



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia Química
Área Concentração
Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

**Purificação e Caracterização de Bromelina a Partir do Extrato
Bruto de *Ananas comosus* por Adsorção em Leito Expandido**

Edgar Silveira Campos

Orientador: Elias Basile Tambourgi

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Engenharia Química, como
parte dos requisitos exigidos, para a
obtenção do título de Mestre em
Engenharia Química.

CAMPINAS – SÃO PAULO

Fevereiro, 2007.

Dissertação de Mestrado defendida por Edgar Silveira Campos e aprovada em (dia)
do (mês) de (ano) pela Banca Examinadora constituída pelos doutores:

Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi

Orientador

Prof. Dr. (Titular)

Prof. Dr. (Titular)

Prof. Dr. (Suplente)

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia
Química.

Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi

A todos que diretamente ou indiretamente me ajudaram na realização de meus sonhos...

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, primeiramente, por ter acreditado e ter me dado o suporte necessário nos momentos mais difíceis.

Ao professor Elias Basile Tambourgi, pela preciosa atenção, amizade, pelo bom humor de todos os dias e pela orientação durante o desenvolvimento desta tese.

Ao professor Adilson de Castro Chaves, por ter sido mais que um co-orientador, e sim um amigo e conselheiro.

À professora Ana Lucia Figueiredo Porto, por toda amizade, solidariedade e companheirismo dispensados nos momentos difíceis.

À minha família, Bel, Neto e Vozinha, que tanto me apoiou nos momentos difíceis.

Ao meu pai, Talmo Passos, por estar ao meu lado nos momentos mais preciosos.

Aos amigos Gabriel, Igor, João Paulo, Luciana, pelo companheirismo durante minha estada em Campinas.

Ao professor Roberto Rodrigues Souza, da Universidade Federal de Sergipe, pelo incentivo no início do trabalho.

Ao professor José Carlos Curvelo Santana, pelo apoio e motivação dispensada.

Ao professor Nelson Medeiros de Lima Filho, por sua ajuda no Departamento de Engenharia Química da UFPE.

Aos amigos Goran, Ivanildo e Sílvia, Érika, Pedro, Vanderson, Valquirio, Anne, Neto, P.H., Julião, Goiano, Mayra, Maíra, Doido, George, André e Amaro, e todos os outros que fizeram de minha estada em campinas mais agradável.

Ao Rafael, João, Caíque, Gabriel, Alessandro, Leandro, Alexandre, Fernanda, Clarisse, Maira e todos que fazem parte do dia-a-dia da OVPP.

A Monique Ferraz e Igor Teixeira pela ajuda com os experimentos realizados no LIKA.

Aos alunos dos Laboratórios de Estudos Ambientais e de Biotecnologia da Faculdade de Formação de Professores de Nazaré da Mata – UPE.

“Sucesso é a habilidade de seguir de derrota em derrota sem perder o entusiasmo”

Winston Churchill (1874-1965)

Resumo

A bromelina (E.C. 3.4.22.33) é extraída da infrutescência do abacaxi (*Ananas comosus*), e é utilizada na indústria alimentícia, como amaciante de carnes, e também na indústria farmacêutica. A bromelina está presente nos primeiros estágios do desenvolvimento do fruto, entretanto seus níveis aumentam rapidamente, ficando alto até a maturação do fruto. A Adsorção em Leito Expandido (ALE) é uma técnica cromatográfica para separação e purificação de produtos biológicos diretamente de seu extrato bruto, sem o uso de centrifugação, microfiltração e outros passos primários de clarificação. Esta técnica permite que o extrato bruto seja alimentado na coluna cromatográfica sem tratamento inicial, e enquanto o leito expande, a superfície de contato do adsorvente aumenta, fazendo que a interação com a molécula alvo seja mais efetiva. Este trabalho reporta a adsorção da bromelina em condições de leito expandido, tais como os parâmetros cinéticos de adsorção, a altura do leito, e a velocidade linear. Este trabalho foca também a caracterização parcial da bromelina, descrevendo aspectos tais como efeito da temperatura e pH, e a influência destes parâmetros com o tempo. Foi observado que a atividade enzimática da bromelina aumentou com o aumento da temperatura e com a proximidade do pH neutro. Também foi observado que o aumento de temperatura acima de 65 °C causa uma leve diminuição nos níveis enzimáticos. Após 150 minutos, a bromelina reteve por volta de 50% da atividade inicial. A capacidade máxima de adsorção foi determinada pela isoterma de adsorção de Langmuir, onde os valores estimados para Q_m e kd foram 9,18 U/mL e 0,591 U/mL, respectivamente. O tempo de residência foi reduzido 10 vezes com um incremento no grau de expansão de apenas 2,5 vezes, contudo o número de pratos (N) foi reduzido apenas 2 vezes. O fator de purificação da bromelina foi próximo de 13 vezes. ALE mostrou ser ótima para a purificação de bromelina, e a enzima eluída foi purificada em nível de SDS-PAGE.

Abstract

Bromelain are extracted from *Ananas comosus* infrutescence, and are used in food industry, as a meat softener, and pharmaceutical industry, as well. Bromelain are presented in the early stages of fruit development, however, their levels increase quickly, remaining high until the maturation. Expanded Bed Adsorption (EBA) is a chromatography technique for separation and purification of biological products directly from crude feedstock, without using centrifugation, microfiltration and other clarification prior steps. This technique permits crude feeding into chromatographic column without initial treatment, and as the bed expands, it increases adsorbent surface contact, making interaction with the target molecule more effective. This work reports the adsorption of Bromelain in expanded bed conditions, such as the adsorption kinetics parameters, the bed height, and the flow velocity. This work also focus the partial characterization of bromelain, describing aspects such temperature effect, pH effect, and its influences within time. It was observed a growing enzymatic activity by increasing the temperature level, and with the proximity to neutral pH. It was also observed that increments in temperature over 65 °C cause a little decrease of enzymatic levels. After 150 minutes, bromelain retained 50 % of its initial activity. The maximum adsorption capacity was determined by the adsorption isotherm, where the Q_m and kd values could be estimated, 9.18 U/mL and 0.591 U/mL, respectively. The resident time was reduced 10 fold by increasing the expansion degree 2.5 times; nonetheless the plate value (N) was reduced only 2 fold. The purification factor was about 13 fold. EBA showed to be feasible for purification of bromelain, and the eluted enzyme as SDS-PAGE pure.

Sumário

1. Introdução	1
2. Revisão de Literatura	4
2.1 <i>Downstream Processing</i>	4
2.2 Bromelina	6
2.3 Adsorção em Leito Expandido (ALE)	7
2.3.1 Princípios e Operação da ALE	9
2.3.2 Hidrodinâmica em Colunas de ALE	10
2.3.3 Equilíbrio de Adsorção	13
3. Materiais e Métodos	14
3.1 Extrato Enzimático	14
3.2 Determinação Protéica	14
3.3 Atividade Proteolítica	15
3.4 Efeitos do pH e da Temperatura	15
3.5 Efeitos do pH e da Temperatura na Estabilidade da Bromelina	15
3.6 Cinética de Adsorção em Batelada	15
3.7 Equilíbrio de Adsorção	16
3.8 Coluna de ALE	16
3.9 Determinação da Porosidade do Leito (ϵ)	16
3.10 Distribuição do Tempo de Residência	17
3.11 Purificação da Bromelina	17
3.12 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)	18

3.13 Rendimento da Purificação da Bromelina	18
3.14 Fator de Purificação da Bromelina	18
4. Referências Bibliográficas	19
5. Partial Characterization of Fruit Bromelain (E.C. 3.4.22.33)	27
6. Expanded Bed Adsorption of Bromelain (E.C. 3.4.22.33) from <i>Ananas comosus</i> Crude Extract	39
7. Conclusões	65
8. Sugestões para Trabalhos Futuros	66
Anexos	67
A-1: Método de Determinação de Atividade Proteolítica	65
A-2: Conversão entre fluxo linear (cm/h) e fluxo volumétrico (mL/min) e vice-versa	74

Lista de Figuras

- Figura 01: Fluxograma de um processo de purificação, ilustrando os passos na recuperação e na purificação (Wheelwright, 1991). 5
- Figura 02: Apresentação esquemática da Adsorção em Leito Expandido (Amersham Pharmacia Biotech, 1997) 9
- Figura 03: Fluxograma das Metodologias Utilizadas 14

Lista de Abreviações

ε	= Porosidade da Partícula
ΔP	= Variação de Pressão
μ	= Viscosidade Dinâmica do Fluido
ρ_P	= Densidade da Partícula
ρ_L	= Densidade do Líquido
ALE	= Adsorção em Leito Expandido
A_T	= Área da Seção Transversal da Coluna
C	= Concentração do Adsorbato na Fase Líquida
DTR	= Distribuição do Tempo de Residência
d_P	= Diâmetro da Partícula
$F.P.$	= Fator de Purificação
g	= Gravidade
h	= Altura do Leito
H_0	= Altura do Leito Sedimentado
H_{EXP}	= Altura do Leito Expandido
k_1	= Constante da Reação da Adsorção
k_2	= Constante da Reação de Dessorção
kd	= Constante de Dissociação
m_P	= Massa da Partícula Adsorvente
n	= Coeficiente de Richardson e zaki

N = Número de Pratos

Q = Concentração de Adsorbato na Fase Sólida

Q_m = Capacidade Máxima de Adsorção do Adsorvente

Re_p = Reynolds da Partícula

Re_t = Reynolds Terminal

r_s = Taxa de Reação

SDS-PAGE = Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

U = Velocidade do Fluido

U_m = Velocidade Mínima de Fluidização

U_t = Velocidade Terminal da Partícula

V_s = Volume do Adsorvente

V_L = Volume do Leito

Y = Rendimento

1. Introdução

O abacaxi (*Ananas comosus* L.) é extensivamente cultivado no Havaí, nas Filipinas, no Caribe, Malásia, Austrália, México, África do Sul e no Brasil. O Brasil é o segundo produtor mundial de abacaxi possuindo 45.000 hectares plantados. As principais áreas de cultivo são as regiões amazônica e nordeste, entretanto sua produção abrange todo território nacional (IAC, 2005).

