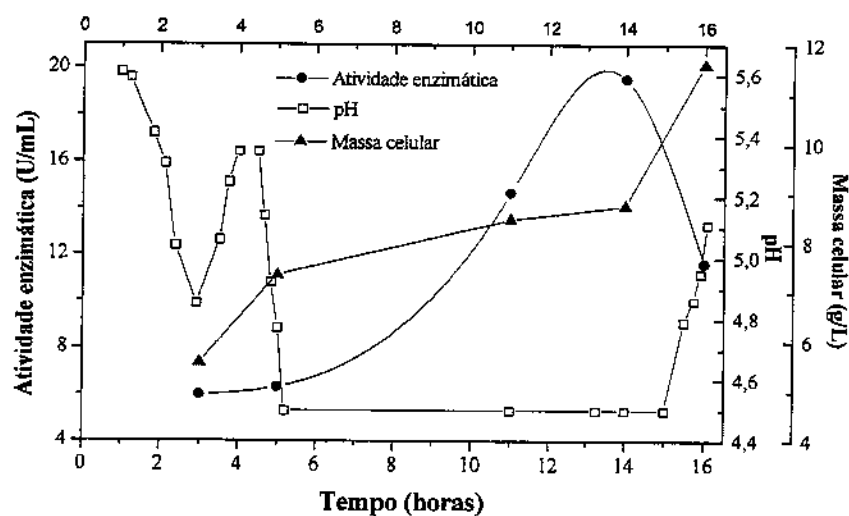


Figura 5.3-Produção de lipase por *Geotrichum sp.* em meio contendo extrato de levedura como fonte de nitrogênio

A produção de lipase utilizando AMM (meio 1) com correção do pH do meio de produção é apresentada na Figura 5.4. O meio para produção do inóculo foi o indicado por MACÊDO (1995). O pH do meio foi corrigido de 3,6 (valor inicial) até 7,6. Esta mudança no pH foi feita para estar na faixa do pH de estabilidade da lipase produzida pelo *Geotrichum sp.* (pH entre 5 e 8). Deve-se notar que a atividade lipolítica máxima está em torno de 28 U/mL após 22 horas de fermentação e que a queda na atividade enzimática ocorre de maneira muito brusca. Esta queda pode ser justificada pela presença de proteases (BAILLARGEON *et al.*, 1989). Esta solução enzimática mostrou ser muito instável durante os ensaios de purificação no FPLC, devido a ação das proteases presentes.

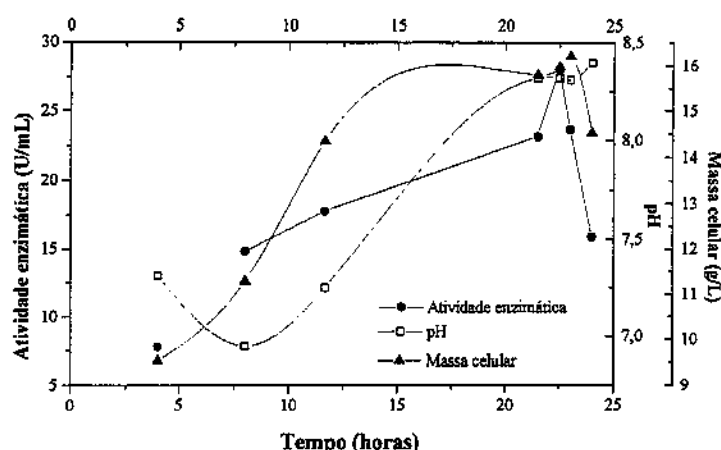


Figura 5.4-Produção de lipase por *Geotrichum sp.* em meio contendo água de maceração de milho (AMM) com correção do pH inicial do meio de fermentação

Nas Figuras 5.5 (a) e 5.5 (b) são apresentadas fermentações utilizando o meio (1) para as quais o inóculo foi desenvolvido no mesmo meio (TSUJISAKA *et al.*, 1973a; JACOBSEN *et al.*, 1989a). Isto originou uma diminuição no tempo requerido para atingir a máxima atividade lipolítica (10-12 horas), já que o microrganismo está adaptado ao meio e pode utilizar os nutrientes com maior eficiência. Além disso, a perda de atividade lipolítica no final da fermentação não foi muito pronunciada, sendo a enzima obtida mais estável durante a armazenagem.

Em relação ao comportamento do pH durante a fermentação, este decresceu ligeiramente durante o início da fermentação devido a assimilação do ion NH_4 , presente no sulfato de amônio utilizado como fonte de nitrogênio, liberando na solução o NO_3 . Esta acidificação é gradativamente diminuída pela assimilação do nitrogênio orgânico e pela formação de catabólitos de caráter básico, o que origina um aumento do pH até o final da fermentação. Comportamento similar do pH foi relatado por JACOBSEN *et al.* (1989a,b), no curso da fermentação por *Geotrichum candidum* de meios contendo óleo de oliva.

A atividade lipolítica atingida, entre 20 e 25 U/mL, foi maior que a obtida por MACÊDO (1995) e MEDEIROS (1999), com meios de composição similar mas com a fermentação conduzida em frascos agitados. Isto indica que o incremento na aeração foi vantajoso para produção de lipase (BAILLARGEON *et al.*, 1989; JACOBSEN *et al.*, 1989a).

Com base nos resultados obtidos, para a produção da lipase a ser utilizada na purificação, foi escolhido o meio (1), sendo a fermentação conduzida nas condições indicadas anteriormente.

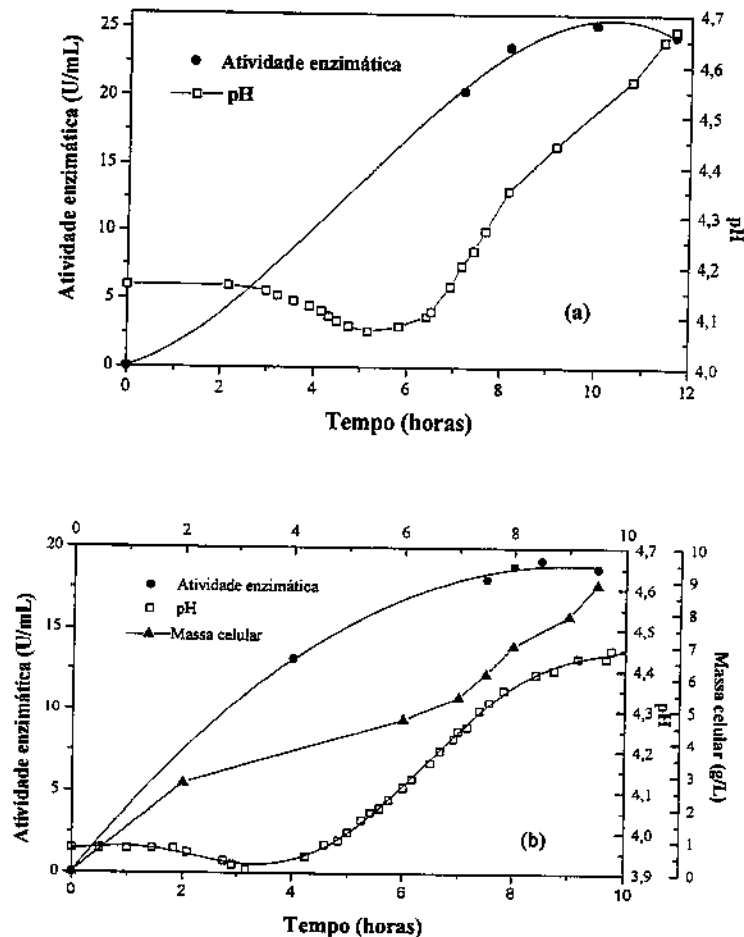


Figura 5.5-Produção de lipase por *Geotrichum sp.* em meio contendo água de maceração de milho (AMM) sem correção do pH

5.1.3-Seleção do tipo de resina para purificação

Os resultados obtidos no “screening” das resinas hidrofóbicas Butyl Sepharose, Octyl Sepharose e Phenyl Sepharose são apresentados nas Figuras 5.6 (a), 5.6 (b) e 5.6 (c), respectivamente, e na Tabela 5.1. Em todos os casos, utilizou-se uma concentração 2M de cloreto de sódio no caldo bruto de fermentação e no tampão de adsorção, a pH 7.

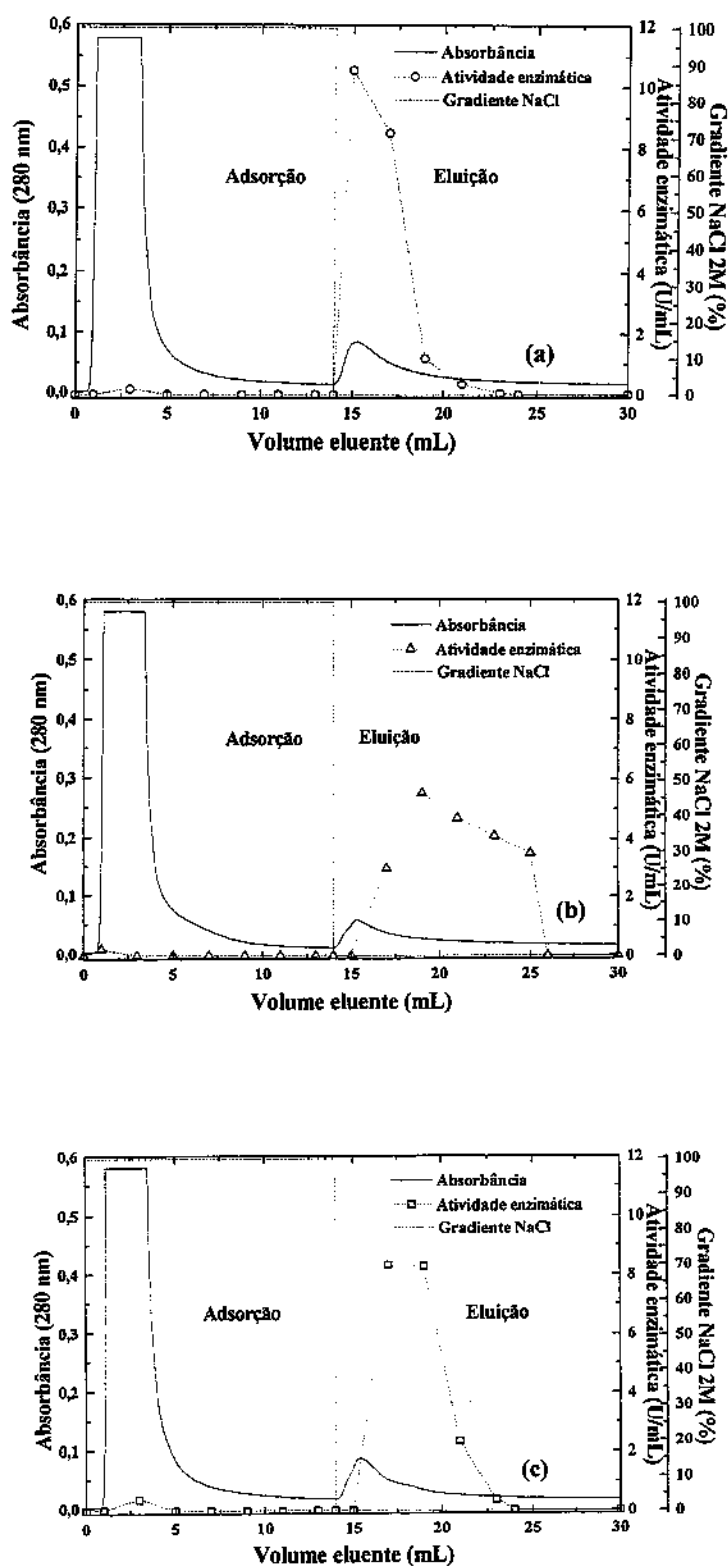


FIGURA 5.6-“Screening” de resinas hidrofóbicas na purificação de lipase. (a) Butyl Sepharose, (b) Octyl Sepharose, (c) Phenyl Sepharose.

Na Figura 5.6 pode-se ver que as resinas hidrofóbicas utilizadas apresentam comportamento diferente na recuperação da lipase (atividade lipolítica). No caso da Butyl-Sepharose (Figura 5.6a), quando o tampão sem NaCl começa a ser injetado, inicia-se a dessorção da proteína adsorvida na coluna, aparecendo nesta primeira fração a maior parte da atividade lipolítica adsorvida. Para o caso da Phenyl Sepharose (Fig. 5.6b), a eluição da lipase adsorvida, medida como atividade lipolítica, começa uma fração depois do início da eluição, conseguindo-se recuperar a maior parte da atividade lipolítica em duas frações. Quando Octyl Sepharose é utilizada (Figura 5.6c), também a eluição da atividade lipolítica começa uma fração após o início da eluição, mas a recuperação da maior parte da atividade lipolítica ocorre em até 5 frações, o que indica que a força de adsorção entre a lipase e esta resina é muito maior que no caso das outras duas resinas utilizadas. Este comportamento de maior ou menor retenção, pode ser explicado em relação ao grau de hidrofobicidade das resinas que varia com o tipo de ligante utilizado, alifático ou aromático, e sendo alifático varia com o comprimento da cadeia do hidrocarboneto (HOFSTEE, 1973; HOFSTEE & OTILLIO, 1978). Assim, a Octyl Sepharose tem alta hidrofobicidade, a Phenyl Sepharose hidrofobicidade média e a Butyl Sepharose hidrofobicidade baixa (PHARMACIA, 1993).

Os valores do fator de purificação e da atividade recuperada, obtidos utilizando resinas hidrofóbicas na purificação da lipase de *Geotrichum sp.*, encontram-se na Tabela 5.1.

TABELA 5.1 - "Screening" de resinas hidrofóbicas para purificação de lipase de *Geotrichum sp.* (concentração 2M NaCl, pH 7)

Etapa	Atividade total (U)	Proteína (mg)	Atividade Específica (U/mg)	Atividade Recuperada (%)	Fator de Purificação
Lipase bruta injetada (2 mL)	42,12	7,31	5,77	100	1
Butyl-Sepharose	38,10	0,28	136,66	90,47	23,71
Octyl-Sepharose	35,55	0,48	74,18	84,41	12,87
Phenyl-Sepharose	32,21	0,27	123,96	78,85	21,51

Na Tabela 5.1 pode-se ver que a maior recuperação de atividade, nas condições do ensaio, foi obtida com Butyl Sepharose, meio menos hidrofóbico entre os utilizados. Isto pode ser devido à maior facilidade na dessorção da lipase ao utilizar para eluição tampão sem NaCl, quando comparada com os meios mais hidrofóbicos, que poderiam requerer do uso de detergentes para conseguir a eluição total da enzima adsorvida (JÜRGENS & HUSSER, 1981; SABUQUILLO *et al.*, 1998). O maior fator de purificação foi obtido com Butyl Sepharose, seguido por Phenyl Sepharose, com valores que são quase o dobro do obtido com Octyl Sepharose, meio mais hidrofóbico. Isto pode ser explicado em relação à maior hidrofobicidade da Octyl Sepharose, que nas condições do teste adsorveu mais proteína que a Butyl Sepharose. Devido a esta elevada hidrofobicidade a Octyl Sepharose vem sendo utilizada como suporte para imobilização de lipases (BASTIDA *et al.*, 1998; FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1998; SABUQUILLO *et al.*, 1998) sob condições de baixa força iônica.

Baseados nos resultados obtidos, foi selecionada a Butyl Sepharose como o meio a ser utilizado para a recuperação da lipase de *Geotrichum sp.*, presente no caldo bruto de fermentação.

5.1.4-Efeito da concentração de cloreto de sódio na purificação da lipase

O efeito da concentração de cloreto de sódio sobre a retenção de proteína pela coluna de Butyl-Sepharose e na purificação da enzima é apresentado na Figura 5.7. Verifica-se que um aumento progressivo na concentração do sal origina um aumento na quantidade de proteína retida na coluna, o que pode ser atribuído ao aumento das interações hidrofóbicas entre o suporte sólido e as proteínas presentes no caldo bruto (OCHOA, 1978; QUEIROZ *et al.*, 1996; KERZEL & MERSMANN, 1990, 1992).

A atividade enzimática recuperada, após a eluição, e o fator de purificação estão apresentados na Tabela 5.2. Nota-se que a atividade lipolítica recuperada diminui com o aumento da concentração de sal utilizada, na faixa de 2M a 4M, que pode ser devida a uma provável desnaturação da lipase ou adsorção menos seletiva em concentrações elevadas de cloreto de sódio já que as outras proteínas presentes no caldo bruto também atingem certo

grau de hidrofobicidade podendo competir com a lipase pelos sítios hidrofóbicos da matriz; quando o teor salino aumenta de 1M até 2M apresenta-se um aumento na atividade recuperada e no fator de purificação que indica uma maior seletividade na adsorção de lipase nesta última concentração. O comportamento observado na faixa de concentração de 2M até 4M de NaCl, é diferente ao relatado por KERZEL & MERSMANN (1990, 1992), que trabalhando com sulfato de amônio nas concentrações 0M até 1,15M, obtiveram maior adsorção de lipase na concentração mais elevada; e concordante com os resultados de SABUQUILLO *et al.* (1998) que relataram maior adsorção das lipases comerciais de *Rhizopus niveus* e *Candida rugosa*, sobre Octyl Sepharose, em concentrações baixas de sulfato de amônio (soluções de baixa força iônica). Comportamento similar foi verificado para o fator de purificação pois está relacionado com a quantidade de proteína adsorvida na coluna cromatográfica.

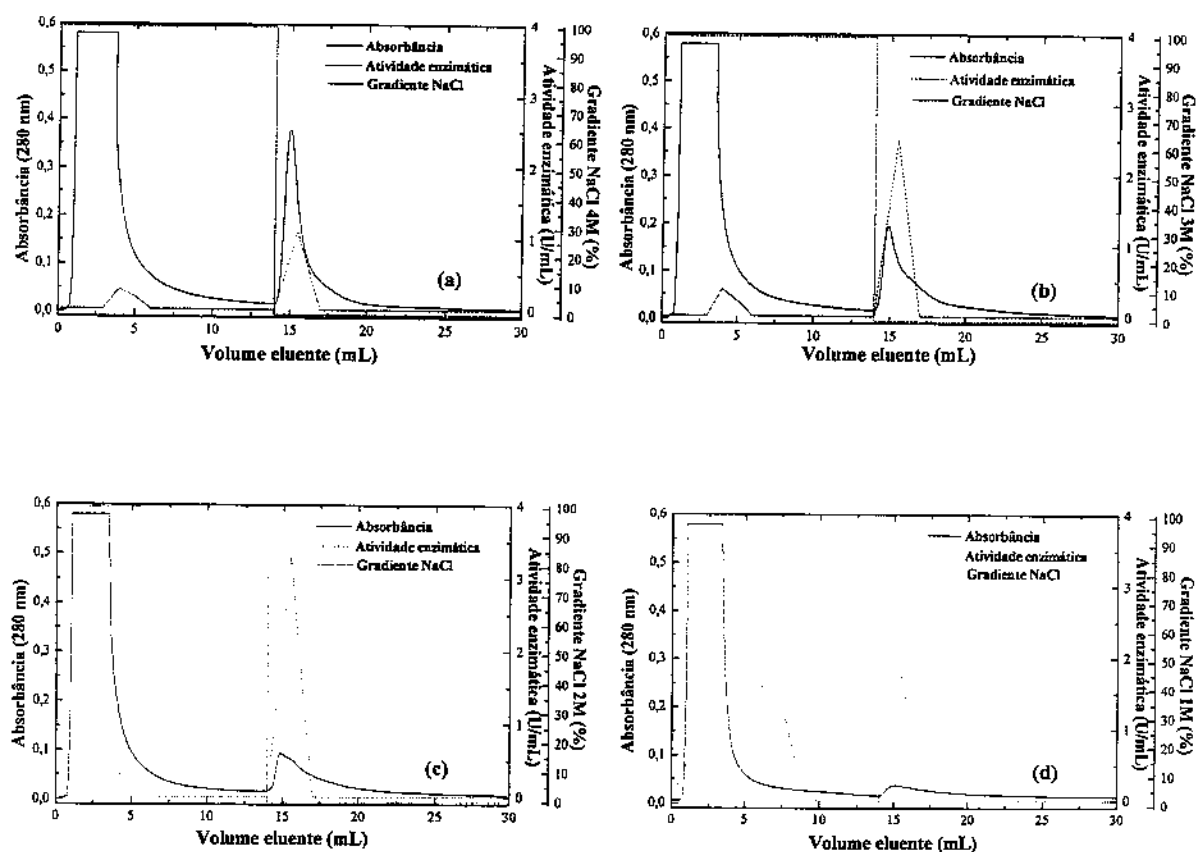


FIGURA 5.7-Efeito da concentração de cloreto de sódio sobre a adsorção de proteína e atividade lipolítica em coluna de Butyl Sepharose. 4FF Hi Trap® (a) 4M, (b) 3M, (c) 2M, (d) 1M

TABELA 5.2- Efeito da concentração de cloreto de sódio na purificação parcial de lipase de *Geotrichum sp.* utilizando coluna de Butyl Sepharose 4FF HiTrap®

Tampão Fosfato de sódio 10 mM + NaCl pH 7:	Etapa	Atividade total (U)	Proteína total (mg)	Atividade Específica (U/mg)	Atividade Recuperada (%)	Fator de Purificação
4M	Lipase bruta	20,28	8,12	2,50	100	1
	Butyl Sepharose	3,28	0,63	5,21	16,16	2,09
3M	Lipase bruta	21,06	8,16	2,58	100	1
	Butyl Sepharose	7,50	0,51	14,78	35,6	5,73
2M	Lipase bruta	23,87	9,48	2,52	100	1
	Butyl Sepharose	9,84	0,31	31,86	41,21	12,66
1M	Lipase bruta	22,30	9,10	2,45	100	1
	Butyl Sepharose	5,26	0,21	25,05	23,87	10,22

5.1.5-Purificação de lipase em colunas de troca iônica (Q-Sepharose) e hidrofóbica (Butyl-Sepharose)

Os resultados da purificação parcial de lipase em colunas de troca iônica e de interação hidrofóbica são apresentados nas Figuras 5.8 e 5.9 e nas Tabelas 5.3 e 5.4. O fator de purificação obtido para o caso da coluna de Q-Sepharose foi de 4,44 vezes sendo a recuperação de atividade de 55,13%.