O abacaxi, considerado por muitos como uma fruta inteira, é na verdade uma infrutescência. Diversos frutos independentes se fundem em um único corpo em volta do talo fibroso. O desenvolvimento fisiológico e físico do abacaxi (cv. “Smooth Cayenne”) tem sido extensivamente estudado (Gortner, 1965; Gortner & Singleton, 1965; Singleton, 1965; Singleton & Gortner, 1965). A ampla faixa de constituintes químicos do abacaxi, dependente do estado maturacional do fruto e fatores agronômicos e ambientais foram descritos por Dull (1971) e Kermasha *et al.* (1987).

As bromelinas (antigas E.C. 3.4.22.4 e E.C. 3.4.22.5) são extraídas do abacaxi (*Ananas comosus* L.). A bromelina do talo (E.C. 3.4.22.32) é a cisteína endopeptidase mais abundante do talo do abacaxi e a bromelina do fruto (E.C. 3.4.22.33) é extraída da infrutescência do abacaxi. A bromelina é utilizada em indústrias alimentícias, no processamento de carnes, e utilizada com fins terapêuticos.

Os processos de separação podem ser divididos em quatro passos básicos: remoção de sólidos insolúveis, isolamento do produto, purificação e polimento (Cussler, 1987). Os processos de biosseparação, podem incluir lise celular, centrifugação, cromatografia, secagem, evaporação, extração, separação por membrana e precipitação (Van Brunt, 1985). Embora muitos processos de purificação estejam em uso, não há método definido ou previsto que alguém possa seguir para desenhar um protocolo de biosseparação para uma proteína específica ou produto biológico (Wheelwright, 1989).

Algum método de biosseparação pode requerer uma grande variedade de passos até atingir as diferentes demandas na qualidade do produto final. Entretanto, deve-se limitar o número de passos, além de tirar o máximo de proveito de cada passo. Vê-se uma necessidade de usar o mínimo de passos e tentar tirar o máximo proveito de cada passo. O rápido decaimento na eficiência total dos processos, leva pesquisadores a integrar ou

combinar diferentes passos nas metodologias de biosseparação, o que é conhecido também como intensificação do processo (Wheelwright, 1989).

As características dos sistemas biotecnológicos tornam a biosseparação a parte mais onerosa da produção de biomateriais (Santos *et al.*, 2002). Os valores totais relacionados a biosseparação chegam a mais de 50% nas indústrias biotecnológicas (Spalding, 1991). Desta forma, o desenvolvimento de métodos novos e econômicos de biosseparação é uma área desafiadora.

Por outro lado, o ambiente fisiológico, tal qual células ou tecido intactos fornecem condições apropriadas para a estabilidade protéica. Como consequência, essas condições devem ser mantidas o mais próximo possível durante os processos de biosseparação. Infelizmente, este ambiente é mudado bruscamente nos processos de recuperação, o que leva um efeito negativo na estabilidade protéica. Além dos fatores químicos, tais quais pH, força iônica, propriedades redutoras, concentração de proteínas e cofatores, os aspectos físicos, tais como tempo, temperatura, aspectos de superfície e de pressão também possuem um importante papel na estabilidade das moléculas alvo.

A adsorção em leito expandido é a intensificação de processo comentada e uma boa alternativa para ser usada nas etapas iniciais de biosseparação, já que permite que as moléculas alvo sejam separadas do meio de cultura ou extrato bruto sem a necessidade de clarificação inicial ou equipamento de clarificação, provendo um aumento do rendimento global, diminuição do tempo total do processo (Suding & Tomusiak, 1993), custo de trabalho reduzido (Batt *et al.*, 1995), diminuição do custo total e gasto de capital (Schmidt *et al.*, 1993) e diminuindo o tempo em que a molécula alvo fica em contato com condições desfavoráveis.

A adsorção em leito expandido é baseada na fluidização estável e controlada, deste modo, combinando as propriedades hidrodinâmicas de um leito fluidizado com as propriedades cromatográficas de um leito empacotado. Segundo o princípio do leito expandido, ou seja, formação de fluidização estável com o mínimo de agitação e sem turbulência no leito, permitem a formação de várias unidades de transferência de massa ou muitos pratos teóricos no leito expandido, mimetizando o desempenho de uma cromatografia tradicional em leito empacotado.

As propriedades da adsorção em leito expandido fazem dela um estado da arte no que se trata de etapas de captura na recuperação inicial de uma biomolécula a partir de um extrato impuro. Os passos de clarificação, concentração e purificação inicial podem ser combinados em um único passo de purificação.

2. Revisão de Literatura

2.1 *Downstream Processing*

Nos últimos anos vê-se uma crescente pressão econômica na produção de produtos biotecnológicos. Desta forma, bioprocessos em geral, especialmente os processos de separação e recuperação, também denominados de *downstream processing*, enfrentam uma forte demanda na intensificação e integração dos passos processuais para aumentar o rendimento, reduzir o tempo de processo e cortar os custos e gastos excessivos de capital.

Nos Estados Unidos, o gasto no setor biotecnológico chega a US\$ 400 bilhões para produtos químicos e US\$ 800 bilhões para as indústrias alimentícias e mais de US\$ 1 trilhão nas indústrias de biomateriais (Simon & Kotler, 2003).

As características dos sistemas biotecnológicos tornam a purificação a parte mais onerosa do processo de produção de um biomaterial (Santos *et al.*, 2002). Spalding (1991) comenta valores acima de 50% do custo total dos processos nas indústrias biotecnológicas estão relacionados aos processos de purificação, podendo comprometer até 80% do custo total.

As etapas de purificação de bioprodutos são tão ou mais desafiadoras que o estudo e o desenvolvimento da etapa de cultivo, pois não há processos de purificação geral (Pessoa-Jr. & Kilikian, 2005). O desenvolvimento de um processo de purificação de proteínas em grande escala é um método evolucionário que recai, onde possível, em um processo existente e aplica uma série de regras gerais para o desenvolvimento de vários passos para efetivar a purificação (Wheelwright, 1991).

A Figura 01 descreve o percurso de um processo de purificação genérico. A definição de *downstream process* inclui tudo após a síntese do produto. Os vários estágios de purificação tem sido descritos diferentemente por vários autores (Belter *et al.*, 1988; Lightfoot *et al.*, 1987), mas eles são normalmente categorizados em recuperação, purificação de baixa resolução e purificação de alta resolução.

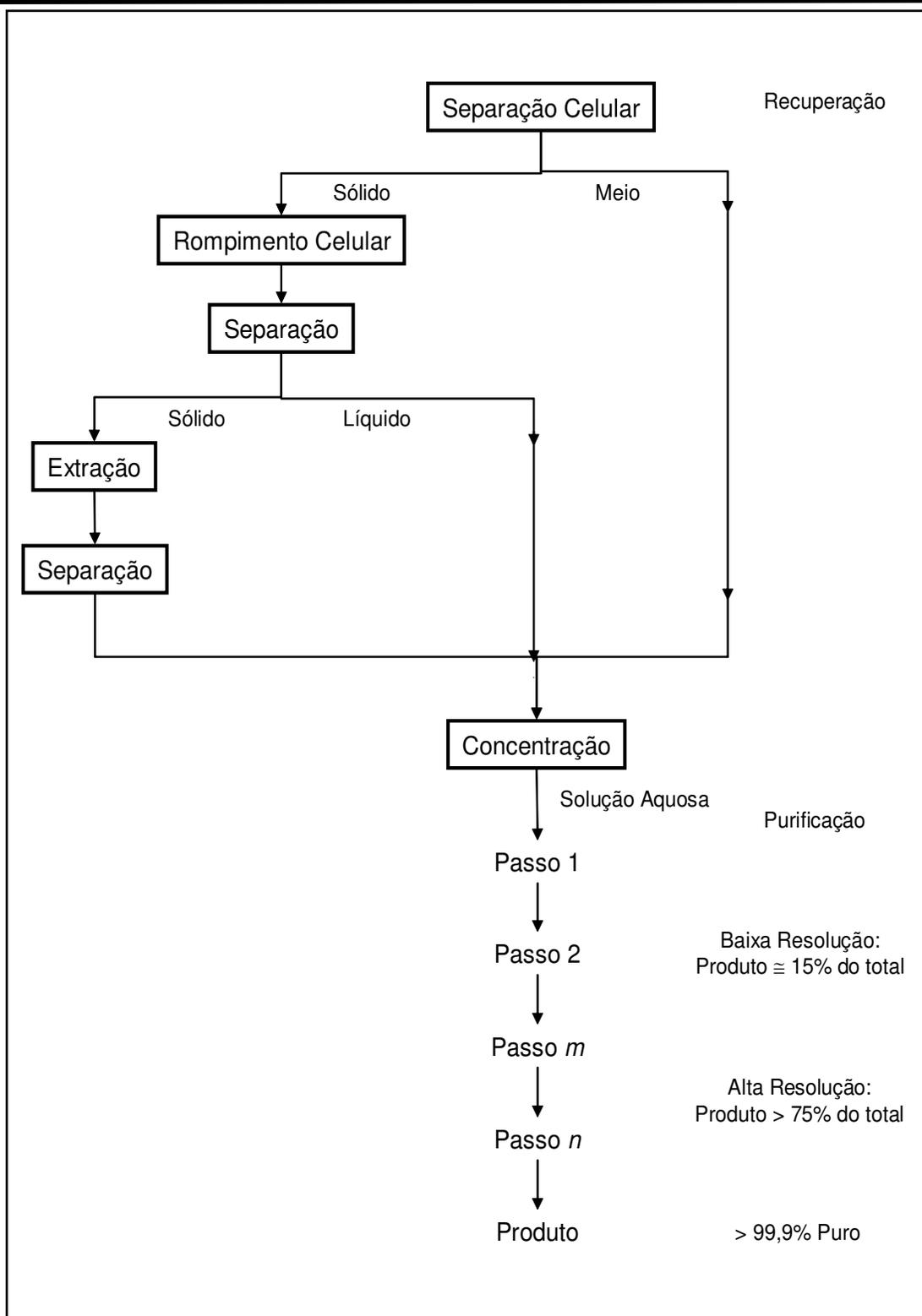


Figura 01: Fluxograma de um processo de purificação, ilustrando os passos na recuperação e na purificação (Wheelwright, 1991).