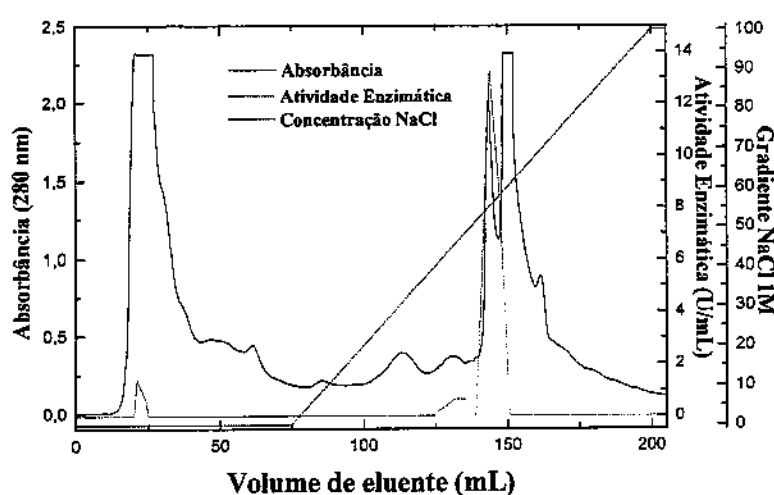
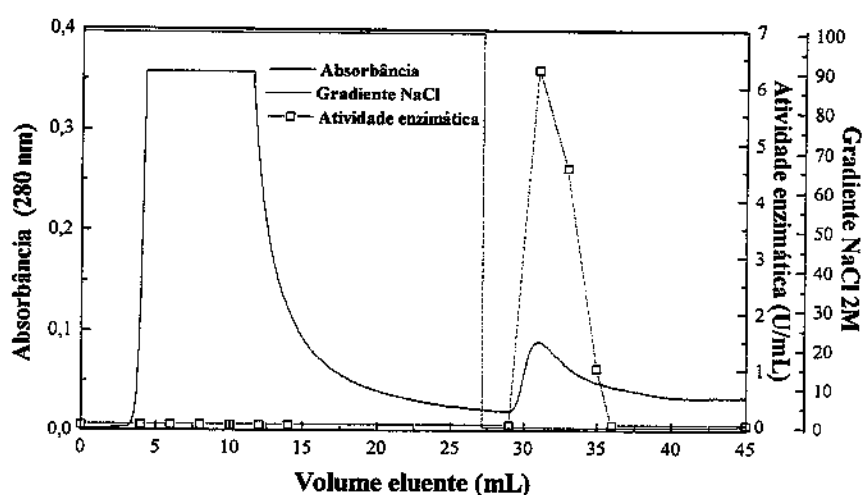
Figura 5.8-Purificação de lipase de *Geotrichum sp.* em coluna de Q-Sepharose

TABELA 5.3 - Purificação de lipase de *Geotrichum sp* em coluna de troca iônica

Etapa	Atividade total (U)	Proteína (mg)	Atividade Específica (U/mg)	Atividade Recuperada (%)	Fator de Purificação
Lipase bruta injetada (5 mL)	123,70	34,02	3,75	100	1
Cromatografia Q-Sepharose	70,25	4,23	16,66	55,13	4,44

O fator de purificação e atividade recuperada obtidos com a coluna de Butyl-Sepharose foram maiores quando comparada com a coluna de troca iônica. Esta melhora na recuperação e na purificação pode ser devida ao elevado grau de hidrofobicidade que apresenta a lipase, pouco usual entre as enzimas, como também ao carácter mais seletivo da cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) em relação à cromatografia de troca iônica, já que o grau de hidrofobicidade pode modular-se, enquanto que a troca iônica está limitada a positivo ou negativo (HOFSTEE & OTILLIO, 1978).

Figura 5.9-Purificação de lipase de *Geotrichum sp*. em coluna de Butyl-SepharoseTABELA 5.4 - Purificação de lipase de *Geotrichum sp* usando coluna hidrofóbica de Butyl Sepharose (concentração 2M de NaCl na adsorção)

Etapa	Atividade total (U)	Proteína (mg)	Atividade Específica (U/mg)	Atividade Recuperada (%)	Fator de Purificação
Lipase bruta injetada (5 mL)	34,90	19,73	1,77	100	1
Cromatografia Butyl Sepharose	23,74	0,344	69,01	68,02	38,99

Para determinar o grau de purificação da lipase atingido no FPLC equipado com coluna de Butyl Sepharose, as frações obtidas numa rodada injetando um volume significativo de caldo bruto (60 mL), cujos resultados são apresentados na Figura 5.10 e na Tabela 5.5, foram analisadas por eletroforese (Figura 5.11).

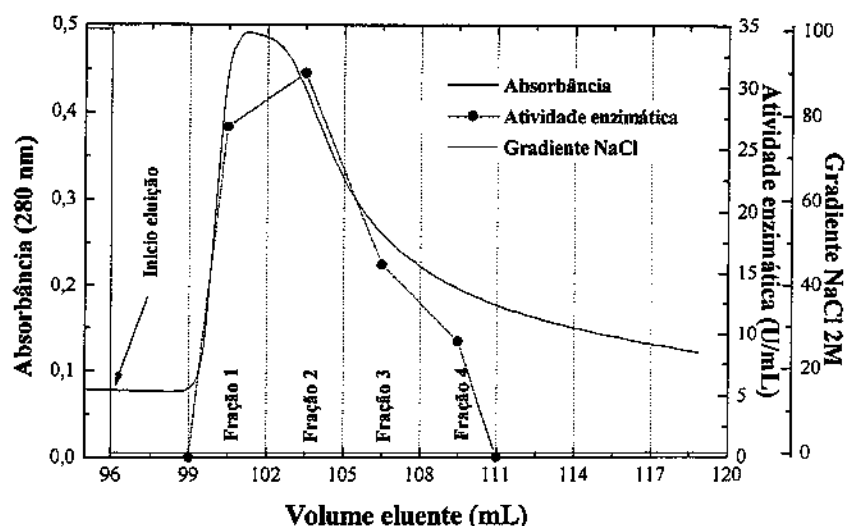


FIGURA 5.10-Lipase eluída da coluna hidrofóbica de Butyl Sepharose para análise por eletroforese (2M NaCl, pH 7, 5 mL de resina na coluna)

TABELA 5.5 - Purificação de lipase de *Geotrichum sp* usando coluna hidrofóbica de Butyl Sepharose (2M NaCl na adsorção, pH 7, 1 cm diâmetro da coluna, 5 cm altura leito de resina)

Amostra	Atividade (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)	Fator de Purificação
Lipase bruta	15,86	3,78	4,20	1
Fração 1	26,77	0,30	88,54	21,1
Fração 2	31,14	0,95	32,81	7,82
Fração 3	15,70	1,08	14,61	3,48
Fração 4	9,33	0,8	11,70	2,79

94000 Phosphorylase B

67000 Albumina

43000 Ovoalbumina

30000 Anhidrase carb.

20000 Inibidor tripsina

14000 Lactoalbumina

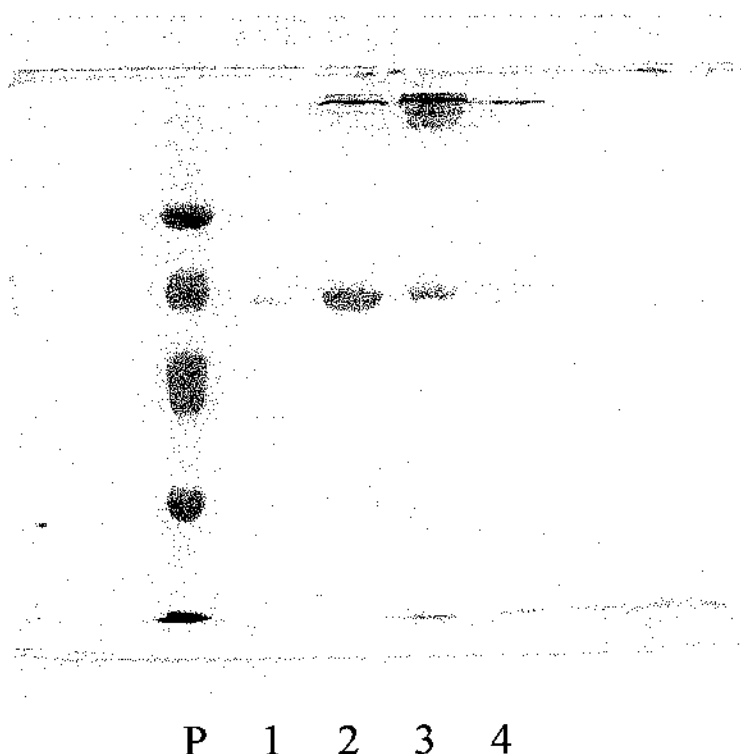


FIGURA 5.11-Eletroforese das frações coletadas na etapa de eluição durante a purificação de lipase de *Geotrichum sp.* utilizando coluna hidrofóbica de Butyl Sepharose (concentração 2M NaCl, pH 7, temperatura: 15 °C) P: padrões utilizados, 1, 2, 3, 4: frações coletadas sucessivamente.

As atividades específicas e o fator de purificação apresentados na Tabela 5.5, são um índice do elevado grau de pureza atingido na etapa de purificação com a coluna de Butyl Sepharose. Através da eletroforese pode-se ver que as diferentes frações coletadas na eluição contém lipase, que no caso do *Geotrichum sp.* tem massa molar próxima da albumina (em torno de 60 kDa). Isto é concordante com as determinações feitas por MACÊDO (1995) para lipase de *Geotrichum sp.* e por JACOBSEN *et al.* (1989a,b), BAILLARGEON & MCCARTHY (1989) e SIDEBOTTOM *et al.* (1991), para lipase de *Geotrichum candidum*.

5.1.6-Cinética de adsorção de lipase em Butyl-Sepharose

A cinética de adsorção da lipase medida em função da atividade lipolítica é apresentada na Figura 5.12. Pode-se verificar que a quantidade de enzima adsorvida pela resina aumenta com o aumento na concentração do sal. Isto pode ser explicado pelas mudanças na conformação estrutural e a diminuição da solubilidade da enzima, por efeito do sal, que resultam num reforço das interações hidrofóbicas entre a enzima e a Butyl-Sepharose (OCHOA, 1978; PORATH, 1986). Também pode-se ver que o efeito do pH na adsorção de lipase é pequeno, sendo muito similares as curvas para os valores de pH considerados (pH 6 e 7); este comportamento pode indicar que as interações hidrofóbicas são mais importantes na adsorção de lipase pela Butyl-Sepharose que as forças electrostáticas (GELUK *et al.*, 1992; GITLESEN *et al.*, 1997).

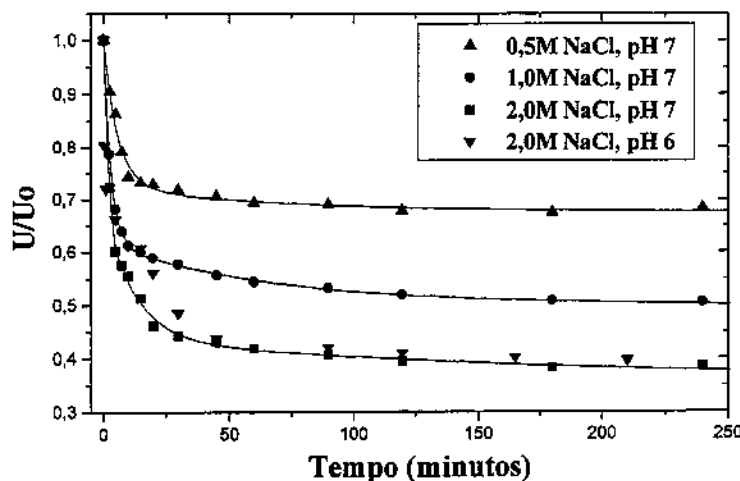


FIGURA 5.12-Cinética de adsorção de lipase em resina hidrofóbica Butyl Sepharose em função da concentração de cloreto de sódio no caldo de fermentação (Temperatura, 15 °C, agitação 120 rpm, resina/caldo bruto: 1/5)

5.1.7 -Isotermas de adsorção de lipase em Butyl-Sepharose

As isotermas de adsorção de lipase por Butyl-Sepharose para diferentes concentrações de cloreto de sódio são apresentadas na Figura 5.13, e os valores dos parâmetros cinéticos Q_m e k_d na Tabela 5.6. Pode-se notar que os parâmetros cinéticos

dependem fortemente da concentração do sal no caldo bruto a purificar. Os valores do k_d apresentam uma diminuição com o aumento do teor salino; indicando um favorecimento da cinética de adsorção, enquanto que os valores do Q_m apresentam um aumento acentuado, o que indica um aumento na capacidade máxima de retenção da Butyl-Sepharose. Dos valores obtidos para os parâmetros cinéticos, pode-se indicar que a afinidade entre a Butyl-Sepharose e a lipase de *Geotrichum sp.* é relativamente alta (k_d pequeno), na concentração 2M de cloreto de sódio, não alcançando-se um patamar bem definido nas condições utilizadas. Comportamento similar ao descrito neste trabalho para a faixa de concentração de NaCl compreendida entre 0M e 2M é indicado por KERZEL & MERSMANN (1990, 1992) para a adsorção de lipase de *Staphylococcus carnosus* sobre resina de interação hidrofóbica, utilizando sulfato de amônio como sal promotor das interações hidrofóbicas, ainda quando a força iônica das soluções de sulfato de amônio seja muito maior que nas soluções de cloreto de sódio, requerendo-se uma concentração quatro vezes maior de NaCl para ter um efeito comparável ao obtido com sulfato de amônio ou sulfato de sódio (PHARMACIA, 1993).

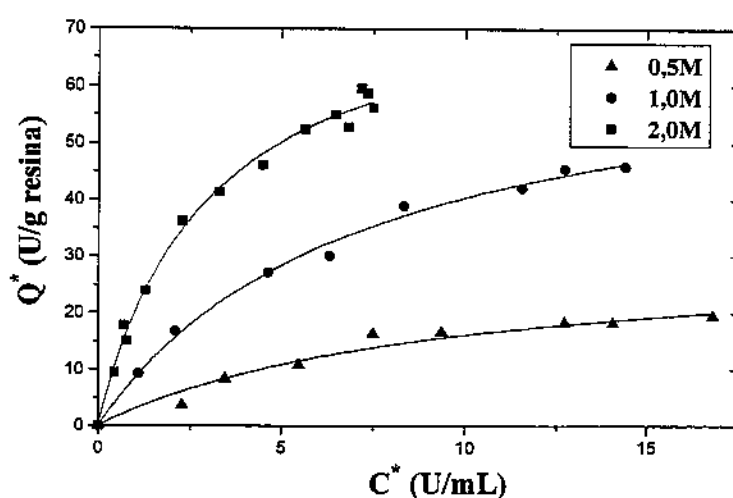


FIGURA 5.13-Isotermas de adsorção de lipase em resina hidrofóbica Butyl Sepharose em função da concentração de cloreto de sódio (Temperatura, 15 °C, agitação, 120 rpm)

TABELA 5.6. Valores dos parâmetros cinéticos para adsorção de lipase por Butyl-Sepharose em função da concentração de NaCl

Concentração NaCl (moles/litro)	Q_m (U/g. resina)	k_d (U/mL)
0,5	31,15	9,42
1,0	69,95	7,34
2,0	80,10	2,99

5.1.8-Determinação dos parâmetros cinéticos k_1 e k_2

Com o conhecimento das isotermas e a cinética de adsorção da lipase, medida como atividade lipolítica, foi possível, mediante a modelagem matemática deste processo em batelada, obter os valores dos parâmetros cinéticos intrínsecos (k_1 e k_2), para as diferentes concentrações de cloreto de sódio utilizadas, aplicando o método de Runge-Kutta de 4a. ordem para resolução numérica da equação 3.3 da modelagem matemática. Um bom ajuste entre os resultados simulados e os experimentais pode ser verificado (Figura 5.14). A Tabela 5.7 apresenta os valores obtidos para k_1 e k_2 ; o valor de k_2 foi obtido da relação $k_d = k_2 / k_1$.

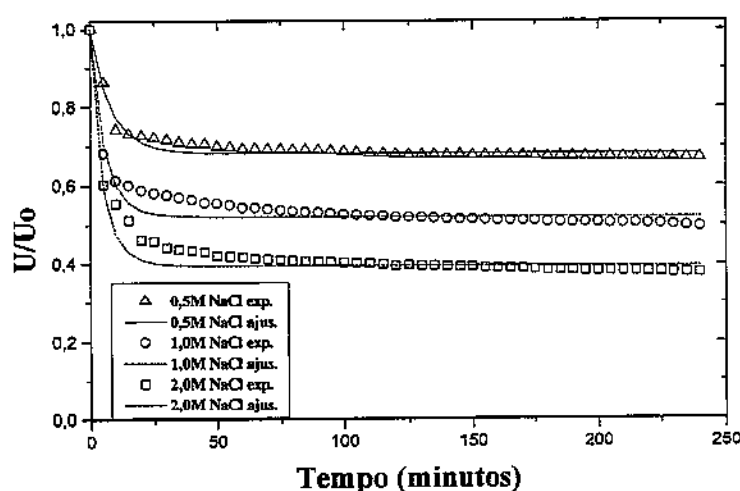
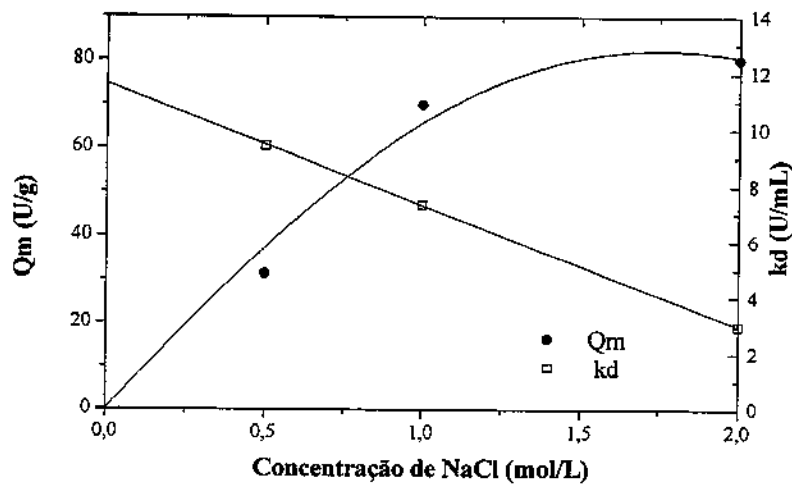


FIGURA 5.14-Simulação da adsorção de lipase em resina hidrofóbica Butyl Sepharose em tanque agitado a diferentes concentrações de NaCl (Temperatura, 15 °C; pH, 7)

TABELA 5.7-Valores dos parâmetros cinéticos intrínsecos k_1 e k_2 na adsorção de lipase por Butyl-Sepharose em função da concentração de NaCl

Concentração NaCl (moles/litro)	k_1 (mL/U-min)	k_2 (1/min)
0,5	0,00450	0,04239
1,0	0,00601	0,04411
2,0	0,00950	0,02841

A variação dos parâmetros cinéticos Q_m , k_1 e k_2 , em função da concentração de cloreto de sódio está apresentada nas Figuras 5.15 e 5.16.