2.2 Bromelina

O abacaxi (*Ananas comosus L.*) é extensivamente cultivado no Brasil, o qual é o segundo produtor mundial de abacaxi possuindo 45.000 hectares plantados. As principais áreas de cultivo são as regiões amazônica e nordeste, entretanto sua produção abrange todo território nacional (IAC, 2005). O abacaxi, considerado por muitos como uma fruta inteira, é na verdade uma infrutescência. Diversos frutos independentes se fundem em um único corpo em volta do talo fibroso. O desenvolvimento fisiológico e físico do abacaxi (cv. “Smooth Cayenne”) tem sido extensivamente estudado (Gortner, 1965; Gortner & Singleton, 1965; Singleton, 1965; Singleton & Gortner, 1965). A ampla faixa de constituintes químicos do abacaxi, dependente do estado maturacional do fruto e fatores agrônômicos e ambientais foram descritos por Dull (1971) e Kermasha *et al.* (1987).

Os cultivares “Smooth Cayenne” e “Red Spanish”, os mais cultivados no Brasil, possuem pH semelhante, em torno de 3,5, entretanto possuem acidez titulável de 0,93 e 1,17 (g de ácido cítrico/100 g de peso fresco) respectivamente. A quantidade de proteínas solúveis entre os dois cultivares também apresenta semelhança, aproximadamente 0,25 mg/g (Bartolomé *et al.*, 1995).

As bromelinas (antigas E.C. 3.4.22.4 e E.C. 3.4.22.5) são extraídas do abacaxi (*Ananas comosus L.*). A bromelina do talo (E.C. 3.4.22.32) é a cisteína endopeptidase mais abundante no talo do abacaxi. A bromelina é utilizada em indústrias alimentícias, no processamento de carnes, e utilizada com fins terapêuticos onde tem ação comprovada na inibição da agregação plaquetária (Rowan *et al.*, 1990); atividade fibrinolítica (Taussig & Nieper, 1979); ação anti-inflamatória (Harrach *et al.*, 1995); ação anti-tumoral (Jeung & Foster, 1980); modulação de citocininas e do sistema imune (White *et al.*, 1988); adjuvante na absorção de drogas (Morita *et al.*, 1979); propriedade mucolíticas (Livio *et al.*, 1978); assistência na digestão (De-Giuli & Pirota, 1978); adjuvante na cicatrização (Inoue *et al.*, 1994); e aumento na capacidade cardio-respiratória (Uhlrig & Seifert, 1981).

A bromelina do talo possui especificidade na clivagem de proteínas, entretanto apresenta uma maior atividade na clivagem de Z-Arg-Arg-|-NHMeC dentre outros substratos pequenos (Hatano *et al.*, 1998; Harrach, *et al.*, 1998; Hatano *et al.*, 2002; Haq & Rasheedi, 2002; Rasheedi *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2003; Gaspani *et al.*, 2002). A

bromelina do fruto (E.C. 3.4.22.33) é extraída da infrutescência do abacaxi. Possui especificidade ampla para ligações peptídicas. O substrato sintético Bz-Phe-Val-Arg-NHMec é um ótimo substrato para esta bromelina, ao contrário de Z-Arg-Arg-NHMec, o qual, diferentemente da bromelina do talo, a bromelina do fruto não apresenta atividade alguma (Maurer, 2001).

A bromelina do talo é quimicamente conhecida desde 1876, entretanto, só foi introduzida como composto terapêutico em 1957. Possui seqüência de aminoácidos variando de 212 (van Kuik *et al.*, 1986; Ritonja *et al.*, 1989) a 315 aminoácidos (Muta *et al.*, 1993), e peso molecular variando de aproximadamente 23 kDa (Wharton, 1974; Harrach *et al.*, 1995; Harrach *et al.*, 1998) a 35-37 kDa (Silverstein & Kezdy, 1975; Suh *et al.*, 1992). Seu sítio ativo está nos aminoácidos 26 e 158, apresentando três pontes dissulfeto e uma seqüência de carboidratos ligados ao aminoácido 117, para a bromelina de 212 aminoácidos (van Kuik *et al.*, 1986; Ritonja *et al.*, 1989), já para a enzima de 315 aminoácidos, seu sítio ativo está nos aminoácidos 147 e 279, apresentando também três pontes dissulfeto, mas nenhuma seqüência de carboidratos (Muta *et al.*, 1993).

A bromelina do talo apresenta ponto isoelétrico a 9,5 (Feinstein & Whitaker, 1964), já a bromelina do fruto apresenta ponto isoelétrico a 4,6 (Murachi, 1976). A desnaturação térmica da bromelina do talo é um processo irreversível e aparenta seguir um mecanismo simples em duas fases (Arroyo-Reyna & Hernandez-Arana, 1995).

As bromelinas estão presentes nos primeiros estágios do desenvolvimento dos frutos da *Ananas comosus*, porém seu nível aumenta rapidamente, mantendo-se elevado até o amadurecimento, onde tem um pequeno decréscimo. Este decréscimo na atividade não é acompanhado por mudança correspondente na concentração de proteínas totais (Murachi, 1976).

2.3 Adsorção em Leito Expandido (ALE)

O uso da Adsorção em Leito Expandido teve início no fim da década de 1940 e início da década de 1950, principalmente para uso ambiental, com poucas aplicações na

biotecnologia (purificação de proteínas em particular). Barthels *et al.* (1958) descreveu o uso da adsorção em leito expandido para a purificação de streptomina em uma resina de troca-catiônica, mas devido ao fato de haver grandes flutuações na viscosidade do caldo não foi possível utilizar a coluna em taxas de fluxo econômico sem exceder a velocidade de assentamento terminal das partículas da resina (Thelen & Ramirez, 1997).

Buijs & Wesselingh (1980) tentaram estabilizar o leito em um processo tipo cascata, onde o leito foi dividido em compartimentos, cada um trabalhando como um leito fluidizado individual. Quando estes compartimentos foram considerados juntos, houve um aumento da eficiência global do leito. Outras técnicas, empregadas para estabilização do leito, são encontradas na literatura, sendo que a maior parte baseia-se no uso de partículas adsorventes magnetizadas (Chetty & Burns, 1991; Terranova & Burns, 1991), havendo, porém, dificuldades para o aumento de escala (Hjorth *et al.*, 1995).

Entretanto, vê-se um crescente interesse de pesquisadores, no início da década de 1990, na aplicação da técnica de adsorção em leito expandido para recuperar e purificar proteínas de soluções contendo ou não material particulado (Chase e Draeger, 1992; Chang *et al.*, 1993; Frej *et al.*, 1994; Batt *et al.*, 1995; Pessoa *et al.*, 1996; Owen & Chase, 1997; Clemmitt *et al.*, 1998; Lihme *et al.*, 1998; Mattiasson & Nandakumar, 1998; Fernandez-Lahore *et al.*, 2000; Palsson *et al.*, 2001; Cabanne *et al.*, 2004; Hidayat *et al.*, 2004; Kalil *et al.*, 2005; de Lamotte, 2005).

A principal vantagem na utilização da adsorção em leito expandido, sobre a técnica cromatográfica tradicional em leito fixo, é que a coluna pode ser alimentada com solução contendo células ou resíduos celulares em suspensão sem a necessidade de remoção prévia das mesmas, reduzindo assim o número de etapas no processo e evitando a perda da atividade da biomolécula alvo devido à ação de proteases presentes, ácidos nucléicos, etc.

A Figura 02 ilustra o princípio de funcionamento do processo de adsorção em leito fixo e expandido. Operando em leito fixo, o material particulado bloqueia a coluna, entretanto, ao ser operado de uma forma expandida o material particulado passa pelo leito sem haver a obstrução da coluna.

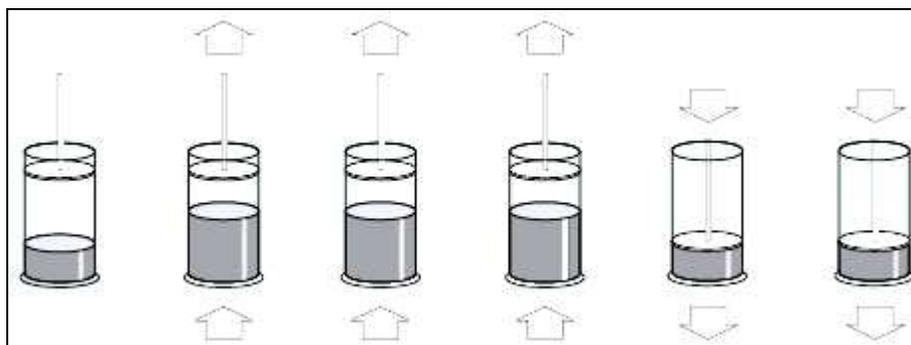


Figura 02: Apresentação esquemática da Adsorção em Leito Expandido (Amersham Pharmacia Biotech, 1997)

As partículas adsorventes utilizadas na adsorção em leito expandido possuem uma distribuição do tamanho e de densidade. Essa distribuição provoca o fenômeno de segregação no leito. Este comportamento dá estabilidade ao leito e faz com que na adsorção em leito expandido o fluido apresente um comportamento mais próximo de um regime empistonado (*plug flow*).

2.3.1 Princípios e Operação da ALE

A adsorção em leito expandido baseia-se na fluidização. Desta forma, partindo de um leito fixo e aumentando a vazão do fluido, atinge-se uma velocidade na qual a força de arraste iguala-se ao peso das partículas, ou seja, a força de arraste iguala-se a queda de pressão em uma determinada área transversal. Então, um leito fluidizado estável é formado quando as partículas adsorventes são suspensas devido ao equilíbrio entre a velocidade de sedimentação e a velocidade do fluido ascendente. Esta técnica opera em condições “suaves” de fluidização, ocasionada pela segregação das partículas adsorventes e caracterizada por um baixo Re_p (Reynolds da partícula) da ordem de 0,5 – 1,0, aumentando então a eficiência da ligação adsorvente-proteína.

O modo de operação em leito expandido difere um pouco dos processos cromatográficos convencionais, uma vez que se opera com uma maior porosidade do leito, da ordem de 0,7 a 0,8, quando comparado com os processos de leito fixo cujos valores típicos de porosidade do leito (ε) são de aproximadamente 0,4.

Na adsorção em leito expandido, o equilíbrio entre o sistema tamponante e o adsorvente é realizado com fluxo ascendente e com leito na forma expandida. No equilíbrio, o volume de fluido aplicado ao leito é geralmente cinco vezes o volume do leito empacotado do adsorvente.