FIGURA 5.15-Variação dos parâmetros cinéticos Q_m e k_d com a concentração de cloreto de sódio no caldo bruto de fermentação a purificar

Visando a simulação de um processo contínuo (CARE, “Continuous adsorption recycle extraction”) para purificação da lipase de *Geotrichum sp.*, foram obtidas equações para o cálculo dos parâmetros cinéticos, em função do teor salino, a partir dos valores indicados nas Tabelas 5.6 e 5.7. Ditas equações foram:

$$Q_m = 13,467 [\text{NaCl}] \exp \left(-0,1623 [\text{NaCl}]^2 + 1,7477 \right) \quad R^2 = 0,9596$$

$$k_1 = 0,00276 + 0,00336 [\text{NaCl}] \quad R^2 = 0,9988$$

$$k_2 = 0,04335 - \frac{0,03019[\text{NaCl}]^7}{128,13 + [\text{NaCl}]^7} \quad R^2 = 0,9869$$

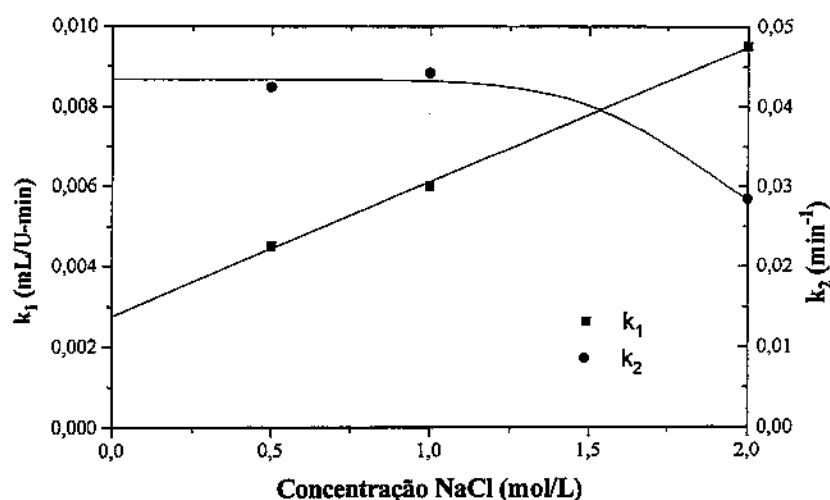


FIGURA 5.16-Variação dos parâmetros cinéticos intrínsecos k_1 e k_2 com a concentração de cloreto de sódio no caldo bruto de fermentação a purificar

5.1.9-Curvas de ruptura

As curvas de ruptura, como atividade lipolítica, para vazões na faixa de 0,2 mL/min até 1 mL/min e alturas do leito de 2,5 cm até 7,5 cm, estão apresentadas nas Figuras 5.17 (a), 5.17 (b) e 5.17 (c), e as eficiências calculadas para estas condições encontram-se na Tabela 5.8. Verifica-se que, para igual altura do leito, a adsorção é incrementada com a diminuição da vazão (velocidade superficial) de injeção da amostra; enquanto que para igual vazão (velocidade superficial) de aplicação da amostra, a adsorção aumenta com o aumento da altura do leito. Similar comportamento é relatado por WENZIG *et al.* (1993) para adsorção de lipase de *Staphylococcus aureus* em coluna empacotada com gel hidrofóbico TSK 650.

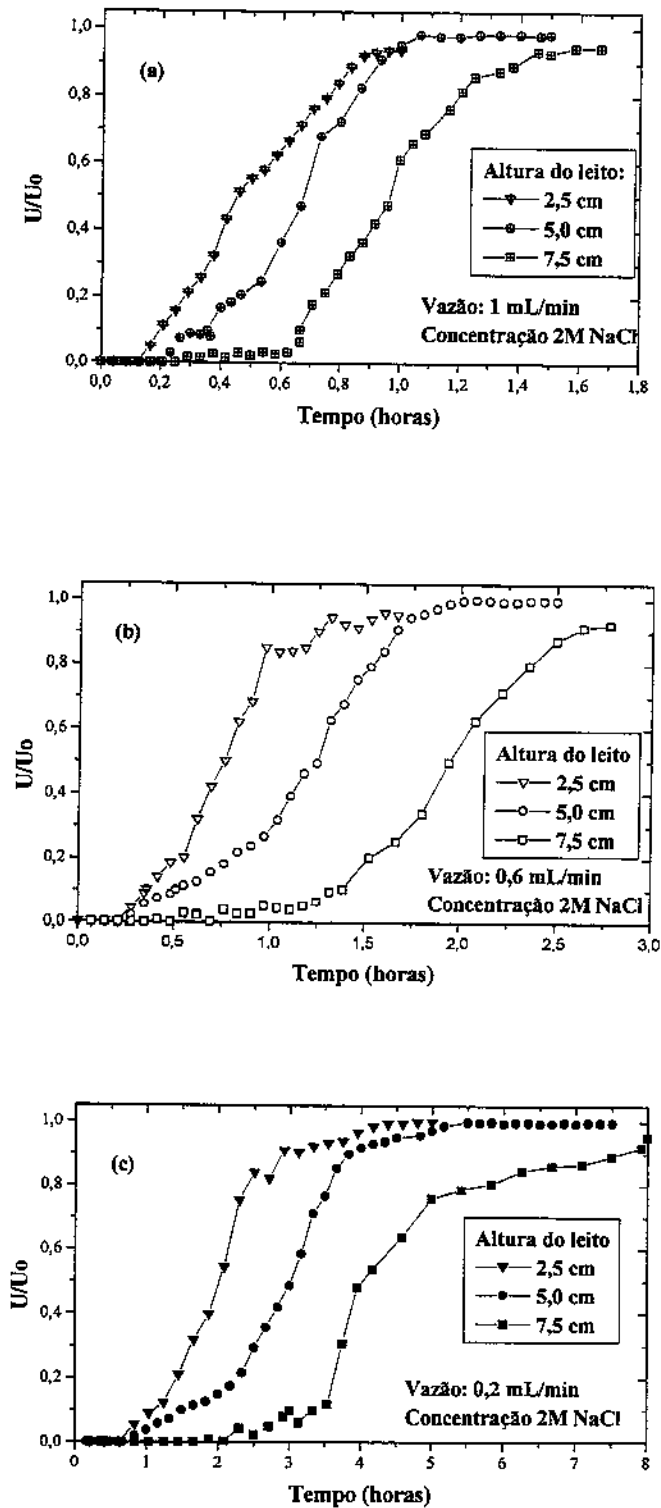


FIGURA 5.17-Curvas de ruptura do caldo de fermentação contendo lipase de *Geotrichum sp.* em função da vazão e altura do leito de resina (Concentração de cloreto de sódio 2M, diâmetro da coluna, 1 cm; pH, 7)

TABELA 5.8-Eficiência da coluna de Butyl Sepharose na recuperação de atividade lipolítica a diferentes condições de vazão (velocidade superficial) e altura do leito (Temperatura, 15 °C; pH, 7; concentração NaCl, 2M; diâmetro coluna, 1 cm)

Altura do leito (cm)	Vazão (mL/min)	Velocidade superficial (cm/min)	Eficiência (%)
2,5	0,2	0,2546	63,95
2,5	0,6	0,7639	56,85
2,5	1,0	1,2732	51,90
5,0	0,2	0,2546	68,77
5,0	0,6	0,7639	65,08
5,0	1,0	1,2732	60,69
7,5	0,2	0,2546	72,30
7,5	0,6	0,7639	70,81
7,5	1,0	1,2732	66,49

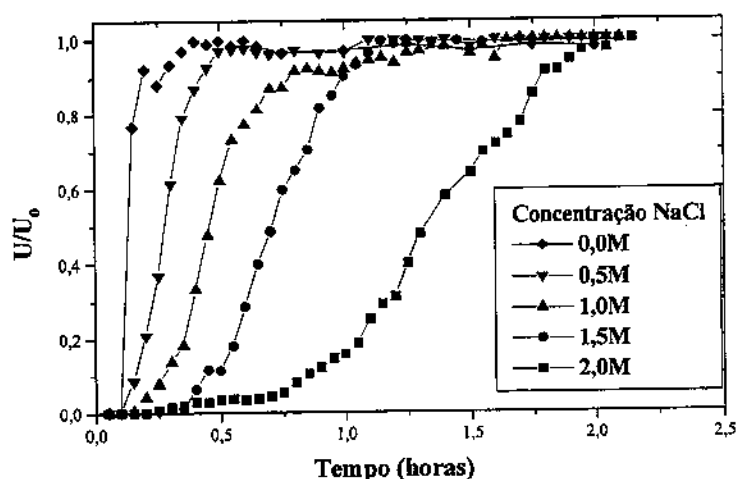


FIGURA 5.18-Curvas de ruptura do caldo de fermentação contendo lipase de *Geotrichum sp.* em função da concentração de cloreto de sódio (Altura de leito, 5 cm; vazão, 1 mL/min; diâmetro da coluna, 1 cm; pH, 7)

Na Figura 5.18 são apresentadas as curvas de ruptura para diferentes concentrações de cloreto de sódio no caldo bruto de fermentação e no tampão de adsorção, na faixa de 0M até 2M. Pode ver-se que a inclinação das curvas vai diminuindo com o aumento da concentração de cloreto de sódio, o que pode ser explicado, considerando que o

valor dos parâmetros cinéticos Q_m e k_1 se incrementam com o aumento do teor de sal, aumentando em consequência a capacidade de adsorção, atingindo-se uma eficiência de 62,24% para a concentração 2M.

5.1.10-Porosidade do leito e da resina utilizada

A determinação da porosidade do leito foi feita injetando pulsos de Dextran-Blue 0,2% (v/v) numa coluna HR5 empacotada contendo Butyl Sepharose, sendo a altura do leito de 1 cm.

Aplicando o método dos momentos e calculando as áreas dos pulsos, foi obtida a porosidade do leito a partir da inclinação da reta resultante ao graficar os primeiros momentos em função da razão [altura do leito/velocidade superficial], como mostrado na Figura 5.19. O valor obtido para a porosidade do leito foi de 0,41, sendo o coeficiente de correlação de 0,997.

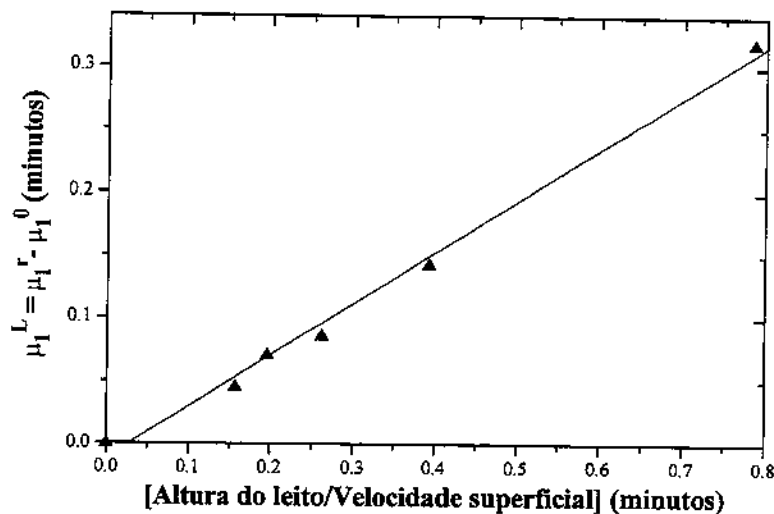


FIGURA 5.19-Determinação da porosidade do leito de resina hidrofóbica Butyl Sepharose através dos primeiros momentos versus [altura do leito/velocidade superficial]

Para a determinação da porosidade da partícula de Butyl Sepharose foram injetados pulsos de acetona 1% em coluna HR5 empacotada com a resina, sendo a altura do leito de 1 cm. Aplicando o método dos momentos e calculando as áreas dos pulsos obtidos,

foi construída a Figura 5.20, sendo 0,9734 o valor da inclinação da reta mostrada. Já que $\text{inclinação da reta} = [\varepsilon + (1 - \varepsilon) \sigma]$ e conhecendo o valor de ε , obtém-se $\sigma = 0,955$. O valor determinado para a porosidade da partícula (σ) está na faixa de porosidades indicada para partículas baseadas em agarose, de 0,94 a 0,96, segundo HORSTMANN & CHASE (1989) e próxima dos valores relatados para partículas esféricas de diâmetro similar, como Sephacryl 100, por NAKANISHI *et al.* (1977).

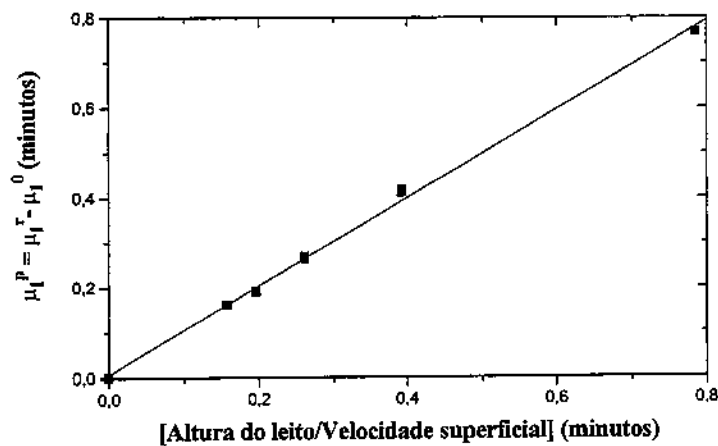


FIGURA 5.20-Determinação da porosidade da partícula de resina hidrofóbica Butyl Sepharose através dos primeiros momentos versus [altura do leito/velocidade superficial]

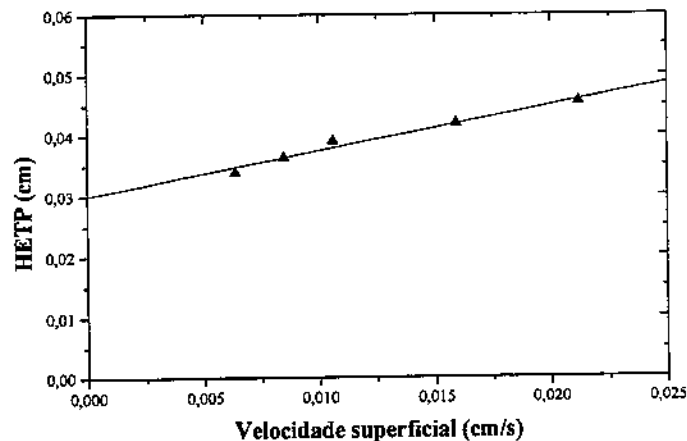


FIGURA 5.21-Relação entre HETP e Velocidade superficial para Butyl Sepharose (diâmetro da coluna, 1 cm; altura do leito, 5 cm; traçador, acetona 1%)

A determinação da altura do prato teórico (HETP), para coluna de 1 cm de diâmetro interior e 5 cm de altura do gel Butyl Sepharose, foi feita calculando os segundos momentos estatísticos dos pulsos do traçador de baixo peso molecular (acetona 1%). Os valores determinados para HETP variam ligeiramente com a velocidade superficial, na faixa de 338 μm - 450 μm , como mostrado na Figura 5.21, o que indicaria perda de eficiência na coluna trabalhando em vazões altas. Comportamento similar tem sido relatado para partículas de material como géis de Sephadex (NAKANISHI *et al.*, 1977). Os valores obtidos para HETP são baixos (de três a quatro vezes o diâmetro da partícula) podendo considerar-se que a coluna estudada apresenta boa eficiência.

5.1.11-Densidade do caldo de fermentação a diferentes concentrações de NaCl

A densidade do caldo de fermentação utilizado, a diferentes concentrações de cloreto de sódio, é apresentada na Tabela 5.9. Pode ser visto que quanto maior a concentração do sal na solução, maior é a densidade da solução enzimática.

TABELA 5.9-Densidade do caldo de fermentação contendo lipase de *Geotrichum sp* em diferentes concentrações de NaCl (Temperatura, 15 °C)

Concentração NaCl (moles/litro)	Densidade (kg/m ³)
0	1009,2
0,5	1028,2
1,0	1047,9
1,5	1067,1
2,0	1086,3

A densidade da resina hidrofóbica úmida foi de 1,09 g/mL, valor próximo da densidade do tampão utilizado para adsorção. Pode-se explicar este resultado pela grande quantidade de água presente na resina úmida, que atinge valores entre 90 e 95%. O valor obtido está próximo do indicado por DRAEGER & CHASE (1990) para partículas de Q-Sepharose (1131 kg/m³).

5.1.12-Viscosidade do caldo de fermentação a diferentes concentrações de NaCl

Os valores de viscosidade cinemática e viscosidade absoluta do caldo bruto de fermentação, a diferentes concentrações de cloreto de sódio, estão apresentados na Tabela 5.10. Pode-se ver que esta propriedade física incrementa-se ligeiramente com o aumento da concentração do sal, na faixa utilizada.

TABELA 5.10-Viscosidade cinemática e absoluta do caldo de fermentação contendo lipase de *Geotrichum sp* a diferentes concentrações de NaCl (Temperatura, 15 °C)

Concentração NaCl (moles/litro)	Viscosidade cinemática x 10 ⁶ (m ² /h)	Viscosidade absoluta x 10 ³ (kg/m h)
0	1,17	1,181
0,5	1,18	1,213
1,0	1,21	1,268
1,5	1,28	1,365
2,0	1,29	1,401

5.2-Simulação de coluna cromatográfica hidrofóbica

Com o intuito de realizar a validação dos valores obtidos para as constantes cinéticas Q_m , k_1 e k_2 nos testes em reator agitado, foram simuladas as curvas de ruptura, para diferentes concentrações de cloreto de sódio, e comparadas com as obtidas experimentalmente. Os valores dos parâmetros utilizados para a simulação encontram-se na Tabela 5.11.

Na Figura 5.22 estão representadas as curvas de ruptura para diferentes concentrações de cloreto de sódio. Pode-se observar boa concordância entre as curvas experimentais e as simuladas, o que permite ter confiança nos valores das constantes cinéticas a serem utilizadas posteriormente na simulação do processo contínuo de purificação de lipase (CARE). Em alguns dos casos, a capacidade máxima de adsorção sofreu aumento quando comparada com os valores obtidos em tanque agitado. Esta mudança pode ser explicada considerando que a capacidade dinâmica do reator de leito fixo

TABELA 5.11-Parâmetros utilizados na simulação de coluna cromatográfica hidrofóbica em diferentes concentrações de cloreto de sódio (Porosidade leito: 0,40; diâmetro coluna, 0,01 m; altura leito, 0,05 m; diâmetro partícula, 9×10^{-5} m)

Parâmetros	0M	0,5M	1,0M	1,5M	2,0M
Concentração enzima, C_0 , U/m ³	2×10^7	$2,1 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$
Capacidade resina (Q_m), U/m ³	$1,08 \times 10^7$	$3,38 \times 10^7$	$6,21 \times 10^7$	$7,51 \times 10^7$	$8,9 \times 10^7$
k_1 , m ³ /U-h	1×10^{-7}	4×10^{-7}	$4,2 \times 10^{-7}$	$4,65 \times 10^{-7}$	$5,7 \times 10^{-7}$
k_2 , h ⁻¹	2,65	2,65	2,65	2,34	1,704
Difusividade, m ² /h	$1,44 \times 10^{-7}$	$1,4 \times 10^{-7}$	$1,35 \times 10^{-7}$	$1,24 \times 10^{-7}$	$1,22 \times 10^{-7}$
Dispersão axial, m ² /h	$1,1 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-4}$
Velocidade superficial, m/h	0,764	0,764	0,764	0,764	0,764
Densidade, kg/m ³	1009,2	1028,2	1047,9	1067,1	1086,3
Viscosidade absoluta, kg/m h	4,25	4,36	4,57	4,93	5,04

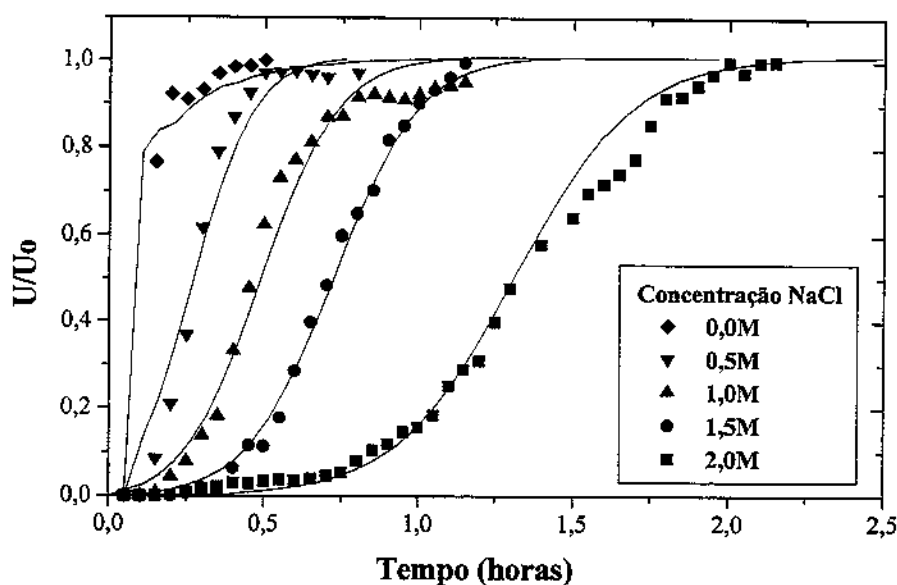


FIGURA 5.22-Curvas de ruptura em coluna cromatográfica hidrofóbica em função da concentração de cloreto de sódio (Símbolos: valores experimentais, linhas: valores simulados). Altura do leito, 5 cm; diâmetro da coluna, 1 cm; temperatura, 15 °C; pH, 7.

é maior que no caso do tanque agitado. Também pode-se ver que a capacidade máxima de adsorção vai aumentando com o aumento do teor salino utilizado, o que pode ser explicado pela maior hidrofobicidade tanto no suporte (partículas de Butyl Sepharose) como nas proteínas (lipase) presentes no caldo de fermentação injetado. Este comportamento está muito bem documentado na literatura (HOFSTEE, 1973; HJERTÉN, 1976; OCHOA, 1978; KERZEL *et al.*, 1992; WENZIG *et al.*, 1993).

Algumas simulações adicionais de curvas de ruptura foram feitas mantendo constante a concentração do sal utilizado (2M NaCl), mudando as alturas do leito de resina e a velocidade superficial, as quais são apresentadas nas Tabelas 5.12 e 5.13 e nas Figuras 5.23 e 5.24. Pode se notar um grau de ajuste satisfatório entre as curvas simuladas e as experimentais, com valores para o coeficiente de determinação (R^2) maiores que 0,9, além de uma ligeira diminuição no valor da capacidade máxima de adsorção com o aumento da velocidade superficial. A mesma fica refletida na diminuição da eficiência da coluna cromatográfica (KERZEL & MERSMANN, 1992). Para o caso da menor vazão (0,2 mL/min), correspondente a velocidade superficial de 0,153 m/h, o grau de ajuste entre as curvas simulada e experimental não foi muito bom, com valores de R^2 inferiores a 0,9, devido possivelmente a uma mudança nas características da lipase presente no caldo bruto como consequência do tempo muito prolongado do teste (entre 5 e 8 horas).

TABELA 5.12-Parâmetros utilizados na simulação de coluna cromatográfica hidrofóbica em diferentes alturas de leito e vazão constante de 1,0 mL/min (Concentração NaCl, 2M; temperatura, 15 °C; pH, 7; diâmetro coluna, 1 cm)

Parâmetros	Altura do leito de resina		
	0,025 m	0,05 m	0,075 m
Porosidade (ϵ)	0,39	0,40	0,40
Concentração enzima (Co), U/m ³	1x10 ⁷	1x10 ⁷	1x10 ⁷
Capacidade resina (Qm), U/m ³	8,3x10 ⁷	8,5x10 ⁷	8,6x10 ⁷
k ₁ , m ³ /U-h	5,7x10 ⁻⁷	5,7x10 ⁻⁷	5x10 ⁻⁷
k ₂ , h ⁻¹	1,704	1,704	1,704
Difusividade, m ² /h	1,22x10 ⁻⁷	1,22x10 ⁻⁷	1,22x10 ⁻⁷
Diâmetro partícula, m	9x10 ⁻⁵	9x10 ⁻⁵	9x10 ⁻⁵
Dispersão axial, m ² /h	1,1x10 ⁻⁴	1,1x10 ⁻⁴	1,1x10 ⁻⁴
Velocidade superficial, m/h	0,764	0,764	0,764

TABELA 5.13-Parâmetros utilizados na simulação de coluna cromatográfica hidrofóbica em diferentes alturas de leito e vazão constante de 0,6 mL/min (Concentração NaCl, 2M; temperatura, 15 °C; pH, 7; diâmetro coluna, 1 cm)

Parâmetros	Altura do leito de resina		
	0,025 m	0,05 m	0,075 m
Porosidade (ϵ)	0,38	0,39	0,39
Concentração enzima (C_0), U/m ³	1×10^7	1×10^7	1×10^7
Capacidade resina (Q_m), U/m ³	9×10^7	$9,1 \times 10^7$	$9,1 \times 10^7$
k_1 , m ³ /U-h	$5,7 \times 10^{-7}$	$5,7 \times 10^{-7}$	5×10^{-7}
k_2 , h ⁻¹	1,704	1,704	1,704
Difusividade, m ² /h	$1,22 \times 10^{-7}$	$1,22 \times 10^{-7}$	$1,22 \times 10^{-7}$
Diâmetro partícula, m	9×10^{-5}	9×10^{-5}	9×10^{-5}
Dispersão axial, m ² /h	$1,1 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^{-4}$
Velocidade superficial, m/h	0,458	0,458	0,458

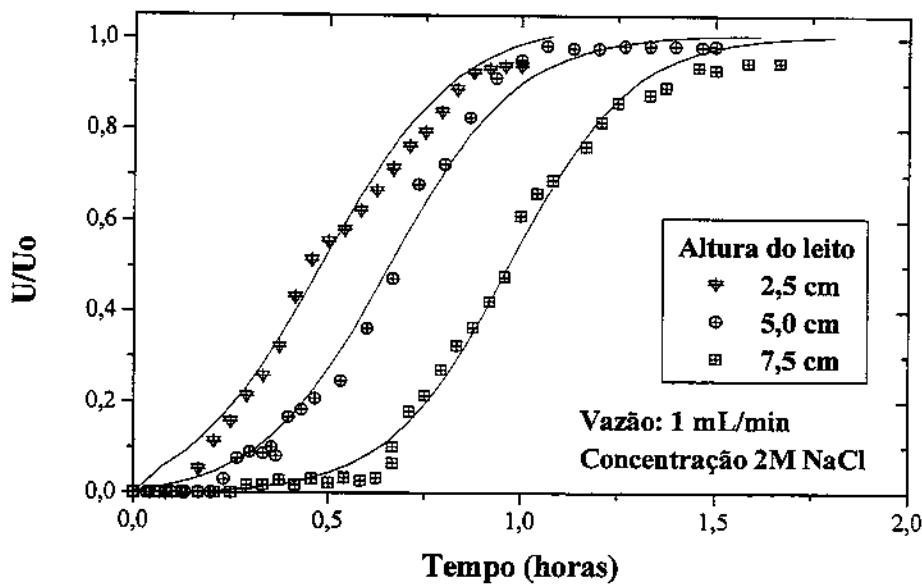


FIGURA 5.23-Curvas de ruptura em coluna cromatográfica hidrofóbica para diferentes alturas de leito e vazão constante de 1mL/min. (Símbolos: valores experimentais, linhas: valores simulados). Diâmetro coluna, 1 cm; temperatura, 15 °C; pH, 7.

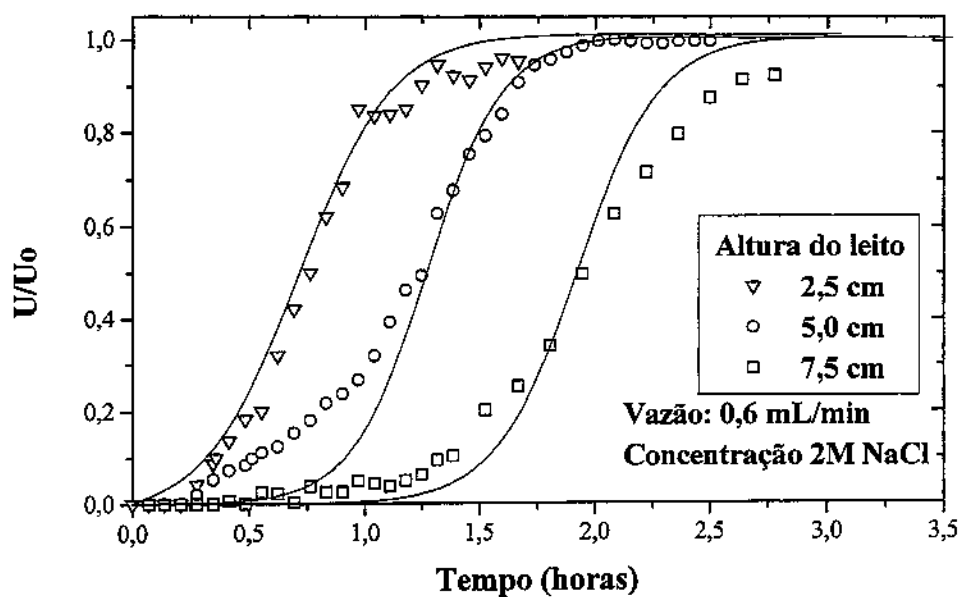


FIGURA 5.24-Curvas de ruptura em coluna cromatográfica hidrofóbica para diferentes alturas de leito e vazão constante de 0,6 mL/min (Símbolos: valores experimentais, linhas: valores simulados). Diâmetro coluna, 1 cm; temperatura, 15 °C; pH, 7.

VI-SIMULAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO CARE PARA PURIFICAÇÃO DE LIPASE

6.1- Simulação do processo CARE

A simulação do processo CARE teve por objetivo verificar o comportamento da concentração de enzima livre (lipase), dos contaminantes e do cloreto de sódio, na saída de cada estágio. Foram assumidos valores para os tempos de residência hidráulico em cada estágio, como também para o tempo de residência de sólidos, calculando-se os valores das variáveis resposta como rendimento (%), fator de purificação e fator de concentração.

Para a simulação foram escolhidos valores arbitrários, mas relacionados com os testes em tanque agitado efetuados no laboratório; estes valores estão apresentados na Tabela 6.1. A escolha do tempo de residência de sólidos (T_{aus}) foi feita com base nas recomendações de BARBOZA (1998), que indica que o tempo de residência de sólidos deve ser superior ao maior tempo hidráulico (T_{auh1}); o valor para o tempo hidráulico de sólidos foi o mesmo em cada um dos três estágios do sistema (adsorção, lavagem e dessorção), considerando que os três reatores apresentam o mesmo volume.

TABELA 6.1-Valores utilizados na simulação do processo CARE para purificação de lipase de *Geotrichum sp.* a partir de caldo bruto de fermentação

Concentração de enzima na alimentação (C_o), U/litro	2×10^4
Tempo hidráulico no primeiro estágio (T_{auh1}), horas	1,0
Tempo hidráulico no segundo estágio (T_{auh2}), horas	0,5
Tempo hidráulico no terceiro estágio (T_{auh3}), horas	0,4
Tempo hidráulico de sólidos (T_{aus}), horas	2,0
ε (fração líquida)	0,85
Concentração de contaminantes (g/litro)	4,0
Concentração NaCl na alimentação e lavagem (moles/litro)	2,0

Os valores de operação calculados a partir dos dados de entrada da Tabela 6.1, estão apresentados na Tabela 6.2, na qual estão incluídos também os valores do rendimento (%), fator de purificação e fator de concentração correspondentes.

TABELA 6.2-Valores de operação obtidos por simulação do processo CARE para purificação de lipase de *Geotrichum sp.* a partir de caldo bruto de fermentação

Vazão no primeiro estágio (F1), litro/hora	0,5
Vazão no segundo estágio (F2), litro/hora	1,5
Vazão no terceiro estágio (F3), litro/hora	2,0
Fração de reciclo (Fr), litro/hora	0,588
Rendimento (%)	34
Fator de purificação	3,31
Fator de concentração	0,09

Os perfis de concentração de lipase livre em cada estágio podem ser observados na Figura 6.1. Pode verificar-se que o equilíbrio é atingido num tempo aproximado de 10 horas. Para o caso estudado, o rendimento (%) foi relativamente elevado, ainda que o fator de purificação e o fator de concentração foram baixos. Este comportamento pode ser devido a conformação própria do sistema de três estágios, que precisa de um grande volume de tampão para a eluição da lipase adsorvida na resina.

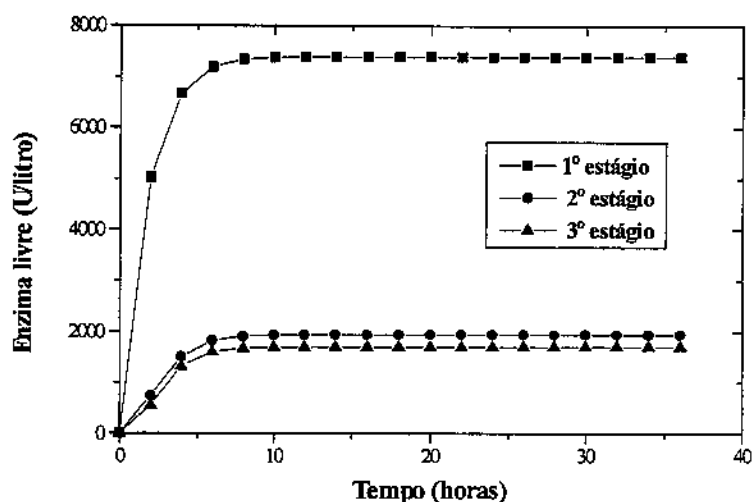


Figura 6.1-Perfil de concentração de lipase na saída de cada estágio

O fator de purificação é um outro parâmetro importante para a análise do processo, que está em função da concentração inicial de contaminantes na alimentação ao primeiro estágio e na saída do terceiro estágio. Para o caso estudado obteve-se um fator de purificação de 3,31 vezes, valor menor ao obtido na purificação de lipase em coluna cromatográfica hidrofóbica, que foi de 39 vezes. O perfil da concentração de contaminantes durante o processo, até atingir o regime permanente, está representado na Figura 6.2.

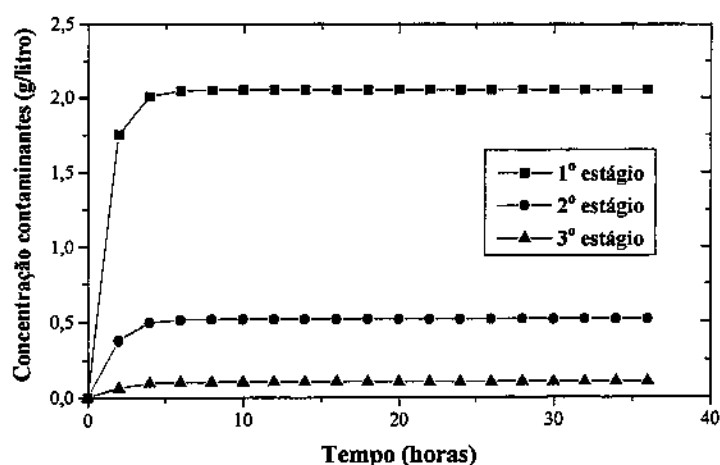


Figura 6.2-Perfil de contaminantes na saída de cada estágio

Na Figura 6.3 são apresentados os perfis da concentração de cloreto de sódio em cada estágio do sistema CARE. Como pode ser observado, a concentração de cloreto de sódio no primeiro estágio está próxima de 1,2 M, mesmo não sendo a concentração ótima, permite a adsorção de lipase sobre a resina hidrofóbica. No 2º estágio, onde ocorre a lavagem, a concentração do sal é mais elevada, o que garante que a lipase continue ligada a resina, permitindo a eliminação dos contaminantes. Já no terceiro estágio, a concentração de cloreto de sódio é baixa, devido ao ingresso de tampão sem sal, conseguindo-se eluir a enzima adsorvida na resina.

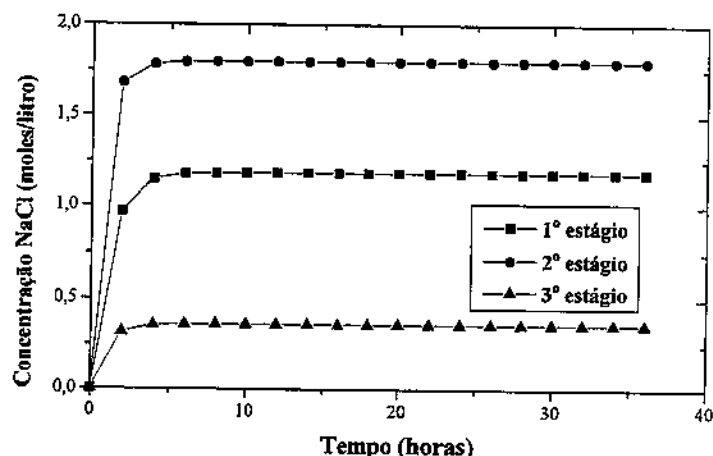


Figura 6.3-Perfil da concentração de cloreto de sódio em cada estágio

A enzima adsorvida na resina hidrofóbica, nos diferentes estágios do sistema CARE, está representada na Figura 6.4. Verifica-se que nos dois primeiros estágios a quantidade de enzima adsorvida na resina é elevada, devido aos altos teores de cloreto de sódio, enquanto que no estágio de dessorção a maior parte da lipase é eluída do suporte, mas não totalmente, devido a presença de sal em baixa concentração. Este comportamento vai diminuir o aproveitamento da capacidade total da resina no estágio de adsorção, originando em consequência uma diminuição no rendimento.

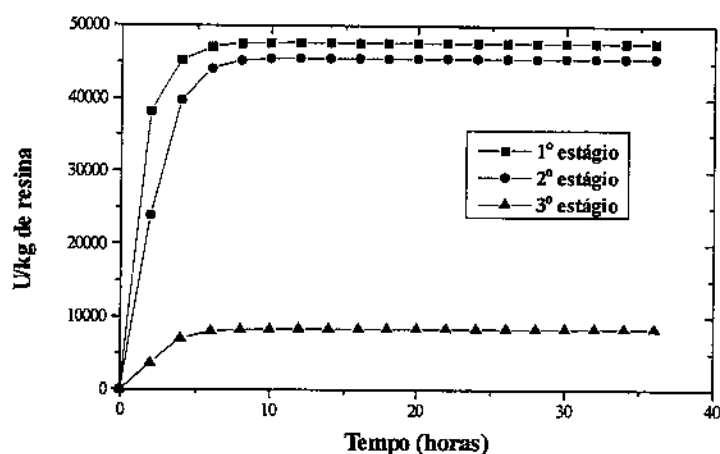


Figura 6.4-Perfil da enzima adsorvida à resina em cada estágio

O comportamento das constantes cinéticas (k_1 , k_2 e Q_m) ao longo do processo é apresentado nas Figuras 6.5, 6.6 e 6.7. Já que estas constantes são fortemente dependentes da concentração de cloreto de sódio, observa-se que no primeiro e segundo estágios do processo, com alta concentração de sal, os valores de k_1 e Q_m são maiores que no terceiro estágio, sendo menor o valor do k_2 , indicando um favorecimento da adsorção de lipase nestes dois estágios. No terceiro estágio do processo o comportamento destas constantes é inverso ao apresentado nos dois primeiros, permitindo a eluição e recuperação da lipase na corrente de saída.