Após o equilíbrio, segue-se a etapa de aplicação do material contendo células, restos celulares e/ou material particulado. Como as propriedades físicas do material aplicado são diferentes do tampão de equilíbrio, particularmente uma maior viscosidade, o leito expandirá se a velocidade linear não diminuir. Sabendo que o material particulado possui uma velocidade de sedimentação muito menor que do adsorvente, o material particulado deixa a coluna, onde as moléculas alvo são retidas por interação com o adsorvente.

Depois, uma etapa intensiva de lavagem faz-se necessária para remover o material particulado e proteínas fracamente adsorvidas. Em seguida, a eluição é realizada em modo sedimentado. Alguns componentes podem continuar ligados devido às condições de lavagem e eluição escolhidas. Devido a remoção de componentes indesejáveis seguir um declínio exponencial, passa-se por um processo chamado de *cleaning-in-place*, com soluções, tais como 1 M NaOH e 2 M NaCl, em baixa velocidade superficial, para que haja descontaminação e regeneração do adsorvente (Amersham Pharmacia Biotech, 1997).

2.3.2 Hidrodinâmica em Colunas de ALE

O conhecimento do comportamento do leito em função das propriedades físicas das partículas e do fluido é de fundamental importância para todo o procedimento de adsorção por leito expandido. Essa caracterização ocorre principalmente medindo-se a expansão do leito em função da velocidade do fluido, ou observando-se a influência de outros fatores como distribuição de tamanho de partículas, viscosidade do fluido, presença de células, ligação proteína-adsorvente e concentração da molécula alvo, etc. O sucesso da purificação de proteínas depende crucialmente da habilidade do sistema em produzir um leito com expansão estável (Chase & Draeger, 1992). Esta condição é fundamental, para que se possa realizar um aumento de escala, partindo-se dos resultados obtidos em laboratório.

No estudo da estabilidade do leito deve-se conhecer qual o efeito da velocidade do fluido na expansão. Desta forma, como a adsorção em leito expandido é baseada na fluidização, é comum correlacionar a expansão do leito devido a sua vazão usando a equação de Richardson e Zaki (2) (1954).

Em uma velocidade superficial muito baixa, o leito sedimentado comporta-se como um leito empacotado com o fluxo passando no volume intersticial do leito sedimentado. O aumento da velocidade de fluxo causa um relaxamento no leito sedimentado, a partir da velocidade mínima de fluidização, U_m , caracterizando a transição entre o estado sedimentado e fluidizado. Com o crescente aumento da velocidade superficial, todas as partículas são suspensas sem ter contato permanente com outras partículas. No ponto de relaxamento, a pressão da coluna está em equilíbrio com a força de arraste das partículas adsorventes:

$$\Delta P = (1 - \varepsilon)(\rho_p - \rho_l)gh(\varepsilon) \quad (1)$$

onde, ΔP é a variação de pressão, ε é a porosidade do leito, ρ_p é a densidade da partícula, ρ_l é a densidade do líquido, g é a gravidade, e h é a altura da coluna.

Richardson e Zaki (1954) estudaram a sedimentação e fluidização de vidro, divinil-benzeno e balas de chumbo usando soluções como cloreto de sódio, M-cresol, bromofórmio e glicerol e obtiveram uma equação que relaciona a velocidade do fluido (U) e a velocidade terminal da partícula (U_t), com a porosidade do leito (ε):

$$\frac{U}{U_T} = \varepsilon^n \quad (2)$$

sendo que o índice de expansão n é uma função do número de Reynolds terminal (Re_t):

$$Re_t = \frac{d_p \rho_L U_T}{\mu} \quad (3)$$

onde d_p é o diâmetro da partícula e o μ é a viscosidade dinâmica do fluido.

A velocidade terminal da partícula é descrita pela Lei de Stokes, quando Re_p for menor que 0,1, representada na equação (4):

$$U_T = \frac{gd_p^2(\rho_p - \rho_l)}{18\mu} \quad (4)$$

Onde são vistos os parâmetros que são cruciais na fluidização das partículas. Principalmente o diâmetro e a densidade da matriz que controlam a velocidade terminal em um leito fluidizado.

Já a porosidade (ε) é relacionada com a altura do leito (H):

$$\varepsilon = 1 - \frac{V_s}{V_L} = 1 - \frac{V_s}{A_T H} = 1 - \frac{m_p}{\rho_p A_T H} \quad (5)$$

onde V_s é o volume do adsorvente, V_L é o volume do leito e A_T é a área da seção transversal da coluna.

Na equação (2), a porosidade da matriz (ε) e o coeficiente de Richardson e Zaki (n) são relacionados com a razão entre a velocidade superficial do fluido (U) e a velocidade terminal de uma partícula (U_T).

A porosidade pode também ser calculada por:

$$\varepsilon = 1 - \left((1 - \varepsilon_0) \cdot \left(\frac{H_0}{H_{EXP}} \right) \right) \quad (6)$$

Em um leito sedimentado, a porosidade (ε_0) é aproximadamente 0,4. H_0 é a altura do leito sedimentado.

O trabalho de Richardson e Zaki (1954) é uma referência para o estudo hidrodinâmico dos leitos fluidizados, e a equação (1) é usada sem modificações na literatura para descrever o comportamento do leito expandido, ajustando-se bem com dados obtidos (Dasari *et al.*, 1993; de Luca *et al.*, 1994; Thommes *et al.*, 1995).

2.3.2 Equilíbrio de Adsorção

Moléculas de elevada massa molar, como proteínas, são adsorvidas na superfície, limitando a transferência de massa no interior da partícula. Deste modo, a velocidade de adsorção é dada pela velocidade da reação de dessorção, conforme equação (7):

$$r_s = \frac{dQ}{dt} = k_1 C(Q_m - Q) - k_2 Q \quad (7)$$

onde, C é a concentração do adsorbato na fase líquida; Q é concentração do adsorbato na fase sólida; Q_m é a capacidade máxima de adsorção do adsorvente; k_1 constante da reação de adsorção; e k_2 é a constante da reação de dessorção.

No equilíbrio, as velocidades de adsorção e dessorção igualam-se e tem-se a equação (8):

$$\frac{dQ}{dt} = 0 = k_1 C^*(Q_m - Q) - k_2 Q^* \quad (8)$$

O rearranjo da equação (7) leva a isoterma de Langmuir, equação (8), a qual representa a concentração da molécula-alvo adsorvida (Q^*) em função da concentração em solução (C^*), no equilíbrio, tendo como parâmetros Q_m (concentração máxima que a fase sólida pode adsorver) e kd (k_2/k_1), constante de dissociação, constante esta que reflete o grau de afinidade entre o adsorvente e o adsorbato.

$$Q^* = Q_m \frac{C^*}{kd + C^*} \quad (9)$$

3. Materiais e Métodos

Os métodos utilizados seguiram o fluxograma apresentado na Figura 03:

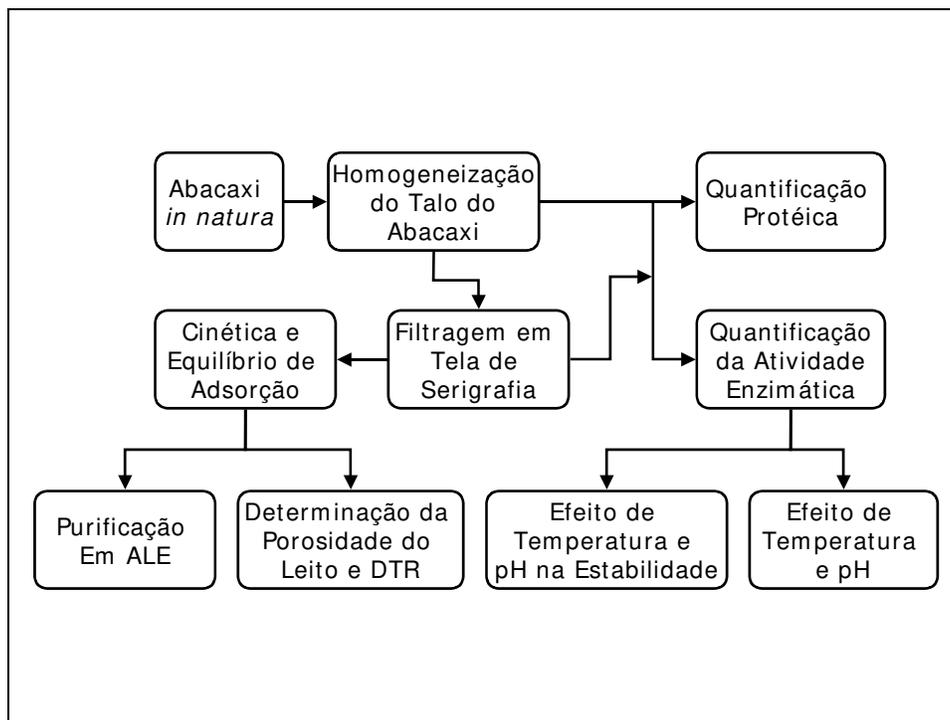


Figura 03: Fluxograma das Metodologias Utilizadas

3.1 Extrato Enzimático

O extrato enzimático foi obtido a partir da infrutescência do abacaxi (*Ananas comosus*). O fruto e talo do abacaxi foram processados em liquidificador e posteriormente filtrado em malha de serigrafia para remoção das fibras do tecido vegetal.

3.2 Determinação Protéica

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método descrito por Deutscher (1990). As proteínas absorvem luz ultravioleta por duas vias principais: a 210 nm, ocorre a absorção de luz pelas ligações peptídicas e a 280 nm ocorre a absorção de luz pelos grupamentos aromáticos presentes na cadeia lateral do triptofano, tirosina e fenilalanina.

3.3 Atividade Proteolítica (Bromelina)

A atividade proteolítica da bromelina foi estimada de acordo com o método de Kunitz (1947) e Walter (1984) modificado, usando caseína 2% (p/v) em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,5) como substrato. 0,2 mL de amostra foi adicionada a um tubo contendo 2,5 mL de solução de caseína, onde ficou por 10 minutos em repouso a 37 °C, a reação foi interrompida pela adição de 5 ml de ácido tricloroacético por 10 minutos. Após centrifugação, foi lida a absorbância do sobrenadante a 280 nm.

3.4 Efeitos do pH e da Temperatura

A atividade da bromelina foi mensurada em diferentes valores de pH e temperatura, sob condições ambientais de temperatura usando a caseína como substrato. O efeito do pH na atividade enzimática foi medido usando diferentes tampões, tais como: tampão citrato-fosfato 0,1 M (pH 4,0 a 6,0) e tampão fosfato 0,1 M (pH 6,0 a 8,0). O efeito da temperatura foi determinado variando a temperatura de incubação de 25 a 70 °C sob condições padrões de pH.

3.5 Efeito do pH e da Temperatura na Estabilidade da Bromelina

O extrato enzimático foi incubado a 37 °C em diferentes tampões (citrato-fosfato e fosfato) por um período de tempo de 30 a 150 minutos. O extrato enzimático foi incubado sob diferentes condições de temperatura (de 25 a 55 °C) pelo mesmo período a pH constante (pH 7,5). A atividade da bromelina foi mensurada em intervalos de tempo de 30 minutos, usando a caseína como substrato a 37 °C.

3.6 Cinética de Adsorção em Batelada

Foram utilizados 5 mL de resina Amberlite IRA 410 (Vetec, Brasil), previamente equilibrada em tampão acetato 100 mM (pH 4,5) e tampão Tris-HCl 100 mM (pH 9,5) para as bromelinas do talo e do fruto, respectivamente. Em diferentes frascos, foram distribuídos 25 mL de solução enzimática como descrito na Tabela 01.

Tabela 01 – Condições dos ensaios cinéticos de adsorção de Bromelina em Amberlite IRA 410 em batelada

Conteúdo do Reator	Fracos		
	A	B	C
Extrato Bruto pH 4,5 (mL)	10	17,5	25
Tampão Acetato 100 mM (mL)	15	12,5	-
Resina (mL)	5	5	5
Atividade inicial (Talo / Fruto) (U/mL)	2,5	1,72	1,22

3.7 Equilíbrio de Adsorção

Foram utilizados 2 mL de adsorvente Amberlite IRA 410 pré-equilibrado, o qual foi adicionado a frascos contendo 20 mL de solução tamponada com concentrações diferentes do extrato protéico. Os frascos foram agitados em agitador orbital por 2 horas a 25 °C. A suspensão foi centrifugada e foi medida a atividade enzimática do sobrenadante. A quantidade de enzima adsorvida foi calculada através de balanço de massa no reator e usando a equação (7) para calcular os parâmetros k_d e Q .

3.8 Coluna de ALE

Foi utilizada uma coluna de vidro (diâmetro interno de 10 mm) de 40 cm de altura contendo um pistão ajustável no topo para minimizar o efeito de coluna d'água, com a entrada de alimentação na parte inferior da coluna e uma saída na parte superior. Um distribuidor foi inserido na parte inferior da coluna para evitar a perda de adsorvente. Uma régua foi colocada ao lado da coluna para medir a altura do leito.

3.9 Determinação da Porosidade do Leito (ϵ)

A porosidade do leito foi obtida pela substituição dos dados de massa específica (ρ_p) e massa da partícula adsorvente (m_p), área da base da coluna (A_T) e altura do leito (H) na equação (5) (Fernandez-Lahore *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2000).

3.10 Distribuição do Tempo de Residência (DTR)

Tampão fosfato a 0,1 M (pH 7,0) foi usado como tampão fluidizante, o leito foi fluidizado até atingir uma altura pré-determinada (1,5; 2,0; e 2,5 vezes a altura inicial). Uma solução de acetona (2,5 % p/v) foi usada como traçador. A solução tampão contendo acetona foi aplicada até que a absorvância em UV atingiu o máximo e então, a solução foi trocada por tampão puro e as amostras foram coletadas na saída da coluna em diferentes intervalos de tempo. As curvas de DTR foram obtidas pelo método de pulso negativo (Amersham Pharmacia Biotech, 1997). Pode-se acessar os valores de números de pratos (N) e dispersão axial (D_{axial}) utilizando as seguintes equações:

$$N = \frac{t^2}{\sigma^2} \quad (10)$$

$$HETP = \frac{H}{N} \quad (11)$$

$$HETP = \frac{UH}{2\varepsilon D_{axial}} \quad (12)$$

onde t é a metade do tempo de residência, σ é o desvio padrão e $HEPT$ é a altura equivalente a um prato teórico.

3.11 Purificação de Bromelina

A Adsorção em Leito Expandido foi realizada em condições de laboratório e pH 7,5. A resina adsorvente foi pré-equilibrada na altura expandida a ser trabalhada, com tampão fosfato 0,1 M. A altura do leito (4 cm sedimentada) foi expandida a 6,0; 8,0; e 10 cm, correspondendo a um grau de expansão de 1,5; 2,0; e 2,5 respectivamente. Então, 25 mL de solução enzimática (extrato bruto e diluído) em tampão fosfato a pH 7,5 foram aplicados a coluna para que ocorresse a adsorção da bromelina na resina de troca-iônica Amberlite IRA 410. A eluição foi realizada em gradiente em degrau variando a concentração de NaCl de 0,1 a 0,5 M a uma velocidade linear de 0,95 mL/min em um fluxo contrário a adsorção. A atividade da bromelina e concentração de proteína foram medidas em durante todo o processo de adsorção, lavagem e eluição.

3.12 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada em condições desnaturantes e redutoras em gel de corrida de 15%. As amostras foram corridas por 3 horas a 30 mA até que a linha de base chegasse ao fim do gel. O gel foi imediatamente corado com nitrato de prata de acordo com a metodologia descrita por Hochstrasser et al. (1988a; 1988b).

3.13 Rendimento da Purificação da Bromelina

O rendimento foi determinado pela razão entre a atividade enzimática da bromelina eluída e a atividade enzimática da bromelina no extrato bruto:

$$Y = \frac{[Enzima]_{eluição}}{[Enzima]_{bruto}} \quad (13)$$

3.14 Fator de Purificação da Bromelina

O fator de purificação foi definido pela a razão entre a concentração de proteína específica e proteína total no produto final, dividido pela mesma razão determinada para o extrato impuro.

$$F.P. = \frac{([Enzima]/[Proteína])_{inicial}}{([Enzima]/[Proteína])_{final}} \quad (14)$$

4. Referências Bibliográficas

- Arroyo-Reyna, A. & Hernández-Arana, A. *Biochim. Biophys. Acta* 1248, 12, 1995.
- Amersham Pharmacia Biotech. *EBA Handbook: Principles and Methods*. Uppsala, ISBN 91-630-5519-8, 1997.
- Barthels, C.R.; Kleiman, G.; Korzun, J.N.; Irish, D.B. A novel ion-exchange method for the isolation of streptomycin. *Chem. Engng. Prog.* 54, 49-51, 1958.
- Bartolomé, A.P.; Rupérez, P.; Fúster, C. Pineapple fruit : morphological characteristics, chemical composition and sensory analysis of Red Spanish and Smooth Cayenne cultivars. *Food Chemistry*. 53, 75-79. 1995.
- Batt, B.C.; Yabannavar, V.M.; Singh, V. Expanded bed process for protein recovery from whole mammalian cell culture broth. *Bioseparation*. 5, 41-52, 1995.
- Belter, P.A.; Cussler, E.L. Hu, W.S. *Bioseparation: Downstream Processing for Biotechnology*. John Wiley & Sons: New York. 1988. 368p.
- Buijs, A.; Wesselingh, J.A. Batch fluidized ion-exchange column for streams containing suspended particles. *Journal of Chromatography A*. 210, 319-327, 1980.
- Cabanne, C.; Noubhani, A.M.; Dieryck, W.; Hocquelliet, A.; Santarelli, X. Evaluation of three expanded bed adsorption anion exchange matrices with the aid of recombinant enhanced green fluorescent protein overexpressed in *Escherichia coli*. *Journal of Chromatography B*. 808, 91-97, 2004.
- Chang, Y.K.; MacCreath, G.E.; Draeger, N.M.; Chase, H.A. Novel technologies for direct extraction of proteins. *Trans. Inst. Chem. Engs.* 71, 299-303, 1993.
- Chase, H.A. & Draeger, N.M. Affinity purification of proteins using expanded beds. *Journal of Chromatography A*. 597, 129-145, 1992.
- Chetty, A.S.; Burns, M.A. Continuous protein separations in a magnetically stabilized fluidized bed using nonmagnetic supports. *Biotechnology and bioengineering*. 38, 963-971, 1991.

Clemmitt, R.H.; Bruce, L.J.; Chase, H.A. On-line monitoring of the purification of GST-(His)(6) from an unclarified *Escherichia coli* homogenate within an immobilised metal affinity expanded bed. *Bioseparation*. 8, 53-67, 1998.

Cussler, L. *Diffusion: mass transfer in fluid systems*. Cambridge University Press, Cambridge, 1987, 580p.

Dasari, G.; Prince, I.; Hearn, M.T.W. High performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins, CXXIV. Physical characterization of fluidized-bed behavior of chromatographic packing materials. *Journal of Chromatography A*, 631, 115-124, 1993.

Deutscher, M. P. Guide to protein purification. *Method. Enzymol.* 1990, 182p.

De-Giuli, M. & Pirota, F. Bromelain: interaction with some protease inhibitors and rabbit specific antiserum. *Drugs Exp Clin Res.* 4, 21-23, 1978.

de Lamotte, F. Single step purification of a series of wheat recombinant proteins with expanded bed absorption chromatography. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 818, 29-33, 2005.

de Luca, L.; Hellenbroich, D.; Titchener-Hooker, N.J.; Chase, H.A. A study of the expansion characteristics and transient behavior of expanded beds of adsorbent particles suitable for bioseparations. *Bioseparation*, 4, 311-318, 1994.

Draeger, M.N. & Chase, H.A. Liquid fluidized beds for protein purification. *I. Chem. Eng. Symp.* 1990.

Dull, G.G. The pineapple: general. In: Hulme, A.C. *The biochemistry of fruits and their products*. Vol 2.. Academic Press, London, pp. 303-331. 1971.

Fernandez-Lahore, H.M.; Geilenkirchen, S.; Boldt, K.; Nagel, A.; Kula, M.R.; Thommes, J. The influence of cell adsorbent interactions on protein adsorption in expanded beds. *Journal of Chromatography A*. 873, 195-208, 2000.

Feinstein, G. & Whitaker, J.R. *Biochemistry* 3, 1050. 1964.