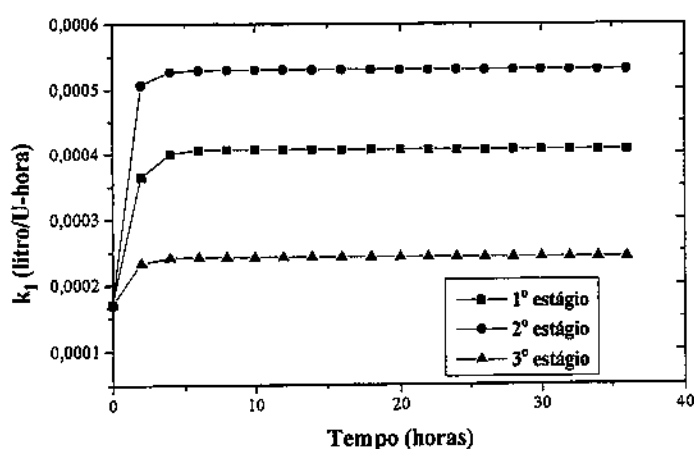


Figura 6.5-Variação do comportamento da constante k_1 durante a purificação de lipase utilizando o processo CARE

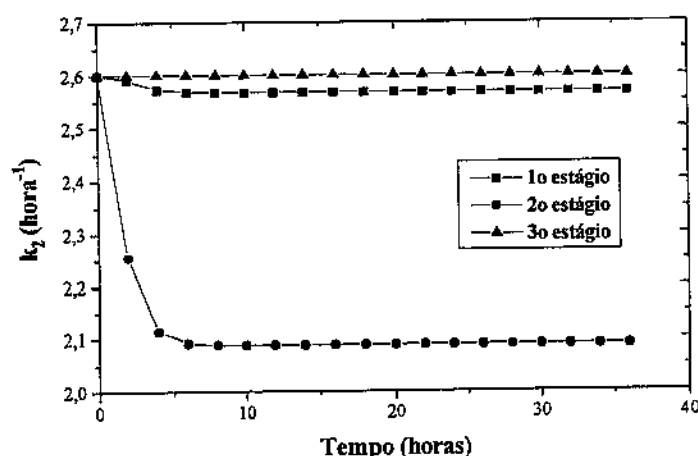


Figura 6.6-Variação do comportamento da constante k_2 durante a purificação de lipase utilizando o processo CARE

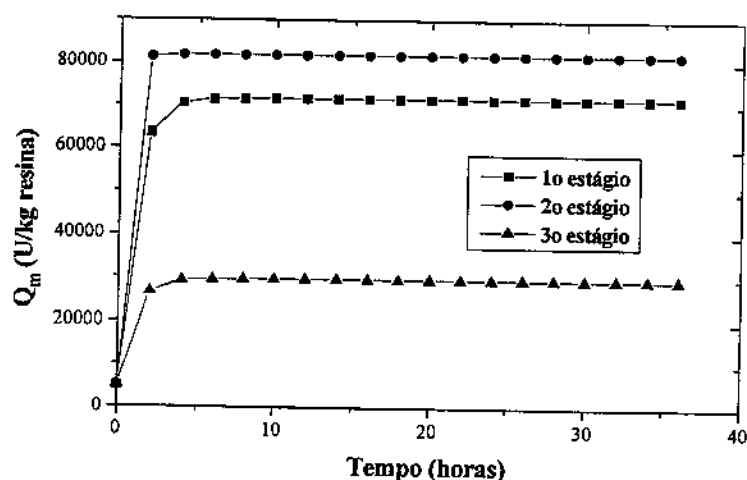


Figura 6.7-Variação do comportamento da capacidade máxima de adsorção Q_m durante a purificação de lipase utilizando o processo CARE

A partir dos resultados obtidos na etapa de simulação e análise do processo, e visando obter maior rendimento, como também um produto com maior grau de purificação, foram estudadas outras faixas para as variáveis do processo CARE, as que estão incluídas na etapa de planejamento e otimização.

6.2-Otimização do processo CARE para purificação de lipase

Nesta etapa foi estudada a influência das seis variáveis do processo: tempos de residência hidráulica em cada estágio (τ_{uh1} , τ_{uh2} , τ_{uh3}), tempo de residência de sólidos (τ_{aus}), fração líquida (ϵ) e concentração inicial de enzima no caldo de fermentação (C_0). O valor das variáveis consideradas reflete diretamente nas respostas obtidas na simulação do processo, tais como rendimento (%), fator de purificação (FP) e fator de concentração (FC). Os tempos hidráulicos mencionados estão relacionados com as vazões de alimentação de cada estágio (F_1 , F_2 , F_3) e a vazão de reciclo, segundo as equações 3.95, 3.96 e 3.97, indicadas no Capítulo III.

O processo CARE foi otimizado utilizando a técnica de planejamento experimental e análise de superfície de resposta, obtendo-se faixas que permitem maximizar as respostas rendimento (%), fator de purificação e fator de concentração, dentro das limitações cinéticas do estudo de purificação de lipase por adsorção sobre resina hidrofóbica Butyl Sepharose.

Um procedimento similar ao apresentado por RODRIGUES (1992) e BARBOZA (1998), foi utilizado nesta etapa do trabalho. Foram estudadas seis variáveis indicadas na Tabela 6.3, na qual estão incluídos os níveis de cada uma delas, através de um planejamento fracionário de 2 níveis (2^{k-2}).

Tabela 6.3-Níveis das variáveis consideradas para o planejamento fatorial fracionário

Variável	Níveis		
	-1	0	+1
Tauh1 (horas)	2,0	3,0	4,0
Tauh2 (horas)	0,1	0,6	1,1
Tauh3 (horas)	0,1	0,6	1,1
Taus (horas)	6	8	10
ϵ (fração líquida)	0,80	0,85	0,9
Co (U/litro)	1×10^4	$1,5 \times 10^4$	2×10^4

Os 16 ensaios correspondentes ao planejamento fatorial fracionário, para as 6 variáveis consideradas, estão mostrados na Tabela 6.4, junto com os valores obtidos, por simulação, para as respostas (rendimento, fator de purificação e fator de concentração). Os efeitos das variáveis independentes sobre as variáveis resposta estão apresentados na Figura 6.8. A análise estatística realizada indicou que o efeito da concentração de enzima nos níveis considerados não foi significativa, de forma que para o planejamento fatorial

completo, foi utilizada uma concentração média correspondente ao valor do ponto central ($1,5 \times 10^4$ U/litro). Para o caso da variável ε (fração líquida), ainda que ela resultou significativa estatisticamente, por ser seu efeito negativo para as três variáveis resposta quando passamos do nível (-1) ao nível (+1), ela foi mantida fixa no valor de 0,8, correspondente ao nível (-1), para o planejamento seguinte. Todas as outras variáveis independentes apresentaram efeitos significativos e, em alguns casos, contrários sobre as variáveis resposta, sendo consideradas para o experimento fatorial completo.

Tabela 6.4- Matriz do planejamento fatorial fracionário para otimização do processo CARE para purificação de lipase

	TAUH1	TAUH2	TAUH3	TAUS	ε	C0	REND	FP	FC
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	8,75	15,81	0,003
2	1	-1	-1	-1	-1	1	10,99	9,95	0,001
3	-1	1	-1	-1	1	1	15,25	2,53	0,005
4	1	1	-1	-1	1	-1	32,12	2,66	0,003
5	-1	-1	1	-1	1	1	2,82	6,21	0,013
6	1	-1	1	-1	1	-1	5,70	6,27	0,010
7	-1	1	1	-1	-1	-1	28,32	5,55	0,127
8	1	1	1	-1	-1	1	41,70	4,05	0,047
9	-1	-1	-1	1	1	-1	1,73	8,89	0,001
10	1	-1	-1	1	1	1	2,59	6,55	0,001
11	-1	1	-1	1	-1	1	12,70	5,83	0,005
12	1	1	-1	1	-1	-1	28,21	6,48	0,004
13	-1	-1	1	1	-1	1	2,83	15,87	0,014
14	1	-1	1	1	-1	-1	6,07	17,04	0,011
15	-1	1	1	1	1	-1	7,80	3,97	0,038
16	1	1	1	1	1	1	12,36	3,13	0,023

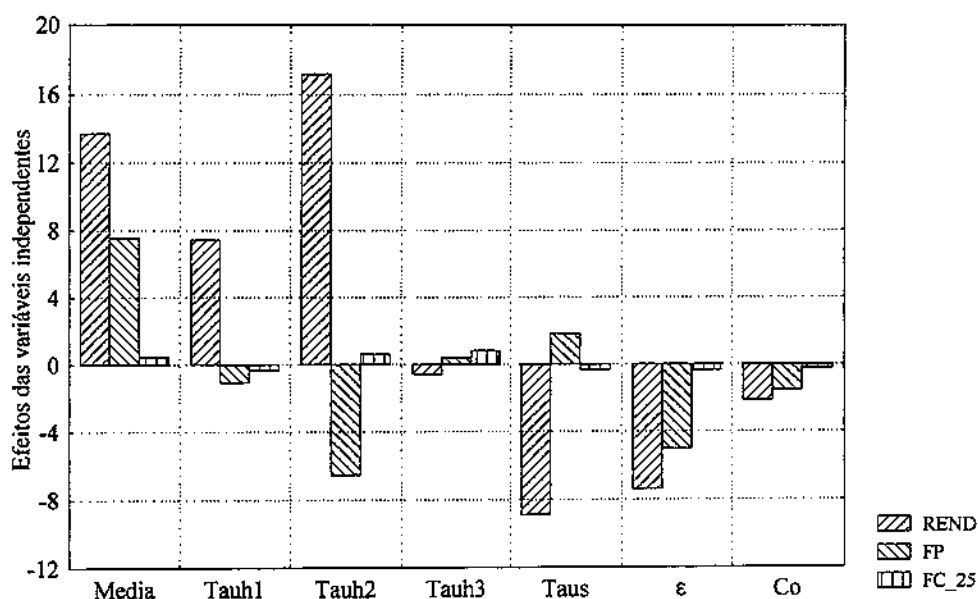


Figura 6.8-Efeitos das variáveis independentes sobre as variáveis resposta obtidos pelo planejamento fatorial fracionário

Na Tabela 6.5 encontram-se os níveis das variáveis independentes consideradas no planejamento fatorial completo.

Tabela 6.5-Níveis das variáveis consideradas para o planejamento fatorial completo

Variável	Níveis				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Tauh1 (horas)	3,0	3,50	4,0	4,5	5,0
Tauh2 (horas)	0,1	0,35	0,6	0,85	1,1
Tauh3 (horas)	0,1	0,35	0,6	0,85	1,1
Taus (horas)	6	7	8	9	10

$\pm\alpha = \pm 2$

Os 25 ensaios correspondentes ao planejamento fatorial completo que fornece um modelo quadrático, para as 4 variáveis consideradas, estão apresentados na Tabela 6.6 junto com os valores obtidos, por simulação, para as respostas rendimento (%), fator de purificação (FP) e fator de concentração (FC), incluindo-se também os valores da resposta otimizada (RO) definida como o produto das três variáveis resposta obtidas na simulação (rendimento (%)*fator de purificação*fator de concentração).

Tabela 6.6- Matriz de planejamento para a otimização do processo CARE para purificação de lipase

	TAUH1	TAUH2	TAUH3	TAUS	REND (%)	FP	FC	RO
1	-1	-1	-1	-1	18,68	7,85	0,010	1,44
2	1	-1	-1	-1	21,51	7,03	0,006	0,95
3	-1	1	-1	-1	31,02	5,36	0,016	2,71
4	1	1	-1	-1	36,35	4,88	0,011	1,88
5	-1	-1	1	-1	17,79	8,08	0,025	3,54
6	1	-1	1	-1	20,68	7,29	0,016	2,40
7	-1	1	1	-1	29,72	5,53	0,041	6,76
8	1	1	1	-1	35,14	5,07	0,027	4,81
9	-1	-1	-1	1	13,52	9,29	0,009	1,08
10	1	-1	-1	1	15,95	8,53	0,006	0,88
11	-1	1	-1	1	22,90	6,48	0,015	2,17
12	1	1	-1	1	27,37	6,02	0,011	1,83
13	-1	-1	1	1	12,95	9,44	0,021	2,59
14	1	-1	1	1	15,36	8,71	0,016	2,14
15	-1	1	1	1	21,99	6,59	0,036	5,22
16	1	1	1	1	26,44	6,16	0,028	4,50
17	0	0	0	0	23,43	6,74	0,019	3,00
18	-2	0	0	0	19,03	7,30	0,026	3,57
19	2	0	0	0	26,88	6,18	0,013	2,18
20	0	-2	0	0	7,82	13,52	0,006	0,67
21	0	2	0	0	32,72	5,12	0,027	4,44
22	0	0	-2	0	24,33	6,57	0,003	0,49
23	0	0	2	0	22,44	6,90	0,036	5,54
24	0	0	0	-2	32,48	5,38	0,018	3,15
25	0	0	0	2	17,72	7,84	0,017	2,36

Na Figura 6.9 estão representados os efeitos das quatro variáveis resposta, considerando somente os primeiros 16 ensaios da Tabela 6.4 que correspondem ao planejamento de primeira ordem (linear).

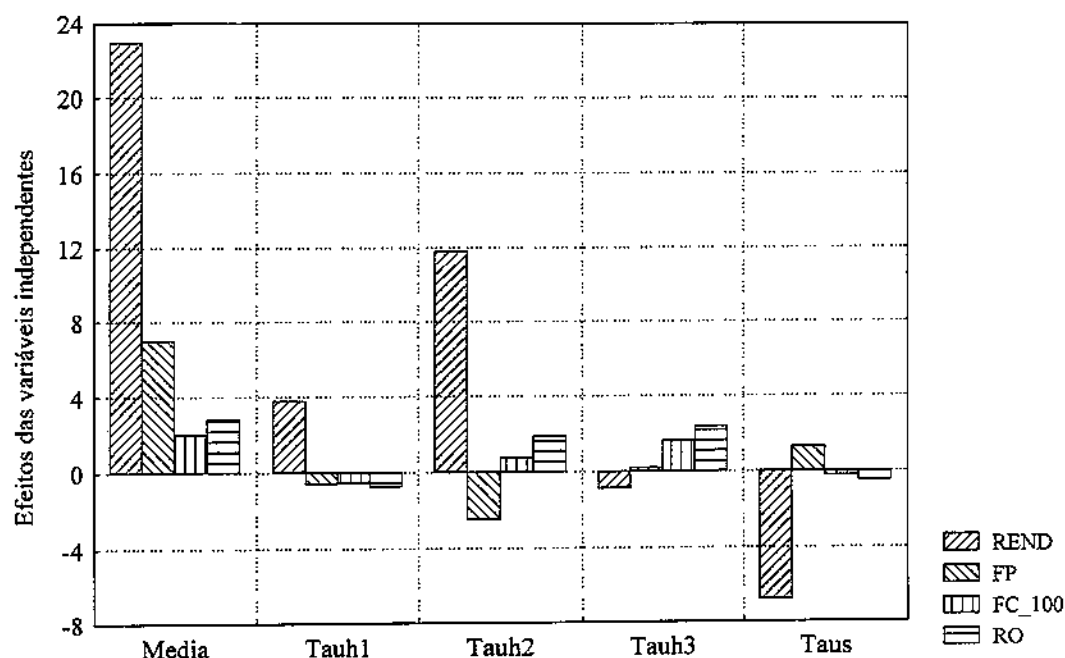


Figura 6.9-Efeitos das variáveis independentes sobre as variáveis resposta obtidos pelo planejamento fatorial de primeira ordem

Pode observar-se na Figura 6.9 que todos os tempos hidráulicos considerados como variáveis independentes no planejamento fatorial completo têm efeito significativo nas variáveis resposta, sendo estes efeitos contrários em alguns casos.

6.2.1-Resultados obtidos para o rendimento (%)

A análise dos efeitos indicou que as variáveis Tauh2 e Taus são as que têm a maior influência sobre a resposta rendimento (%), sendo menor a influência das variáveis Tauh1 e Tauh3

Um modelo completo de 2ª ordem foi ajustado a partir dos dados obtidos das simulações de 1 a 25, da Tabela 6.6. Na equação 6.1, apresenta-se o modelo quadrático contendo os coeficientes de regressão significativos.

$$\begin{aligned} \text{REND} = & 24,03 + 7,4 \text{ Tauh1} + 47,07 \text{ Tauh2} - 3,52 \text{ Tauh3} - 7,2 \text{ Taus} - 0,45 \text{ Tauh1}^2 - \\ & 12,55 \text{ Tauh2}^2 + 0,423 \text{ Taus}^2 + 4,56 \text{ Tauh1} * \text{Tauh2} - 0,34 \text{ Tauh1} * \text{Taus} - \\ & 3,16 \text{ Tauh2} * \text{Taus} \end{aligned} \quad (6.1)$$

A análise de variância do modelo de 2ª ordem encontra-se na Tabela 6.7. Pode-se ver que o modelo apresentou um valor muito superior no teste F, ao valor tabelado, indicando que os ensaios são bem representados por este modelo, com $R^2=0,9992$

Tabela 6.7-Análise de variância para ajuste do modelo de 2ª ordem para o rendimento (%)

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	1294,03	14 (p - 1)	92,43	850,32	2,87
Resíduos	1,087	10 (n - p)	0,1087		
Falta de ajuste	1,087	10 (m - p)	0,1087		
Total	1295,12	24			

Nas Figuras 6.10 a 6.13 apresentam-se as superfícies de resposta geradas para a variável rendimento (%) pelo modelo de 2ª ordem, com auxílio do software Statística 5.0, em função das variáveis independentes que têm maior efeito entre as consideradas.

Verificou-se através destas superfícies de resposta que os principais efeitos ocorrem quando se associam as variáveis Tauh2 e Taus, entre elas ou com as outras variáveis consideradas. Na Figura 6.10 pode-se ver que o rendimento (%) aumenta quando o Tauh1 aumenta de 3,0 horas a 5,0 horas e nas Figuras 6.10, 6.11 e 6.12 observa-se que o efeito do Tauh3 na resposta rendimento (%) é pequena quando comparado com o efeito das outras 3 variáveis independentes. Na Figura 6.13 pode-se ver que a faixa de operação que permite obter rendimento otimizado corresponde a Tauh2 entre 1,0 hora e 1,1 horas e Taus em torno de 6 horas, mantendo-se Tauh1 em 5,0 horas e Tauh3 na faixa compreendida entre 0,1 horas e 0,6 horas.

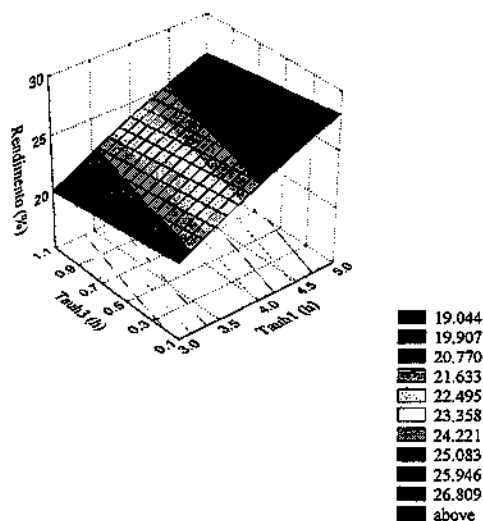


Figura 6.10-Superfície de resposta para rendimento em função de τ_{uh1} e τ_{uh3} ($\tau_{uh2} = 0,6$ h, $\tau_{aus} = 8$ h)

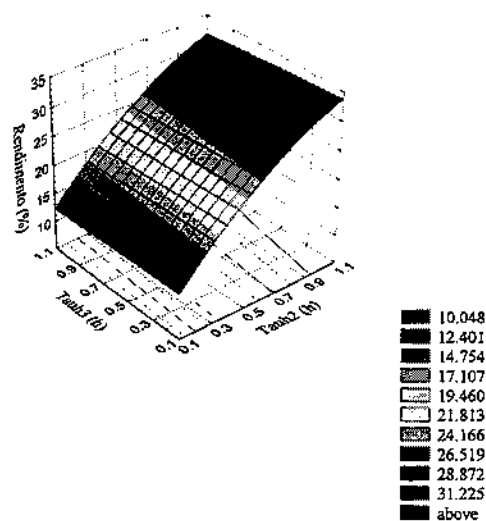


Figura 6.11-Superfície de resposta para rendimento em função de τ_{uh2} e τ_{uh3} ($\tau_{uh1} = 4$ h, $\tau_{aus} = 8$ h)

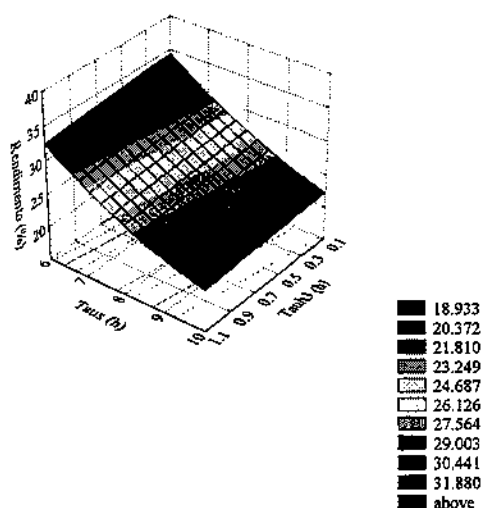


Figura 6.12-Superfície de resposta para rendimento em função de τ_{uh3} e τ_{aus} ($\tau_{uh1} = 4$ h, $\tau_{uh2} = 0,6$ h)

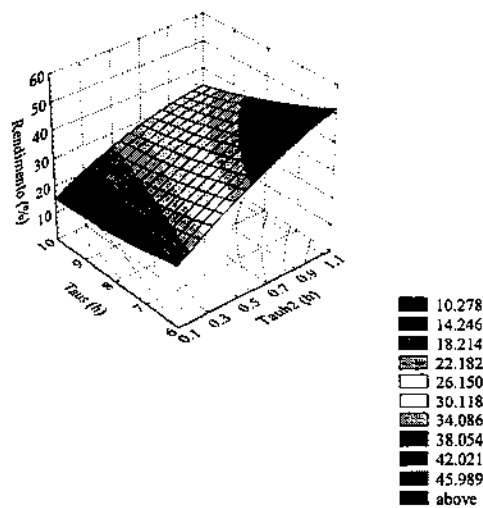


Figura 6.13-Superfície de resposta para rendimento em função de τ_{uh2} e τ_{aus} ($\tau_{uh1} = 5,0$ h, $\tau_{uh3} = 0,6$ h)

6.2.2-Resultados obtidos para o fator de purificação (FP)

Na Figura 6.9 pode-se observar que as variáveis com maior efeito sobre a resposta fator de purificação (FP) são Tauh2 e Taus, enquanto que o efeito das outras variáveis independentes é bastante menor.

O modelo de 2ª ordem obtido a partir dos dados da Tabela 6.6 é apresentado na equação 6.2. Este modelo quadrático ajustou-se bem a os valores de FP obtidos na simulação, sendo o valor de $R^2 = 0,9477$.

$$\begin{aligned} FP = & 1,87 + 0,59 \text{ Tauh1} - 17,27 \text{ Tauh2} + 1,88 \text{ Tauh3} + 2,18 \text{ Taus} - 0,22 \text{ Tauh1}^2 + \\ & 9,44 \text{ Tauh2}^2 - 0,088 \text{ Taus}^2 + 0,64 \text{ Tauh1} * \text{Tauh2} + 0,021 \text{ Tauh1} * \text{Taus} - \\ & 0,33 \text{ Tauh2} * \text{Taus} - 0,068 \text{ Tauh3} * \text{Taus} \end{aligned} \quad (6.2)$$

A análise de variância do modelo de 2ª ordem encontra-se na Tabela 6.8. Pode-se ver que o modelo apresentou um valor muito superior no teste F, ao valor tabelado, indicando que os ensaios são bem representados por este modelo

Tabela 6.8-Análise de variância para ajuste do modelo de 2ª ordem para o FP

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	79,31	14 (p - 1)	5,66	12,96	2,87
Resíduos	4,37	10 (n - p)	0,437		
Falta de ajuste	4,37	10 (m - p)	0,437		
Total	83,68	24			

As superfícies geradas com o modelo de 2ª ordem são apresentadas nas Figuras 6.14 a 6.17. Na Figura 6.14 pode-se ver que o efeito das variáveis Tauh1 e Tauh3, sobre o fator de purificação, é pequeno. Nas figuras 6.15, 6.16 e 6.17 pode ser verificada a forte influência das variáveis Tauh2 e Taus, sobre o fator de purificação, sendo obtidos os maiores valores para esta resposta a valores baixos de Tauh2 (0,1 horas - 0,2 horas) e valores elevados da variável Taus, na faixa de 9 horas a 10 horas. Este comportamento é inverso ao observado para o caso da resposta rendimento (%).

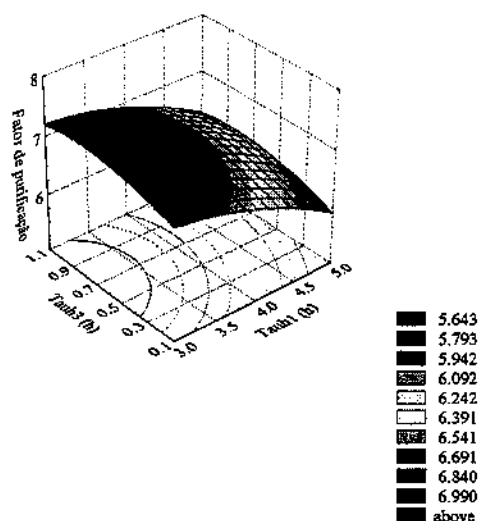


Figura 6.14-Superfície de resposta para Fator de purificação em função de τ_{h1} e τ_{h3} ($\tau_{h2} = 0,6$ h, $\tau_{aus} = 8$ h)

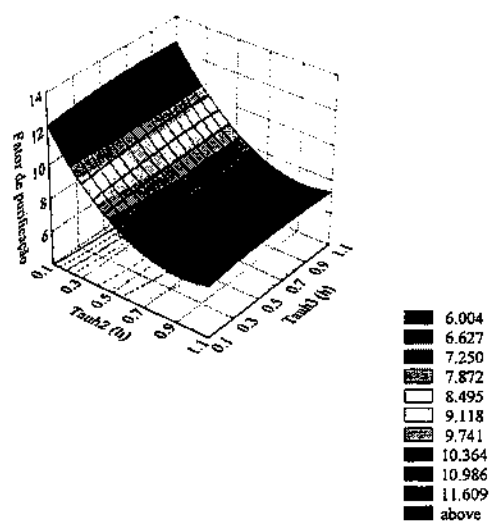


Figura 6.15-Superfície de resposta para Fator de purificação em função de τ_{h2} e τ_{h3} ($\tau_{h1} = 4$ h, $\tau_{aus} = 8$ h)

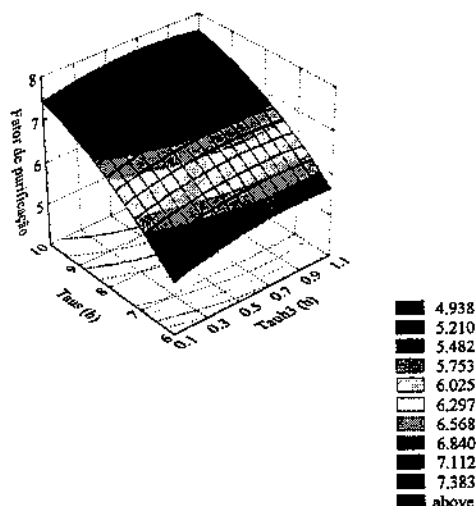


Figura 6.16-Superfície de resposta para Fator de purificação em função de τ_{h3} e τ_{aus} ($\tau_{h1} = 4$ h, $\tau_{h2} = 0,6$ h)

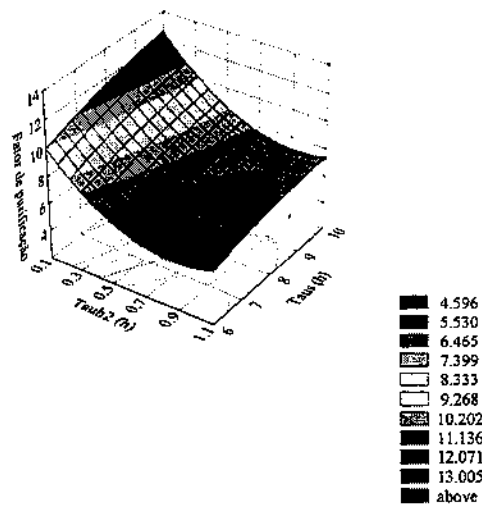


Figura 6.17-Superfície de resposta para Fator de purificação em função de τ_{h2} e τ_{aus} ($\tau_{h1} = 3$ h, $\tau_{h3} = 0,6$ h)

6.2.3-Resultados obtidos para a resposta otimizada (RO)

Os efeitos das variáveis independentes sobre a resposta otimizada (RO) estão apresentados graficamente na Figura 6.9.

A análise dos efeitos feita pelo planejamento fatorial, indicou que todas as variáveis independentes têm efeito significativo na resposta otimizada, mas este efeito é maior no caso de Tauh2 e Tauh3. O efeito do Tauh3 sobre a variável RO pode ser devido a influência que ele tem sobre o fator de concentração, já que a RO foi definida como o produto do rendimento (%), fator de purificação e fator de concentração.

O modelo de 2ª ordem para o caso da RO está representado pela equação 6.3.

$$\begin{aligned} RO = & 1,137 - 1,26 \text{ Tauh1} + 6,75 \text{ Tauh2} + 9,77 \text{ Tauh3} - 0,18 \text{ Taus} - 0,12 \text{ Tauh1}^2 - \\ & 1,77 \text{ Tauh2}^2 + 0,061 \text{ Taus}^2 - 0,78 \text{ Tauh1} * \text{Tauh2} - 1,2 \text{ Tauh1} * \text{Tauh3} + \\ & 0,34 \text{ Tauh1} * \text{Taus} + 6,38 \text{ Tauh2} * \text{Tauh3} - 0,2 \text{ Tauh2} * \text{Taus} - 0,51 \text{ Tauh3} * \text{Taus} \end{aligned} \quad (6.3)$$

Na Tabela 6.9 encontra-se a análise de variância do modelo de 2ª ordem. Pode-se ver que o modelo apresentou um valor muito superior no teste F, ao valor tabelado, indicando que os ensaios são bem representados por este modelo, com $R^2 = 0,997$

Tabela 6.9-Análise de variância para ajuste do modelo de 2ª ordem para RO

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	64,885	14 (p - 1)	4,635	215,57	2,87
Resíduos	0,215	10 (n - p)	0,0215		
Falta de ajuste	0,215	10 (m - p)	0,0215		
Total	65,10	24			

A seguir, são apresentadas as Figuras 6.18 a 6.21 geradas com o modelo de 2ª ordem, que representam a influência das variáveis consideradas, na variável resposta otimizada (RO).

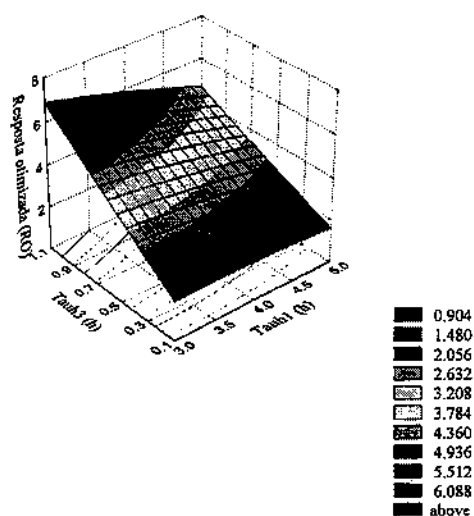


Figura 6.18-Superfície de resposta para RO em função de Tauh1 e Tauh3 (Tauh2=0,6 h, Taus = 8 h)

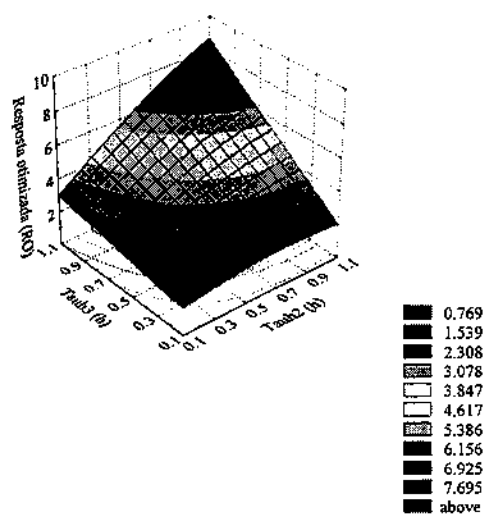


Figura 6.19-Superfície de resposta para RO em função de Tauh2 e Tauh3 (Tauh1= 4 h, Taus = 8 h)

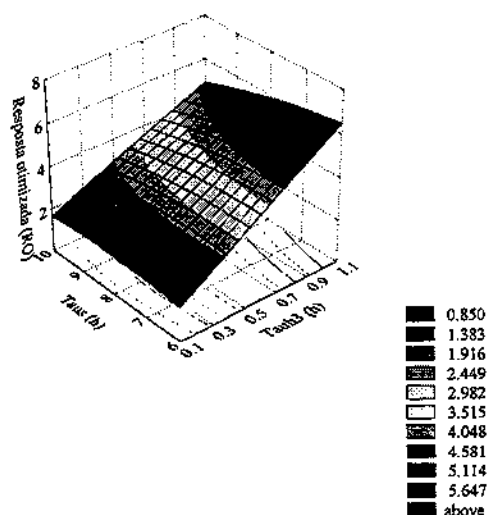


Figura 6.20-Superfície de resposta para RO em função de Tauh3 e Taus (Tauh1 = 3 h, Tauh2 = 1,0 h)

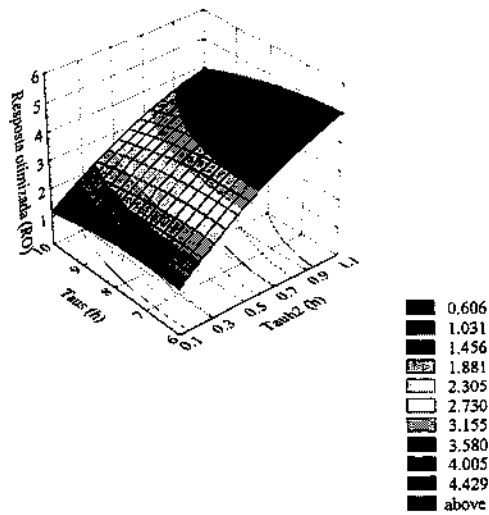


Figura 6.21-Superfície de resposta para RO em função de Tauh2 e Taus (Tauh1 = 3 h, Tauh3 = 1,0 h)

Observando as figuras 6.18, 6.19 e 6.20 verifica-se um forte efeito do tempo hidráulico no terceiro estágio (Tauh3) sobre a RO, obtendo-se os maiores valores da resposta para a faixa de Tauh3 compreendida entre 1,0 hora e 1,1 horas. Na Figura 6.19 pode-se ver um forte efeito da interação Tauh2-Tauh3 na RO, que atinge valor máximo em torno de 10 para valores de Tauh2 e Tauh3 na faixa de 1,0 hora a 1,1 horas. A partir da Figura 6.21 pode-se indicar que a RO é favorecida quando se opera na faixa de Tauh2 entre 1,0 hora e 1,1 horas, e Taus em torno de 6 horas. O efeito da variável Tauh1 foi pequeno quando comparado com os efeitos das outras variáveis independentes.

Com base nos resultados apresentados nos itens 6.2.1, 6.2.2 e 6.2.3, podemos concluir que com o sistema CARE de três estágios, aplicado à purificação de lipase de *Geotrichum sp.*, é possível obter rendimentos em torno de 60% e fatores de purificação de até 14 vezes, ainda que o fator de concentração seja baixo. Dada a versatilidade do sistema CARE pode-se escolher faixas de operação que permitam favorecer seja o rendimento ou o fator de purificação ou trabalhar com uma solução de compromisso. Estes casos estão representados na Tabela 6.10.

Tabela 6.10-Comportamento do sistema CARE sob diferentes condições de operação
(Para todos os casos: $C_0=1,5 \times 10^4$ U/litro; $\varepsilon=0,8$)

Caso	Tauh1 (h)	Tauh2 (h)	Tauh3 (h)	Taus (h)	Rend. (%)	FP	FC	RO
Favorecendo o rendimento	5	1,1	0,6	6	54,27	3,87	0,012	2,52
Favorecendo o fator de purificação	4	0,1	1,1	10	5,86	13,34	0,020	1,56
Solução de compromisso	4	0,35	1,1	6	23,54	7,36	0,026	4,57

Os valores de rendimento (%) e fator de purificação obtidos por simulação, para purificação de lipase de *Geotrichum sp.*, são comparáveis aos obtidos experimentalmente

no presente trabalho, utilizando coluna de Butyl Sepharose (Tabela 5.4), e aos obtidos por métodos convencionais que incluem precipitação da enzima e cromatografia em colunas de troca iônica ou hidrofóbica (SUGIHARA *et al.*, 1990; BAILLARGEON & MCCARTHY, 1991; HEDRICH *et al.*, 1991; SIDEBOTTOM *et al.*, 1991; ASAHARA *et al.*, 1993; IKEMOTO & OTA, 1996).

VII-CONCLUSÕES

Com base nos resultados experimentais, relacionados com a produção de lipase por *Geotrichum sp.* e a purificação da enzima com resina hidrofóbica Butyl Sepharose, que foram utilizados para a simulação de coluna cromatográfica e do processo contínuo CARE, pode-se mencionar as conclusões seguintes:

A produção de lipase por *Geotrichum sp.* deve ser feita em meio complexo composto por água de maceração de milho, nitrato de amônio e óleo de oliva pois, além da boa atividade lipolítica que se obtém, a enzima é mais estável durante a armazenagem que a produzida em meios complexos contendo extrato de levedura ou peptona.

A Butyl Sepharose resultou ser o meio hidrofóbico, entre os investigados, mais adequado para a recuperação da lipase presente no caldo bruto de fermentação. Esta resina forneceu maior recuperação de atividade e maior grau de purificação quando comparada com a Phenyl Sepharose (resina de hidrofobicidade media) e Octyl Sepharose (resina muito hidrofóbica), conseguindo-se eluir a lipase adsorvida com tampão sem sal, a diferença de outros suportes que precisam do uso de detergentes para a dessorção.

Verificou-se que a maior recuperação de lipase acontece quando se trabalha com concentração 2M de cloreto de sódio. Em concentrações abaixo deste valor a recuperação de atividade não é muito boa porque a hidrofobicidade do suporte e da enzima são baixas, enquanto que acima desse valor a recuperação de atividade lipolítica e o fator de purificação são prejudicados pela adsorção de outras proteínas presentes no caldo de fermentação que também atingem a hidrofobicidade suficiente para se ligar ao suporte.

A coluna hidrofóbica de Butyl Sepharose apresentou melhor desempenho na purificação de lipase, com maior atividade recuperada e fator de purificação mais elevado, que a coluna de troca iônica (Q-Sepharose), comportamento que pode ser atribuído ao elevado grau de hidrofobicidade que apresenta a lipase e ao caráter mais seletivo da cromatografia por hidrofobicidade em relação à cromatografia de troca iônica. Através da

eletroforese, verificou-se a presença de lipase nas frações coletadas na saída da coluna de Butyl Sepharose, como uma banda de massa molar próxima da albumina (60 kDa).

Na etapa de adsorção, o efeito da mudança do pH, na faixa compreendida entre 6 e 7, foi desprezível, o que indica que as forças hidrofóbicas são mais importantes na adsorção de lipase sobre Butyl Sepharose que as forças eletrostáticas.

As constantes cinéticas de adsorção de lipase sobre Butyl Sepharose (Q_m , k_1 e k_2) mudaram com a variação da concentração de cloreto de sódio utilizado no caldo bruto de fermentação. Assim, na faixa considerada, um aumento na concentração de cloreto de sódio se traduz num aumento da capacidade de adsorção Q_m e da constante k_1 , como também numa diminuição da constante k_2 , indicando um favorecimento da adsorção e desfavorecimento da dessorção. As isothermas de adsorção foram bem representadas pela equação de Langmuir.

As curvas de ruptura simuladas ajustaram bem com as curvas de ruptura experimentais, o que indica que os valores obtidos para os parâmetros cinéticos representam bem a adsorção de lipase na resina hidrofóbica utilizada.