Frej, A-K.B.; Hjorth, R.; Hammarstrom, A. Pilot scale recovery of recombinant annexin V from unclarified *Escherichia coli* homogenate using expanded bed adsorption. *Biotechnology and bioengineering*. 44, 922-929, 1994.

Gaspani, L; Limiroli, E; Ferrario, P; Bianchi, M. In vivo and in vitro effects of bromelain on PGE(2) and SP concentrations in the inflammatory exudate in rats. *Pharmacology* 65, 83-86, 2002.

Gortner, W.A. Chemical and physical development of the pineapple fruit IV: plant pigment constituents. *J. Food Sci.*, 30, 36-2, 1965.

Gortner, W.A.; Singleton, V.L. Chemical and physical development of the pineapple fruit III: Nitrogenous and enzymes constituents. *J. Food Sci.*, 30, 24-9, 1965.

Haq, S.K.; Rasheedi, S.; Khan, R.H. Characterization of a partially folded intermediate of stem bromelain at low pH. *Eur. J. Biochem*. 269, 47-52, 2002.

Harrach, T.; Eckert, K.; Schulze-Forster, K.; Nuck, R.; Grunow, D.; Maurer, H.R. Isolation and partial characterization of basic proteinases from stem bromelain. *J. Protein Chem*. 14, 41-52, 1995.

Harrach, T; Eckert, K; Maurer, HR; Machleidt, I; Machleidt, W; Nuck, R. Isolation and characterization of two forms of an acidic bromelain stem proteinase. *J. Protein Chem*. 17, 351-361, 1998.

Hatano, K.; Tanokura, M.; Takahashi, K. The amino acid sequences of isoforms of the bromelain inhibitor from pineapple stem. *J. Biochem*. 124, 457-461, 1998.

Hatano, K.; Sawano, Y.; Tanokura, M. Structure-function relationship of bromelain iso-inhibitors from pineapple stem. *Biol. Chem*. 383, 1151-1156, 2002.

Hidayat, C.; Takagi, M.; Yoshida, T. Expanded bed adsorption for purification of alcohol dehydrogenase using a dye-iminodiacetic acid matrix. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 97, 284-287, 2004.

Hjorth, R; Kampe, S.; Carlsson, M. Analysis of some operating parameters of novel adsorbents for recovery of proteins in expanded beds. *Bioseparation*. 5, 217-223, 1995.

Hochstrasser, D. F., Patchornik, A., and Merrill, C. R. Development of polyacrylamide gels that improve the separation of proteins and their detection by silver staining. *Analyt. Biochem.* 173, 412–423, 1998a.

Hochstrasser, D. F. and Merrill, C. R. ‘Catalysts’ for polyacrylamide gel polymerization and detection of proteins by silver staining. *Appl. Theor. Electrophoresis* 1, 35–40, 1998b.

Inoue K, *et al.* Effect of etodolac on prostaglandin E2 biosynthesis, active oxygen generation and bradykinin formation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 51, 457-462, 1994.

IAC. Instituto Agrônômico de Campinas.
<http://www.iac.sp.gov.br/Cultivares/Folders/Abacaxi/IACGomo-de-Mel.asp>. Acessado em 29/06/2005.

Jeung A. & Foster, S. *Encyclopedeia of Common Natural Ingredients Used in Foods, Drugs, and Cosmetics*. New York, NY: John Wiley & Sons. 1980. 688p.

Kalil, S.J.; Maugeri-Filho, F.; Rodrigues, M.I. Ion exchange expanded bed chromatography for the purification of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus*. *Process Biochemistry*. 40, 581-586, 2005.

Kermasha, S.; Barthakur, N.N.; Alli, I.; Mohan, N.K. Changes in chemical composition of the new cultivars of pineapple fruit during development. *J. Sci. Food Agric.* 39 (3), 17-24, 1987.

Khan, R.H.; Rasheedi, S.; Haq, S.K. Effect of pH, temperature and alcohols on the stability of glycosylated and deglycosylated stem bromelain. *J. Biosci.* 28, 709-714, 2003.

Lightfoot, E.N.; Gibbs, S.J.; Cockrem, M.C.M.; Athalye, A.M. Scaling up protein purification. In: Burgess, R.J. *Protein Purification: Micro to Macro*, New York. 1987. 540p.

Lihme, A.; Zafirakos, E.; Hansen, M.; Olander, M. Simplified and more robust EBA processes by elution in expanded bed mode. *Bioseparation*. 8, 93-97, 1998.

Livio M, *et al.* Effect of bromelain on fibrinogen level, prothrombin complex factors and platelet aggregation in the rat - A preliminary report. *Drugs Expt Clin Res*. 4, 49-53, 1978.

Kunitz, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor: II general properties. *J. Gen. Physiol.* 30, 291-310, 1974.

Mattiasson, B. & Nandakumar, M.P. Binding assays in heterogeneous media using a flow injection system with an expanded micro-bed adsorption column. *Bioseparation*. 8, 237-245, 1998.

Maurer, H.R. Bromelain: biochemistry, pharmacology and clinical use. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 1234-1245, 2001.

Morita AH, Uchida DA, Taussig SJ. Chromatographic fractionation and characterization of the active platelet aggregation inhibitory factor from bromelain. *Arch Inter Phar Ther.* 239, 340-350, 1979.

Murachi, T. Bromelain enzymes, in: Lorand, L. (Ed.), *Methods in Enzymology*, vol. XLV, Academic Press, New York, 1976, 475-485p.

Muta E., Aramaki H., Takata Y., Kono A., Okamoto Y., Ota S. Cloning and sequencing of fruit bromelain. Submitted (JAN-1993) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.

Owen, R.O. & Chase, H.A. Direct purification of lysozyme using continuous counter-current expanded bed adsorption. *Journal of Chromatography A*. 757, 41-49, 1997.

Palsson, E.; Axelsson, A.; Larsson, P.O. Theories of chromatographic efficiency applied to expanded beds. *Journal of Chromatography A*. 912, 235-248, 2001.

Pessoa-Jr., A.; Hartmann, R.; Vitolo, M.; Hustedt, H. Recovery of extracellular inulinase by expanded bed adsorption. *Journal of Biotechnology*. 51, 89-95, 1996.

Pessoa-Jr., A.; Kilikian, B.V. *Purificação de Produtos Biotecnológicos*. Manole: Barueri, SP. 2005, 456p.

Rasheedi, S.; Haq, S.K.; Khan, R.H. Guanidine hydrochloride denaturation of glycosylated and deglycosylated stem bromelain. *Biochemistry* 68, 1097-1100, 2003.

Rowan, A.D.; Buttle, D.J.; Barrett, A.J. The cysteine proteinases of the pineapple plant. *Biochem J.* 266, 869-875, 1990.

Richardson, J.F. & Zaki, W.N. Sedimentation and Fluidisation: Part I. *Trans. Inst. Chem. Engs.*, 32, 35-53, 1954.

Ritonja, A.; Rowan, A.D.; Buttle, D.J.; Rawlings, N.D.; Turk, V.; Barrett, A.J. Stem bromelain: amino acid sequence and implications for weak binding of cystatin. *FEBS Lett.* 247, 419-424, 1989.

Santos, E.S.; Guirardello, R.; Franco, T.T. Preparative Chromatography of Xylanase Using Expanded Bed Adsorption. *Journal of Chromatography - A*, 944, 217-224, 2002.

Schmidt, C. *et al.* Expanded bed adsorption – A new way for industrial recovery of recombinant proteins. *New Zealand Biotech Association Meeting*, Palmerton North, New Zealand, 1993.

Silverstein, R.M.; Kezdy, F.J. Characterization of the pineapple stem proteases (bromelains). *Arch. Biochem. Biophys.* 167, 678-686. 1975.

Simon, F. & Kotler, P.. *Building Global Biobrand: taking biotechnology to market*. Free Press, New York, 2003, 336 p.

Singleton, V.L. Chemical and physical development of the pineapple fruit I: Weight per fruitlet and other physical attributes. *J. Food Sci.*, 30, 98-104, 1965.

Singleton, V.L.; Gortner, W.A. Chemical and physical development of the pineapple fruit II: Carbohydrate and acid constituents. *J. Food Sci.*, 30, 19-23, 1965.

Spalding, B.J. Downstream Processing: Key to Slashing Production Cost 100-fold. *Biotechnology*. 229-233, 1991.

Suding, A. & Tomusiak, M. Protein recovery from *E. coli* homogenate using Expanded Bed Adsorptive Chromatography. 205th American Chemical Society National Meeting, Denver, Colorado, USA. 1993.

Suh, H.J.; Lee, H.; Cho, H.Y.; Yang, H.C. Purification and characterization of bromelain isolated from pineapple. *Han'guk Nonghwa Hakhoechi* 35, 300-307, 1992.

Taussig, S.J. & Nieper, H.A. Bromelain: its use in prevention and treatment of cardiovascular disease, present status. *J IAPM*. 6, 139-151. 1979.

Terranova, B.E. & Burns, M.A. Continuous cell suspension processing using magnetically stabilized fluidized. *Biotechnology and Bioengineering*. 37, 110-120, 1991.

Thelen, T.V. & Ramirez, W.F. Bed-height dynamics of expanded beds. *Chemical Engineering Science*. 52, 3333-3344, 1997.

Thommes, J.; Weiher, M.; Karau, A.; Kula, M-R. Hydrodynamics and performance in fluidized bed adsorption. *Biotechnology and Bioengineering*, 48, 367-374, 1995.

Uhlig, G. & Seifert, J. The effect of proteolytic enzymes (traumanase) on posttraumatic edema. *Fortschr Med*. 99, 554-556, 1981.

van Brunt, J. Scaleup: The Next Hurdle. *Biotechnology*. 419-424, 1985.

van Kuik J.A.; Hoffmann R.A.; Mutsaers J.H.G.M.; van Halbeek H.; Kamerling J.P.; Vliegthart J.F.G. A 500-MHz 1H-NMR study on the N-linked carbohydrate chain of bromelain. 1H-NMR structural-reporter-groups of fucose alpha(1-3)-linked to asparagine-bound N-acetylglucosamine. *Glycoconj. J.* 3, 27-34, 1986.

Yamamoto, S.; Okamoto, A.; Walter, P. *Bioseparation*. 10, 1, 2001.