Através da simulação e otimização, utilizando planejamento experimental, do processo contínuo CARE para purificação de lipase foi possível estabelecer faixas que otimizam a recuperação da lipase, com elevados rendimento e grau de purificação, ainda que o fator de concentração seja baixo. Os resultados obtidos permitem afirmar que este sistema, aplicado à recuperação da lipase, pode ser utilizado como uma alternativa ao uso de procedimentos convencionais.

VIII-SUGESTÕES

Algumas sugestões para futuros trabalhos, propõem-se:

Efetuar a otimização da produção de lipase por *Geotrichum sp* em fermentador de tanque agitado, através de planejamento experimental, para obter faixas de operação que permitam maximizar a produção de enzima.

Realizar testes de purificação de lipase de *Geotrichum* a partir de amostras comerciais brutas, comparando seu comportamento com a enzima obtida diretamente do caldo de fermentação.

Otimizar a purificação de lipase em colunas hidrofóbicas, estudando o efeito de diferentes fatores como pH, temperatura, concentração e tipo do sal, através de planejamento experimental.

Otimizar a recuperação de lipase com resinas hidrofóbicas visando a purificação e imobilização da enzima, para ser utilizada em biocatálise.

Colocar em operação um sistema CARE, com resina hidrofóbica como adsorvente, para purificação de lipase e comparar seu desempenho com coluna cromatográfica hidrofóbica.

IX-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFEYAN, N. B.; GORDON, N. F.; COONEY, C. L. Mathematical modeling of the continuous recycle extraction purification technique. **Journal of Chromatography**, v. 478, p. 1-19, 1989.
- ANTONIAN, E. Recent advances in purification, characterization and structure determination of lipases. **Lipids**, v.23, n.12, p.1101-1106, 1988.
- ARAKAWA, T.; NARHI, L.O. Solvent modulation in hydrophobic interaction chromatography. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.13, p.151-172, 1991.
- ARENDS, I.M.; DOROKHOV, V.V.; SVERCHKOVA, T.M.; FEDOROVA, G.D. Byosynthesis of lipase by *Geotrichum candidum* during submerged cultivation. **Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya**, v.22, n.1, p.102-106, 1986.
- ARNOLD, F.H.; BLANCH, H.W.; WILKE, C.R. Liquid chromatography plate height equations. **Journal of Chromatography**, v. 330, p. 159-166, 1985.
- ARVE, B.H.; LIAPIS, A.I. Modelling and analysis of bioespecific adsorption in a finite bath. **Biotechnology and Bioengineering**, v.31, p.240-249, 1988.
- ASAHARA, T.; MATORI, M.; IKEMOTO, M.; OTA, Y. Production of two types of lipases with opposite positional specificity by *Geotrichum sp.* FO 401B, **Bioscience, Biotechnology & Biochemistry**, v.57, n.3, p.390-394, 1993.
- ASENJO, J. A.; PATRICK, I. Large scale protein purification. In: Harris, E. L. V.; Angal, S. **Protein purification applications - A practical approach**, IRL Press, 1990.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical engineering fundamentals**, 2a. ed., N. York: McGraw-Hill, 1986. Cap. 11, p. 726-97.
- BAILLARGEON, M.W.; BISTLINE Jr., R.G.; SONNET, P.E. Evaluation of strains of *Geotrichum candidum* fo lipase production and fatty acid specificity. **Applied**

- Microbiology and Biotechnology**, v.30, p. 92-96, 1989.
- BAILLARGEON, M.W. Purification and specificity of lipases from *Geotrichum candidum*. **Lipids**, v. 25, n. 12, p. 841-848, 1990.
- BAILLARGEON, M.W.; MCCARTHY, S.G. *Geotrichum candidum* NRRL Y-553 lipase: purification, characterization and fatty acid specificity. **Lipids**, v. 26, n. 10, p. 831-836, 1991.
- BAILLARGEON, M.W.; SONNET, P.E. Selective lipid hydrolysis by *Geotrichum candidum* NRRL Y-553 lipase. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 12, p. 871-874, 1991.
- BALCÃO, V.M.; VIEIRA, M.C.; MALCATA, F.X. Adsorption of protein from several commercial lipase preparations onto a hollow-fiber membrane module. **Biotechnology Progress**, v.12, p.164-172, 1996.
- BARBOZA, M. Estudo cinético de adsorção, modelagem dinâmica e otimização de processo contínuo de purificação de Cefalosporina C, Campinas, 1998. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- BASTIDA, A.; SABUQUILLO, P.; ARMISEN, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; HUGUET, J.; GUISAN, J.M. A Single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v.58, n.5, p.486-493, 1998.
- BECKER, P.; ABU-REESH, I.; MARKOSSIAN, S.; ANTRANIKIAN, G.; MÄRKL, H. Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase-producing thermophile *Bacillus sp.* IHI-91 on olive oil. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 48, p. 184-190, 1997.
- BELTER, P.A.; CUSSLER, E.L.; HU, W.S. **Bioseparations downstreams processing for biotechnology**. New York: John Wiley & Sons, 1988. p. 368.

- BENJAMIN, S.; PANDEY, A. *Candida rugosa* lipases: molecular biology and versatility in biotechnology, **Yeast**, v.14, p.1069-1087, 1998.
- BERGGRUND, A.; DREVIN, I.; KNUUTTILA, K.-G.; WARDHAMMAR, J.; JOHANSSON, B.-L. Chemical and chromatographic characterization of a new bio process medium for hydrophobic interaction chromatography: Butyl sepharose® 4 fast flow. **Process Biochemistry**, v.29, p.455-463, 1994.
- BJÖRKLING, F.; GOTFREDSEN, S.E.; KIRK, D. The future impact of industrial lipases, **Trends in Biotechnology**, v.9, n.10, October, p.360-363, 1991.
- BJURSTROM, E. Biotechnology, **Chemical Engineering**, v. 92, p. 126-58, 1985.
- BÖRGSTROM, B.; BROCKMAN, H.L. (Eds.). **Lipases**. Elsevier, Amsterdam, Holland, 1984.
- BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. **Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis and model building**. New York: Wiley & Sons, 1978. 653 p.
- CANTO, W.L. **Estudos Econômicos Alimentos Processados. Produção, Usos e Mercado de Enzimas**, Campinas, ITAL, n° 29, 1995, 74p.
- CASTRO, H.F. de; ANDERSON, W.A. Fine chemicals by biotransformation using lipases, **Química Nova**, v.18, n.6, p.544-554, 1995.
- CHANDER, H.; CHEBBI, N.B.; RANGANATHAN, B. Lipase activity of *Lactobacillus brevis*, **Archives Mikrobiology**, v.92, p.171-174, 1973.
- CHARTRAIN, M.; KATZ, L.; MARCIN, C.; THIEN, M.; SMITH, S.; FISHER, E.; GOKLEN, K.; SALMON, P.; BRIX, T.; PRICE, K.; GREASHAM, R. Purification and characterization of a novel bioconverting lipase from *Pseudomonas aeruginosa* MB 5001. **Enzyme Microbial and Technology**, v.15, July, p.575-580, 1993.
- CHASE, H.A. Affinity separations utilising immobilised monoclonal antibodies - a new

- tool for the biochemical engineer, **Chemical Engineering Science**, v. 39, p. 1099-1125, 1984a.
- CHASE, H. A. Prediction of the performance of preparative affinity chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 297, p. 179-202, 1984b.
- CHASE, H. A. Adsorption separation processes for protein purification. **Downstream processes: Equipment and techniques**, p. 159-204. Ed. Alan R. Liss, Inc, 1988.
- CONANT, N.F.; SMITH, D.T.; BAKER, R.D.; CALLAWAY, J.L. **Micología**. 3a. ed., México. Ed. Interamericana, 1972, 549p.
- COSTA, M.C. Produção, purificação e caracterização de lipase de *Aspergillus sp.*, Campinas, 1996. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- COWAN, G. H.; COSLING, I. S.; LAWS, J. F.; SWEETHENHAM, W. P. Physical and mathematical modeling to aid scale-up of liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 363, p. 37-56, 1986.
- CURRALERO, I.C.B.; MATSUBARA, S.; RODRIGUES, M.I.; MAUGERI Fº, F. Sistema bifásico múltiplo estágio para síntese de dextrana. Anais do XII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Porto Alegre, 1998.
- DAVRANOV, K. Microbial lipases in biotechnology, **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.30, n. 4-5, p.527-534, 1994.
- DRAEGER, N.M., CHASE,H.A. Modelling of protein adsorption in liquid fluidized beds. In: Pyle, D.L. (Ed.), **Separations for Biotechnology 2.**, Elsevier Applied Science, London, Great Britain, p.325-333, 1990.
- DWIVEDI, P.N.; UPADHYAY, S.N. Particle-fluid mass transfer in fixed and fluidized beds. **Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development**, v.16, n.2, p. 157-165, 1977.

- FAUSNAUGH, J.L.; KENNEDY, L.; REGNIER, F.E. Comparison of hydrophobic interaction and reversed phase chromatography of proteins. **Journal of Chromatography**, v. 317, p.141-155, 1984.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ARMISÉN, P.; SABUQUILLO, P.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J.M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.93, p.185-197, 1998.
- FOGLIA, T.A.; PETRUSOK, K.; FEAIRHELLER, S.H. Enzymatic interesterification of tallow-sunflower oil mixtures. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.70, p. 281-5, 1993.
- FREIRE, D.M.; TELES, E.M.F.; BON, E.P.S.; SANT'ANNA Jr., G.L. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter. Effect of carbon and nitrogen nutrition, agitation, and aeration. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.63-65, p.409-421, 1997.
- FUJII, T.; TATARA, T.; MINAGAWA, M. Studies on applications of lipolytic enzyme in detergency. I. Effect of lipase from *Candida cylindracea* on removal of olive oil from cotton fabric. **Journal American Oil Chemists Society**, v. 63, p. 796-799, 1986.
- GANDHI, N.N. Applications of lipase. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v.74, n.6, p.621-634, 1997.
- GELUK, M.A.; NORDE, W.; VAN KALSBEEEK, H.K.I. & VAN'TRIET, K. Adsorption of lipase from *Candida rugosa* on cellulose and its influence on lipolytic activity. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.14; p.748-754, 1992.
- GHOSH, P.K.; SAXENA, R.K.; GUPTA, R.; YADAV, R.P.; DAVIDSON, S. Microbial lipases: production and applications. **Science Progress**, v.79, n.2, p.119-157, 1996.
- GILBERT, E.J. *Pseudomonas* lipases: biochemical properties and molecular cloning. **Enzyme Microbial and Technology**, v.15, p.634-645, 1993.

- GITLESEN, T.; BAUER, M.; ADLERCREUTZ, P. Adsorption of lipase on polypropylene powder. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1345, p.188-196, 1997.
- GOBETTI, M.; FOX, P.F.; SMACCHI, E.; STEPANIAK, L.; DAMIANI, P. Purification and characterization of a lipase from *Lactobacillus plantarum* 2739. **Journal of Food Biochemistry**, v.20, p.227-246, 1996.
- GODTFREDSEN, S.E. Microbial lipases. In: Fogarty, W.M.; Kelly, C.T. **Microbial Enzymes and Biotechnology**, p. 255-274, Elsevier Applied Science, Northern Ireland, 1990.
- GORDILLO, M.A.; OBRADORS, N.; MONTESINOS, J.L.; VALERO, F.; LAFUENTE, J.; SOLÁ, C. Stability studies and effect of the initial oleic acid concentration on lipase production by *Candida rugosa*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, p. 38-41, 1995.
- GORDON, N.F.; COONEY, C.L. Integration in downstream processing using continuous affinity recycle extraction, **Abstracts Papers American Chemical Society**, 196 Meet, MTBD 139, 1988.
- GORDON, N.F.; COONEY, C.L. A comparison of continuous affinity recycle extraction (CARE) to column chromatography. **Abstracts Papers American Chemical Society**, 198 Meet, MTBD 22, 1989.
- GORDON, N.F.; COONEY, C.L. Impact of continuous affinity-recycle extraction (CARE) in downstream processing. In: Ladisch, M.R.; Wilison, R.C.; Painton, Ch.C.; Builder, S.E. **Protein Purification. From Molecular Mechanisms to Large-Scale Processes**. Washington: American Chemical Society, 1990. Cap. 9, p. 118-138. (ACS Symposium Series).
- GORDON, N.F.; MOORE, C.; COONEY, C.L. An overview of continuous protein purification processes. **Biotechnology Advances**, v. 8, p. 741-762, 1990a.
- GORDON, N.F.; TSUJIMURA, H.; COONEY, C.L. Optimization and simulation of

- continuous affinity recycle extraction (CARE). **Bioseparations**, v.1, p. 9-21, 1990b.
- GULYAMOVA, K.A.; DAVRANOV, K.D. Effect of culture conditions on production of extra- and intracellular lipases by the fungus *Mucor miehei*. **Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya**, v. 29, p. 29-34, 1993.
- HAAS, M. J.; CICHOWICZ, D. J.; BAILEY, D. G. Purification and characterization of an extracellular lipase from the fungus *Rhizopus delemar*. **Lipids** , v. 27, p. 571-576, 1992.
- HAFERBURG, D.; KLEBER, H.P. Extracellular lipase from *Acinetobacter calcoaceticus*. **Acta Biotechnologica**, v.2, p.337-342, 1982.
- HALPERIN, G.; BRIETENBACH, M.;TAUBER-FINKELSTEIN, M.; SHALTIEL, S.
Hydrophobic chromatography on homologous series of alkyl agaroses. A comparison of charged and electrically neutral column materials. **Journal of Chromatography**. v. 215, p. 211-228, 1981
- HANG, Y.D.; WOODAMS, E.E. Lipase production by *Geotrichum candidum* from sauerkraut brine. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.6, p.418-421, 1990.
- HARPER, W.J.; LONG, J.E. Italian cheese ripening. IV. Various free amino and fatty acids in commercial provolone cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 39, p. 129-137, 1956.
- HARRIS, P.L.; CUPPET, S.L.; BULLERMAN, L.B. Optimization of lipase synthesis by *Pseudomonas fluorescens* by response surface methodology. **Journal of Food Protection**, v.53, n.6, p.481-483, 1990.
- HARRIS, E. L. V.; ANGAL, S. **Protein Purification Methods - A Practical Approach**, IRL Press, p. 220-230, 1995.
- HARWOOD, J. The versatility of lipases for industrial uses. **Trends in Biochemical Science**, v.14, April, 125-126, 1989.

- HATZINIKOLAOU, D.G.; MACRIS, J.B.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; KOLISIS, F.N.; FOUNTOUKIDIS, G. Production and parcial characterization of lipase from *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, v.18, n.5, p.547-552, 1996.
- HEDRICH, H.C.; SPENER, F. Large-scale purification, enzymic characterization, and crystallization of the lipase from *Geotrichum candidum*. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.13, p.840-847, 1991.
- HENRIETTE, C.; ZINEBI, S.; AUMAITRE, M.F.; PETITDEMANGE, E.; PETITDEMANGE, H. Protease and lipase production by a strain of *Serratia marcescens* (532S). **Journal of Industrial Microbiology**, v.12, p.129-135, 1993.
- HJERTÉN, S. Some general aspects of hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Chromatography**, v.87, p.325-331, 1973.
- HJERTÉN, S. Hydrophobic interaction chromatography of proteins on neutral adsorbents. In: Catsimpoolas, N. (Ed.), **Methods of protein separation**, v.2, Plenum Press, New York, 1976.
- HJERTÉN, S.; YAO, K.; ERIKSONN, K-O.; JOHANSSON, B. Gradient and isocratic high performance hydrophobic interaction chromatography of proteins on agarose columns. **Journal of Chromatography**, v.359, p.99-109, 1986.
- HOFSTEE, B.H.J. Hydrophobic affinity chromatography of proteins. **Analytical Biochemistry**, v.52, p.430-448, 1973.
- HOFSTEE, B.H.J.; OTILLIO, N.F. Non-ionic adsorption chromatography of proteins. **Journal of Chromatography**, v.159, p.57-69, 1978.
- HORSTMANN, B.J.; CHASE, H.A. Modelling the affinity adsorption of immunoglobulin G to protein a immobilised to agarose matrices. **Chemical Engineering Research Development**, v.67, p.243-254, 1989.
- HUGE-JENSEN, B. Partial Purification and characterization of free and immobilized

- lipases from *Mucor miehei*. **Lipids**, v.22, n.8, p. 559-565, 1987.
- HUGE-JENSEN, B.; GALLUZZO, D.R.; JENSEN, R.G. Studies on free and immobilized lipases from *Mucor miehei*. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v.65, n.6, p.905-910, 1993.
- IKEMOTO, M.; OTA, Y. Production of two types of non-specific lipases by *Geotrichum* sp. FO274A: A fish-oil assimilating strain. **Journal of General Applied Microbiology**, v.42, p.371-379, 1996.
- IWAI, M.; TSUJISAKA, Y.; OKAMOTO, Y. FUKUMOTO, J. Lipid requirement for the lipase production by *Geotrichum candidum* Link. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.37, n.4, p. 929-931, 1973.
- JACOBSEN, T.; JENSEN, B.; OLSEN, J; ALLERMAN, K. Extracellular and cell-bound lipase activity in relation to growth of *Geotrichum candidum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.32, p.256-261, 1989a.
- JACOBSEN, T.; OLSEN, J.; ALLERMANN, K., PAULSEN, O.M., HAU, J. Production, partial purification and immunochemical characterization of multiple forms of lipase from *Geotrichum candidum*. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 11, p. 90-95, 1989b.
- JAEGER, K-E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B.N.; COLSON, C.; van HEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v.15, p.29-63, 1994.
- JENNISEN, H.P.; HEILMEYER, I.M.G. General aspects of hydrophobic chromatography. Adsorption and elution characteristics of some skeletal muscle enzymes. **Biochemistry**, v.14, p.754-760, 1975.
- JÜRGENS, D.; HUSER, H. Large-Scale purification of staphylococcal lipase by hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Chromatography**, v.216, p.295-301, 1981.

- KAMALY, K.M.; TAKAYAMA, K.; MARTH, E.H. Acylglycerol acylhydrolase (lipase) activities of *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* and their mutants. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.280-290, 1990.
- KAMIMURA, E.S. Modelagem e simulação de coluna cromatográfica por afinidade para purificação de proteína. Campinas, 1995. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- KAMIMURA, E.S.; MAUGERI, F. Modelagem e simulação de coluna cromatográfica por afinidade. XXIII ENEMP-Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados, 22-25 Outubro 1995, Maringá, p.953-964.
- KAMIMURA, E.S., MENDIETA, O., SATO, H.H., PASTORE, G., MAUGERI, F. Production of lipase from *Geotrichum sp.* and adsorption studies on affinity resin, **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 16, n.2, p.103-112, 1999.
- KERZEL, P.; MERSMANN, A. Adsorption of lipase. **DECHEMA Biotechnology Conferences**, v.4, p.1127-1130, 1990.
- KERZEL, P., MERSMANN, A. Adsorption behaviour of lipase from *Staphylococcus carnosus* on a hydrophobic adsorbent. **Journal of Chromatography**, v.584, p.109-113, 1992.
- KERZEL, P.; WENZIG, E.; MERSMANN, A. Investigation of the influence of several parameters on the adsorption of lipase. **DECHEMA Biotechnology Conferences**, v.5, p.653-657, 1992.
- KHURI, A.I.; CORNELL, J.A. **Response Surface Design and Analysis**. New York: Marcel Dekker, 1987. 405 p.
- KILARA, A. Enzyme-modified lipid food ingredients. **Process Biochemistry**, v.20, n.2, p.35-45, 1985.