Walter, H.E. Proteinases: methods with hemoglobin, casein, and azocoll as substrates. Pp. 270-277 in: Bergmeyer, H.U. *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 5, ed. Verlag Chemie, Weinheim, Germany. 1984.

White, R.R. *et al.* Bioavailability of 125I bromelain after oral administration to rats. *Biopharm Drug Dispos*. 9, 397-403. 1988.

Wharton, C.W. The structure and mechanism of stem bromelain. Evaluation of the homogeneity of purified stem bromelain, determination of the molecular weight and kinetic analysis of the bromelain-catalysed hydrolysis of N-benzyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-serine methyl ester. *Biochem. J.* 143, 575-586, 1974.

Wheelwright, S.M. *Protein purification: design and scale up of downstream processing*. Hanser Publishers: München. 1991, 244p.

5. *Partial Characterization of Fruit Bromelain (E.C. 3.4.22.33)*

RESUMO

A bromelina é extraída da infrutescência da *Ananas comosus*, e tem aplicações tanto na indústria alimentícia, como amaciador de carne, quando na indústria farmacêutica. As bromelinas estão presentes nos primeiros estágios do desenvolvimento dos frutos, porém seu nível aumenta rapidamente, mantendo-se elevado até o amadurecimento. Este trabalho tem como objetivo principal a caracterização parcial da bromelina. Foram estudados os efeitos da temperatura, pH e suas influências com o tempo. Foi observado que a atividade enzimática aumentou com o aumento da temperatura até 60 °C, onde a partir deste ponto sofreu forte queda. A bromelina demonstrou alto nível de atividade proteolítica em pHs próximos da neutralidade, havendo queda gradativa com o afastamento da faixa neutra no meio reativo. Sob influência do tempo, a bromelina mostrou-se estável em todas as temperaturas, com atividade de 50% ao final dos 150 minutos. Observou-se que a bromelina apresenta atividade ótima a 45 °C e pH 7,0 e mantém-se estável por aproximadamente 150 minutos.

Palavras-Chave: Bromelina, Estabilidade, Enzima, Protease, Caracterização

Partial Characterization of Fruit Bromelain (E.C. 3.4.22.33)

SILVEIRA, E.^{1*}; SOUZA-JR., M.E.²; CHAVES, A.C.²; PORTO, A.L.F.³;

TAMBOURGI, E.B.¹

1 – Faculdade de Engenharia Química – FEQ/Unicamp;

2 – Laboratório de Biotecnologia – FFPNM/UPE

3 – Departamento de Morfologia Animal – UFRPE

ABSTRACT

Bromelain are extracted from *Ananas comosus* infrutescence, and are used in food industry, as a meat softener, and pharmaceutical industry, as well. Bromelain are presented in the early stages of fruit development. However, their levels increase quickly, remaining high until the maturation. This paper reports the partial characterization of bromelain, describing aspects such temperature effect, pH effect, and its influences within time. It was observed an increase of enzymatic activity by increasing the temperature level, upper bounded at 60 °C. It was also reported that additional increments in temperature cause an abrupt decrease of bromelain levels. Bromelain showed high level of proteolytic activity on pH around neutral values, showing gradate decrease with the acid and alkali range. The time influence in bromelain activity demonstrated to be stable in all temperatures, the retained activity after 150 minutes was around 50%. It was observed that bromelain showed optimum activity at 45 °C and pH 7.0 and kept stable for around 150 minutes.

Keywords: Bromelain, Stability, Enzyme, Proteases, Characterization

1. INTRODUCTION

The pineapple, considered by many as a whole fruit, is indeed an infrutescence. Many independent fruits are bonded together in one body around a fibrous stem. The pineapple (Smooth Cayenne cv.) physical and physiologic developments have been widely studied (Gortner, 1965; Gortner & Singleton, 1965; Singleton, 1965; Singleton & Gortner, 1965). The wide chemicals constituents range of the pineapple, are dependent from the fruit maturational state and, agronomical and environmental factors, previously described by Dull (1987).

The bromelains (formers E.C. 3.4.22.4 and E.C. 3.4.22.5) are extracted from the pineapple (*Ananas comosus* L.). The stem bromelain (E.C. 3.4.22.32) is the most abundant endopeptidase cystein in the pineapple's stem. It holds a broad specificity for the cleavage of proteins, but it has a strong preference for Z-ArgArg-|-NHMec among the small molecules substrates. The fruit bromelain (E.C. 3.4.22.33) is extracted from the pineapple infrutescence. It hydrolyzes proteins with a broad specificity for peptide bonds. Bz-Phe-Val-Arg-|-NHMec is a good synthetic substrate, but there is no action on Z-Arg-Arg-|-NHMec (Enzyme, 2005). The plant bromelain presents isoelectric point at pH = 4.6 (Murachi, 1976).

The bromelains are presented in the *Ananas comosus*' fruit early development stages, however its levels increase quickly, keeping it high until the matureness, and it shows a little decrease. This activity decrease is not followed by the correspondent change in the total protein concentration. This work focus the partial characterization from *Ananas comosus* L.'s fruit bromelain (E.C. 3.4.22.33).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Enzymatic Extract

The enzymatic extract was obtained from the pineapple's (*Ananas comosus*) infrutescence.

2.2 Enzymatic Activity

The bromelain proteolytic activity was estimated by the method described by Kunitz (1947) and modified by Walter (1984), using casein 2% (w/v) as substrate and tyrosine as standard. One enzymatic unit was determined as the bromelain amount necessary to produce 1 $\mu\text{mol/mL}$ of tyrosine in 1 minute at 37 °C.

2.3 pH and Temperature Effect

The bromelain activity was measured in different pH values under standard conditions using casein as substrate. The pH effect on enzymatic activity was measured using different buffers such as: 0.1 M citrate-phosphate buffers (4.0 – 6.0); and 0.1 M phosphate buffer (6.0 – 8.0) at 37 °C. The temperature effect was determined varying the temperature from 25 to 70 °C with 0.1 M phosphate buffer pH 7.5.

2.4 pH and Temperature Effect on Bromelain Stability

The enzymatic extracts were incubated at 37 °C under different buffers (citrate-phosphate and phosphate), for a period ranging from 30 to 150 minutes. The enzymatic extracts were incubated too, but under different temperatures, from 25 to 55 °C for a period ranging from 30 to 150 minutes. The bromelain activity was measured in time intervals of 30 minutes, using casein as substrate at 37 °C.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 pH Effect in the Activity and Stability

The pH effect in the enzymatic activity was studied at pHs ranging from 4.0 to 8.0 (Figure 01). According to the obtained data, the bromelain relative activity increased with the increasing pH, until it got to its maximum at pH 7.0, after this value, the activity showed a slight decrease. The bromelain relative activity obtained an increase of approximately 500% comparing to the lowest activity pH. This occurs, probably, due to the

net charge and the activity site becoming more open, and more similar to the reaction transition state. The optimum pH of bromelain is similar to other proteases, such as bamboo serine proteases (Arima *et al.*, 2000), latex proteases from *Eufrobia sp.* (Lynn & Clevette-Radford, 1988), *Bacillus polymyxa* (Matta & Punj, 1998), and *B.subtilis* (Yan *et al.*, 1985).

The figure 02 describes the pH effect on bromelain stability. The enzyme was stable at all pHs, although, at low pH values (around 4.0 and 5.0) there was a minor lost of the relative activity at all time period studied. Probably it occurred due these pHs are close to the pH from *in natura* pineapple fruit, pH = 3.6. At higher pHs, the lost of activity was not significant, it was kept stable after 120 minutes.

3.2 Temperature effect in the Activity and Stability

The temperature effect in the bromelain activity is presented in figure 03. The bromelain relative activity increased with the increase of temperature, until it reached 65 °C, where it showed its maximum activity, and than it quickly decreased. The temperature effect in the bromelain activity seems to be quite different from others proteases, such as bamboo serine proteases and *B. polymyxa* which retained almost 90% of its residual activity after 40 °C and 50 °C, respectively (Arima *et al.*, 2000; Matta & Punj, 1998).

The figure 04 shows the temperature effect on bromelain activity. The enzyme showed to be stable after 150 minutes in all temperatures studied, except at 55°C, however, at lower temperatures the residual proteasic activity was held near its maximum for a longer time. This should have occurred because bromelain showed activities really high in all temperatures studied. It was also observed that bromelain maintained more than 50% of its initial activity after the end of all experiments.

4. CONCLUSION

It was observed that bromelain showed optimum activity at neutral pH, 45 °C temperature, where it retained more than 75% of its initial activity.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the CTPetro for financial support.

REFERENCES

- Arima, K.; Uchikoba, T.; Yonezawa, H.; Shimada, M.; Kaneda, M. (2000), Isolation and characterization of serine protease from the sprouts of *Pleioblastus hindsii* Nakai. *Phytochemistry*, 54, 559-565.
- Dull, G.G. The pineapple: general. In: Hulme, A.C. (1971), *The biochemistry of fruits and their products*. Vol 2.. Academic Press, London, pp. 303-331.
- Enzyme. (2005), *ExPASy Proteomic Server*. <http://au.expasy.org>. Accessed in 25/04/2005.
- Gortner, W.A. (1965), Chemical and physical development of the pineapple fruit IV: plant pigment constituents. *J. Food Sci.*, 30, 36-2.
- Gortner, W.A.; Singleton, V.L. (1965), Chemical and physical development of the pineapple fruit III: Nitrogenous and enzymes constituents. *J. Food Sci.*, 30, 24-9.
- Kermasha, S.; Barthakur, N.N.; Alli, I.; Mohan, N.K. (1987), Changes in chemical composition of the new cultivars of pineapple fruit during development. *J. Sci. Food Agric.* 39 (3), 17-24.
- Kunitz, M. (1947), Crystalline soybean trypsin inhibitor: II. General properties. *J. Gen. Physiol.* 30: 291–310.
- Lynn, K.R., Clevette-Radford, N.A. (1988), Proteases of Euphorbiaceae. *Phytochemistry* 27, 45-50.
- Matta, H.; Punj, V. (1988), Isolation and characterization of a thermostable extracellular protease of *Bacillus polymyxa* B-17. *International Journal of Food Microbiology*, 42, 139-145.
- Murachi, T. Bromelain enzymes, in: Lorand, L. (Ed.) (1976), *Methods in Enzymology*, vol. XLV, Academic Press, New York, pp. 475–485.