- KIMURA, Y.; TANAKA, A.; SINOMOTO, K.; NIHIRA, T.; FUKUI, S. Application of immobilized lipase to hydrolysis of tryacylglyceride. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v.7, n.2, p.107-112, 1983.
- KOHNO, M.; KUCIMIYA, W.; HASHIMOTO, Y.; MORITA, Y. Purification, characterization and cristallization of two types of lipase from *Rhizopus niveus*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, p. 1007-1012, 1994.
- KORDEL, M.; SCHMID, R.D. Purification and characterization of the lipase from *Pseudomonas spec.* ATCC 21808. 5th European Congress in Biotechnology, July 8-13, Copenhagen, Denmark, 1990.
- KRIEGER, N.; TAIPA, M.A.; MELO, E.H.M.; LIMA-FILHO, J.L.; AIRES-BARROS, M.R.; CABRAL, J.M.S. Purification of a *Penicillium citrinum* lipase by chromatographic processes. **Bioprocess Engineering**, v.20, n.1, p.59-65, 1999.
- KUBOTA, N.; KOUNOSU, M.; SAITO, K.; SUGITA, K. Protein adsorption and elution performances of porous hollow-fiber membranes containing various hydrophobic ligands. **Biotechnology Progress**, v.13, p.89-95, 1997.
- LABUSCHAGNE, R.B.; van TONDER, A.; LITTHAUER, D. *Flavobacterium odoratum* lipase: Isolation and characterization. **Enzyme and Microbial Technology**, v.21, p.52-58, 1997.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p.680-685, 1970.
- LANG, S.; KATSIWELA, E.; KLEPPE, F.; WAGNER, F. *Ustilago maydis* lipolytic enzymes: Characterization and partial purification. In: Alberghina, L.; Schmid, R.D.; Verger, R. (Eds.). **Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering**, GBF Monographs, v.16, Braunschweig, Germany, p.361-364.
- LAWRENCE, R.C.; FRYER, T.F.; REITER, B. The production and characterization of lipases from *Micrococcus* and a *Pseudomonas*. **Journal of General Microbiology**,

- v.48, p.401-408, 1967.
- LEE, S.Y.; LEE, B.H. Esterolytic and lipolytic activities of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* LLG. **Journal of Food Science**, v.55, p.119-126, 1990.
- LEWUS, R.K.; ALTAN, F.K.; CARTA, G. Protein adsorption and desorption on gel-filled rigid particles for ion exchange. **Industrial Engineering Chemical Research**, v.37, p.1079-1087, 1998.
- LIAPIS, A.I.; ANSPACH, B.; FINDLEY, M.; DAVIE, J.; HEARN, M.; UNGER, K. Bioespecific adsorption of lysozyme onto monoclonal antibody ligand immobilized on nonporous silica particles. **Biotechnology and Bioengineering**, v.34, p.467-477, 1989.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin-phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p. 256-275, 1951.
- LÓPEZ, S.; VALERO, F.; SOLÁ, C. Strategies in lipase production by immobilized *Candida rugosa* cells. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 59, p. 15-24, 1996.
- MACÊDO, G. Produção, purificação, caracterização bioquímica e aplicações de lipase *Geotrichum sp.* Campinas, 1995. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- MACRAE, A.R. Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.60, p. 291-294, 1983.
- MACRIS, J.B.; KOURENTZI, E.; HATZINIKOLAOU, D.G. Studies on localization and regulation of lipase production by *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v.31, n.8, p.807-812, 1996.
- MAISANO, F.; BELEW, M.; PORATH, J. Synthesis of new hydrophobic adsorbents based on homologous series of uncharged alkylsulphide agarose derivatives. **Journal of**

- Chromatography**, v.321, p.305-317, 1985.
- MALCATA, F.X.; GARCIA, H.S.; HILL, C.G.; AMUNDSON, C.H. Hydrolysis of butteroil by immobilized lipase using a hollow-fiber reactor: Part I. Lipase adsorption studies. **Biotechnology and Bioengineering**, v.39, p.647-657, 1992.
- MALISZEWSKA, I.; MASTALERZ, P. Production and some properties of lipase from *Penicillium citrinum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, p. 190-193, 1992.
- MANCO, G.; DIGENNARO, S.; DE ROSA, M.; ROSSI, M. Purification and characterization of a thermostable carboxylesterase from the thermoacidophilic eubacterium *Bacillus acidocaldarius*. **European Journal of the Biochemistry**, v.221, p.965-972, 1994.
- MARCIN, C.; KATZ, L.; GREASHAM, R.; CHARTRAIN, M. Optimization of lipase production by *Pseudomonas aeruginosa* MB 5001 in batch cultivation. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 12, p. 29-34, 1993.
- MARTINELLE, M.; HOLMQUIST, M.; HULK, K. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1258, p. 272-276, 1995.
- MARTINS, M.I.; RODRIGUES, M.I.; MAUGERI FILHO, F. Modelagem, simulação e otimização de um processo contínuo de purificação de enzimas. XXIII ENEMP- Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados, 22-25 Outubro 1995, Maringá, p.931-941.
- MARTÍNEZ-CRUZ, P.; CHRISTEN, P.; FARRES, A. Medium optimization by a fractional factorial design for lipase production by *Rhizopus delemar*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.76, n.2, p.94-97, 1993.
- MATHIS, R.M.; MOUREY, A.; HUBERT, P. One-step purification of a lipolytic enzyme from *Bacillus pumilus* by mild hydrophobic interaction chromatography on polyoxyalkylene glycol-bound Sepharose 6B. **Applied and Environmental**

- Microbiology**, v.54, n.5, May, p.1307-1308, 1988.
- MEDEIROS, J.F. de. Estudo do meio de cultura para produção de lipase por *Geotrichum sp.*, Campinas, 1998. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- MELANDER, W.; HORVATH, C. Salt effects on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of the lyotropic series. **Archives Biochemistry and Biophysics**, v.183, p.200-215, 1977.
- MENDIETA, O.; KAMIMURA, E.S.; COSTA, F.A.A.; SATO, H.; PASTORE, G.; MAUGERI, F. Producción en fermentador de tanque agitado y purificación parcial de lipasa de *Geotrichum sp.* **Anales del 2º Congreso Ibero-Americano de Ingeniería de Alimentos**, 1998a.
- MENDIETA, O.; KAMIMURA, E.S.; MAUGERI, F. Adsorção de lipase de *Geotrichum sp.* por resina de interação hidrofóbica. **Anais do XII Simposium Nacional de Fermentações (SINAFERM)**, 1998b.
- MOHSENIN, N.N. **Physical Properties of plant and animal Materials: Structure, Physical Characteristics and Mechanical Properties**, 2ed., Ed. Gordon and Beach Publishes, 1986.
- NAKANISHI, K.; YAMAMOTO, S.; MATSUNO, R.; KAMIKUBO, T. Analysis of dispersion mechanism in gel chromatography. **Agricultural Biological Chemistry**, v.41, n.8, p. 1465-1473, 1977.
- NARHI, L.O.; KITA, Y.; ARAKAWA, T. Hydrophobic interaction chromatography in alkaline pH. **Analytical Biochemistry**, v.182, p.266-270, 1989.
- NORIEGA, J.A.; TEJADA, A.; MAGAÑA, I.; ORTEGA, J.; GUZMAN, R. Modelling column regeneration effects on dye-ligand affinity chromatography. **Biotechnology Progress**, v.13, p.296-300, 1997.

- OCHOA, J.L. Hydrophobic (interaction) chromatography. **Biochemie**, v.60, p.1-15, 1978.
- OHNISHI, K.; YOSHIDA, Y.; SEKIGUCHI, J. Lipase production of *Aspergillus oryzae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 77, p. 490-495, 1994.
- OMAR, I.C.; NISHIO, N.; NAGAI, S. Production of a thermostable lipase by *Humicola lanuginosa* grown on sorbitol-corn steep liquor medium. **Agricultural Biological Chemistry**, v.51, n.8, p.2145-2151, 1987.
- PABAI, F.; KERMASHA, S.; MORIN, A. Lipase from *Pseudomonas fragi* CRDA 323: Partial purification, characterization and interesterification of butter fat. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, p. 42-51, 1995.
- PÅHLMAN, S.; ROSENGREN, J.; HJERTÉN, S. Hydrophobic interaction chromatography ion uncharged Sepharose derivatives. Effects of neutral salts on the adsorption of proteins. **Journal of Chromatography**, v.131, p.99-108, 1977.
- PARK, Y.K.; PASTORE, G.M.; ALMEIDA, M.M. Hydrolysis of soybean oil by lipase system. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v.65, n.2, p.252-254, 1988.
- PASTORE, G. Produção e caracterização bioquímica de monoalçilglicerol lipase microbiana e aplicação de lipases na hidrólise e esterificação enzimática. Campinas, 1992. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- PESLIAKAS, I.G.I; TIMINSKENE, V.A.; KADUSHEVICHYUS, V.A.; VESA, V.S. Hydrophobic adsorbents for preparative purification of biopolymers. **Prikladnaya Biokhimiya I Mikrobiologiya**, v.28, n.4, p.502-511, 1992.
- PHARMACIA. **Hydrophobic Interaction Chromatography. Principles and Methods**, 1993.
- PHILIPS, A.; PRETORIUS, G. Purification and characterization of an extracellular lipase of *Galactomyces geotrichum*. **Biotechnology Letters**, v.13, n.11, p. 833-838, 1991.

- PIMENTEL, M. Produção de lipases por fungos filamentosos: Estudos cinéticos e síntese de ésteres. Campinas, 1996. Tese (Doutor em Química)-Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.
- PIMENTEL, M.C.B.; KRIEGER, N.; COELHO, L.C.C.B.; FONTANA, J.O.; MELO, E.H.M.; LEDINGHAM, W.M.; LIMA Fº, J.L. Lipase from a brazilian strain of *Penicillium citrinum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.49, p.59-74, 1994.
- PORATH, J.; SUNDBERG, L.; FORNSTEDT, N.; OLSON, I. Salting-out in amphiphilic gels as a new approach to hydrophobic adsorption. **Nature**, v.245, p.465-466, 1973.
- PORATH, J. Salt-promoted adsorption: Recent developments. **Journal of Chromatography**, v.376, p.331-341, 1986.
- POSORSKE, L.H. Industrial-scale application of enzymes to the fats and oil industry. **Journal American Oil Chemists Society**, v.61, p. 1758-1760, 1984.
- PUNGOR, E.; AFEYAN, N. B.; GORDON, N. F.; COONEY, C. L. Continuous affinity-recycle extractions: A model protein separations technique. **Bio/Technology**, v.5, p.604-608, 1987.
- QUEIROZ, J.A.; GARCIA, F.A.P.; CABRAL, J.M.S. Hydrophobic interaction chromatography of *Chromobacterium viscosum* lipase. **Journal of Chromatography A**, v.707, p.137-142, 1995.
- QUEIROZ, J.A.; GARCIA, F.A.P.; CABRAL, J.M.S. Hydrophobic interaction chromatography of *Chromobacterium viscosum* lipase on polyethylene glycol immobilized on Sepharose. **Journal of Chromatography A**, v.734, p.213-219, 1996.
- RAO, P.V.; JAYARAMAN, K.; LAKSHMANAN, C.M. Production of lipase by *Candida rugosa* in solid state fermentation. 2: Medium optimization and effect of aeration. **Process Biochemistry**, v.28, n.6, p.391-395, 1993.
- RAPP, P. Production, regulation, and some properties of lipase activity from *Fusarium*

- oxysporum* f. *sp. vasinfectum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, p.832-838, 1995.
- RODRIGUES, M.I.; ZAROR, C.A.; MAUGERI, F.; ASENJO, J.A. Dynamic modelling, simulation and control of continuous adsorption recycle extraction. **Chemical Engineering Science**, v. 47, n 1, p. 263-69, 1992.
- RODRIGUES, M.I. Modelagem, Simulação e controle de um processo contínuo de purificação de enzimas. Campinas, 1993. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- RODRIGUES, M.S.M. Produção de lipases e sua aplicação na eliminação de resinas em lignocelulósicos. Campinas, 1997. Tese (Doutor em Química)-Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.
- RUA, M.L.; BALLESTEROS, A. Rapid purification of two lipase isoenzymes from *Candida rugosa*. **Biotechnology Techniques**, v.8, n.1, p.21-26, 1994.
- RUA, M.L.; SCHIMDT-DANNERT, C.; WAHL, S.; SPRAUER, A.; SCHMID, R.D. Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus*. Large-scale production, purification and properties: aggregation behaviour and its effect on activity. **Journal of Biotechnology**, v.56, p.89-102, 1997.
- SABUQUILLO, P.; REINA, J.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. "Interfacial affinity chromatography" of lipases: separation of different fractions by selective adsorption on supports activated with hydrophobic groups. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1388, p.337-348, 1998.
- SCHMID, R.D.; VERGER, R. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v.37, p.1608-1633, 1998.
- SCOPES, R.K. **Protein Purification. Principles and Practice**, Springer-Verlag, New York, p.176-180, 1988.

- SEITZ, E.W. Industrial application of microbial lipase: A review. **Journal American Oil Chemists Society**, v. 51, p. 12-16, 1974.
- SHAHANI, K.M. Lipases and Estearases. In: Reed, G., **Enzymes in Food Processing**, p. 181-217, New York, Academic Press, Inc., 1975.
- SHALTIEL, S.; ER-EL, Z. Hydrophobic chromatography: Use for purification of glycogen phosphorylase. **Proceedings Natural Academy of Sciences USA**, v.70, p.778-781, 1973.
- SHALTIEL, S. Hydrophobic chromatography. In: Jacoby, W.B.; Wilchek, M. (Eds.), **Affinity Techniques. Enzyme Purification: Part B. Methods in Enzymology**, v.34, p.126-140, 1974.
- SHALTIEL, S. Hydrophobic chromatography. In: Jacoby, W.B. (Ed.), **Enzyme Purification and Related Techniques, Part C. Methods in Enzymology**, v.104, p.69-96, 1984.
- SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; NAGAO, T.; TOMINAGA, Y. Induction of *Geotrichum candidum* lipase by long-chain fatty acids. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.74, n.6, p.77-80, 1992.
- SHIRAZI, S.H.; RAHMAN, S.R.; RAHMAN, M.M. Production of extracellular lipases by *Saccharomyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.14, p.595-597, 1998.
- SIDEBOTTOM, C.M.; CHARTON, E.; DUNN, P.P.J.; MYCOCK, G.; DAVIES, C.; SUTTON, J.L.; MACRAE, A.R.; SLABAS, A.R. *Geotrichum candidum* produces several lipases with markedly different substrate specificities. **European Journal of Biochemistry**, v. 202, p. 485-491, 1991.
- SIROTTI, D.A.; EMERY, A. Mass transfer parameters in an immobilized glucoamylase column by pulse response analysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v.25, p.1773-1779, 1983.

- SKIDMORE, G.; CHASE, H. Multicomponent adsorption of protein to ion exchangers. In: Pyle, D.L. (Ed.), **Separations for Biotechnology 2.**, Elsevier Applied Science, London, Great Britain, p.418-427, 1990.
- SOBERON-CHÁVEZ, G.; PALMEROS, B. Pseudomonas lipases: molecular genetics and potential industrial applications. **Critical Reviews in Microbiology**, v.20, n.2, p.95-105, 1994.
- SOUSA NETO, R. Produção, purificação, caracterização bioquímica e aplicações de lipase de *Alcaligenes sp.* Campinas, 1996. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- SRINIVASAN, R.; RUCKENSTEIN, E. Role of physical forces in hydrophobic interaction chromatography. **Separation & Purification Methods**, v.9, p.267-270, 1980.
- STEAD, D. Microbial lipases: their characteristics, role in food spoilage and industrial uses. **Journal of Dairy Research**, v.53, p. 481-505, 1986.
- STÖCKLEIN, W.; SZTAJER, H.; MENGE, U.; SCMID, R.D. Purification and properties of a lipase from *Penicillium expansum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1168, p. 181-189, 1993.
- SUGIHARA, A.; SHIMADA, Y.; TOMINAGA, Y. Purification and characterization of *Aspergillus niger* lipase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.52, p.1591-1592, 1988.
- SUGIHARA, A.; SHIMADA, Y.; TOMINAGA, Y. Separation and characterization of two molecular forms of *Geotrichum candidum* lipase. **Journal of Biochemistry**, v.107, p.426-430, 1990.
- SUGIHARA, A.; SHIMADA, Y.; TOMINAGA, Y. A novel *Geotrichum candidum* lipase with some preference for the 2-position on a triglyceride molecule. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.35, n.6, p.738-740, 1991a.

- SUGIHARA, A.; TANI, T.; TOMINAGA, Y. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp. **Journal of Biochemistry**, v.109, p.211-216, 1991b.
- SUGIHARA, A.; HATA, S.; SHIMADA, Y.; GOTO, K.; TSUNUSAWA, S.; TOMINAGA, Y. Characterization of *Geotrichum candidum* lipase III with some preference for the inside ester-bond of trygliceride. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.40, p.279-283, 1993.
- SUZUKI, M.; YAMAMOTO, H.; MIZUGAKI, M. Purification and general properties of a metal-insensitive lipase from *Rhizopus japonicus* NR400. **Journal of Biochemistry**, v.100, p.1207-1213, 1986.
- SZTAJER, H.; MALISZEWSKA, I.; WIECZOREK, J. Production of exogenous lipases by bacteria, fungi, and actinomycetes. **Enzyme Microbial Technology**, v.10, p.492-497, 1988.
- SZTAJER, H.; ERDMANN, H.; ISOBE, K.; MORELLE, G.; SCHMID, R.D. Production and some properties of partially purified lipase from *Penicillium simplicissimum*. In: Alberghina, L.; Schmid, R.D.; Verger, R. (Eds.). **Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering**, GBF Monographs, v.16, Braunschweig, Germany, p.339-344, 1991.
- TAHOUN, M.K.; MOSTAFA, E.; MASHALY, R.; ABOU-DONIA, S. Lipase induction in *Geotrichum candidum*. **Milchwissenschaft**, v.37, n.2, p.86-88, 1982.
- TAIPA, M. A.; AIRES-BARROS, M. R.; CABRAL, J. M. S. Purification of lipases. **Journal of Biotechnology**, v. 26, p. 111-42, 1992.
- TALON, R.; DUBLET, N.; MONTEL, M.C.; CANTONNET, M. Purification and characterization of extracellular *Staphylococcus warneri* lipase. **Current Microbiology**, v. 30, p. 11-16, 1995.
- TOMBS, M.P.; BLAKE, G.G. Stability and inhibition of *Aspergillus* and *Rhizopus* lipases.

- Biochimica et Biophysica Acta**, v.700, p.81-89, 1982.
- TSUJISAKA, Y.; IWAI, M.; FUKUMOTO, J.; OKAMOTO, Y. Induced formation of lipase by *Geotrichum candidum* Link, **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 37, n.4, p. 837-842, 1973a.
- TSUJISAKA, Y.; IWAI, M.; TOMINAGA, Y. Purification, cristallization and some properties of lipase from *Geotrichum candidum* Link. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 37, n.6, p. 1457-1464, 1973b.
- TYSKI, S.; HRYNIEWICZ, W.; JELJASZEWICZ, J. Purification and some properties of the staphylococcal extracelular lipase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.749, p.312-317, 1983.
- VEERARAGAVAN, K.; COLPITTS, T.; GIBBS, B. Purification and characterization of two distinct lipases from *Geotrichum candidum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1044, p.26-33, 1990.
- VISSER, J.; STRATING, M. Separation of lipoamide dehydrogenase isoenzymes by affinity chromatography. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.384, p.69-80, 1975.
- VULFSON, E.N. Enzimatic synthesis of food ingredients in low-water media. **Trends in Food Science & Technology**. v.4, p. 209-15, 1993.
- WANNERBERGER, K.; ARNEBRANT, T. Comparison of the adsorption and activity of lipases from *Humicola lanuginosa* and *Candida antarctica* on solid surfaces. **Langmuir**, v.13, p.3488-3493, 1997.
- WEAVER Jr., L.E.; CARTA, G. Protein adsorption on ion exchangers: comparison of macroporus and gel-composite media. **Biotechnology Progress**, v.12, p.342-355, 1996.
- WENZIG, E.; LINGG, S.; KERZEL, P.; ZEH, G.; MERSMANN, A. Comparison of selected methods for downstream processing in the production of bacterial lipase. **Chemical Engineering & Technology**, v.16, p.405-412, 1993.

- WHEELWRIGHT, S.M. **Protein Purification, Design and Scale up Downstream Processing**. John Wiley & Sons, Inc., New York, p.172-183, 1991.
- YAMAGUCHI, S.; MASE, T. Purification and characterization of monoacylglycerol lipase and diacylglycerol lipase isolated from *Penicillium camembertii* U-150. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.34, n.6, p.720-725, 1991.
- YAN WU, X.; JÄÄSKELÄINEN, S.; LINKO, Y-Y. Purification and partial characterization of *Rhizomucor miehei* lipase for ester synthesis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.59, p.145-158, 1996.
- YON, R.J. Recent developments in protein chromatography involving hydrophobic interactions. **International Journal of Biochemistry**, v.9, p.373-379, 1978.