Singleton, V.L. (1965), Chemical and physical development of the pineapple fruit I: Weight per fruitlet and other physical attributes. *J. Food Sci.*, 30, 98-104.

Singleton, V.L.; Gortner, W.A. (1965), Chemical and physical development of the pineapple fruit II: Carbohydrate and acid constituents. *J. Food Sci.*, 30, 19-23.

Yan, L., Langlois, B.E., O'Leary, J., Hicks, C.L. (1985), Purification and characterization of four extracellular proteases isolated from raw milk. *J. Dairy Sci.* 68, 1323–1336.

Walter, H. E. (1984), Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. Pp. 270–277 in *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 5, H. U. Bergmeyer, ed. Verlag Chemie, Weinheim, Germany.

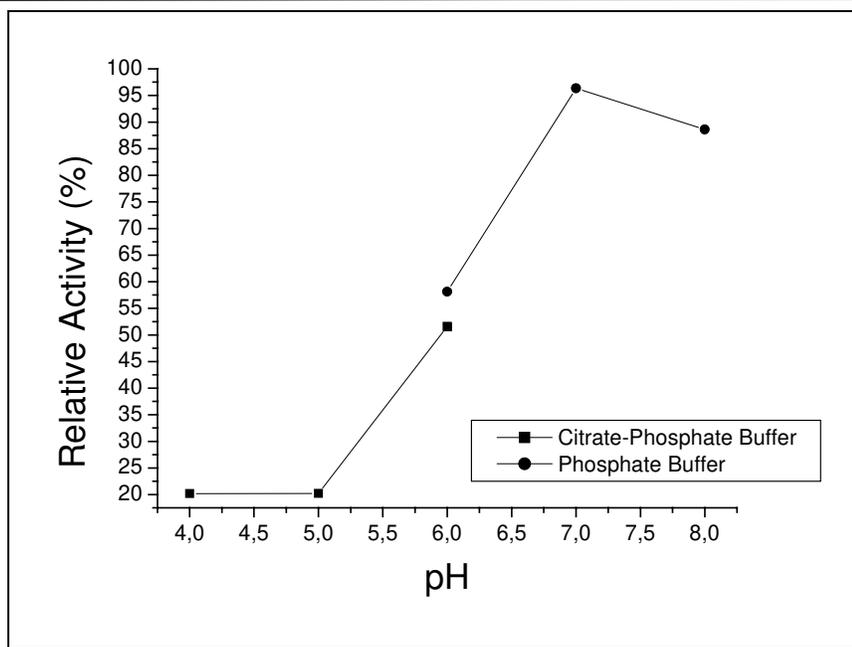
Lista de Figuras:

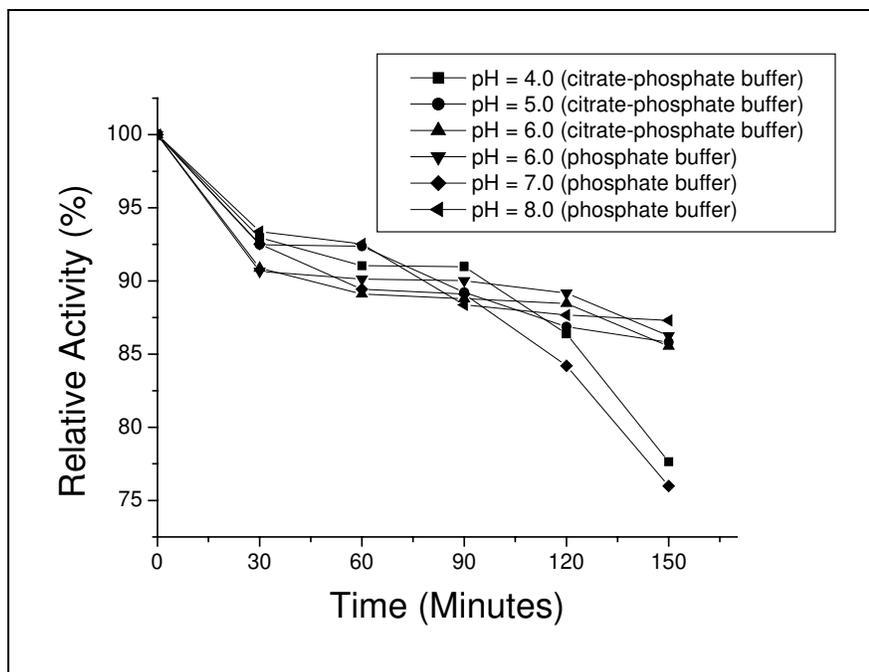
Figure 01: pH effect on bromelain activity at 37 °C

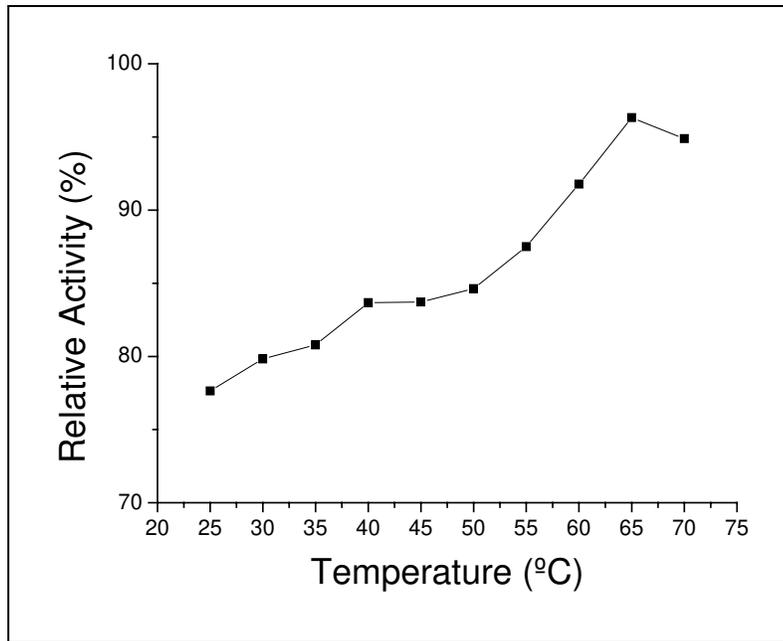
Figure 02: pH effect on bromelain stability at 37 °C

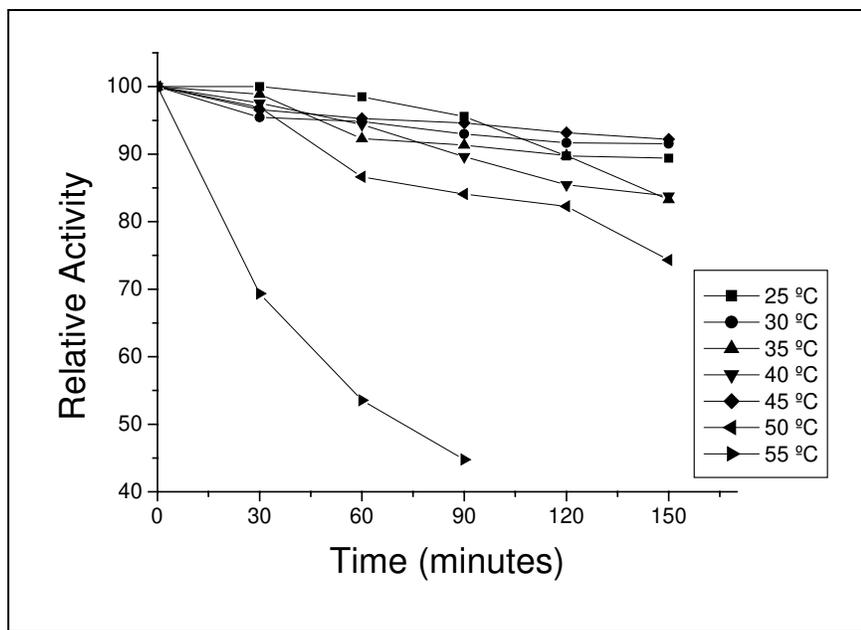
Figure 03: Temperature effect on bromelain activity at pH 7.5

Figure 04: Temperature effect on bromelain stability at pH 7.5









6. Manuscrito Submetido ao Periódico “*Biochemical Engineering Journal*”

Resumo

Este trabalho foca a adsorção de Bromelina em condições de leito expandido, tais como os parâmetros cinéticos da adsorção. Os parâmetros cinéticos mostraram que após 40 minutos o equilíbrio foi atingido onde a maior capacidade de adsorção foi de 5,11 U/mL de resina. Entretanto, a capacidade máxima de adsorção apenas foi adquirida determinando-se a isoterma de adsorção. Os valores de Q_m e kd foram estimados através do modelo de Langmuir, 9,18 U/mL e 0,591 U/mL, respectivamente. Uma coluna feita de vidro, com um diâmetro interno de 1 cm, foi utilizada na adsorção em leito expandido. O tempo de residência foi reduzido em 10 vezes, apenas com um aumento de 2,5 vezes no grau de expansão, por outro lado, o valor de N foi reduzido apenas 2 vezes. Após a adsorção, a bromelina foi eluída em modo empacotado, em fluxo descendente. O fator de purificação foi próximo de 13 vezes e a proteína total foi reduzida apenas 4 vezes. Adsorção em leito expandido mostrou-se ser viável para a purificação de bromelina.

Palavras-chave: Adsorção; Atividade enzimática; Purificação; Dispersão axial; Adsorção em Leito Expandido; e Bromelina.

Expanded Bed Adsorption of Bromelain (E.C. 3.4.22.33) from *Ananas comosus* Crude Extract

Silveira, E.¹; Souza-Jr, M.E.²; Santana, J.C.C.¹; Chaves, A.C.²; Porto, A.L.F.³; Tambourgi, E.B.^{1,*}.

¹ Faculdade de Engenharia Química – FEQ / Unicamp, Av. Albert Einstein, 500, P.O.Box 6066, Zip Code: 13083-970 – Barão Geraldo, Campinas – SP, Brazil; ² Laboratório de Biotecnologia – FFPNM / UPE; ³ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE; *FAX: 55-19-35213910 e-mail: elia¹stam@feq.unicamp.br

Abstract

This work focus the adsorption of Bromelain in expanded bed conditions, such as the adsorption kinetics parameters. The adsorption kinetics parameters showed that after 40 minutes the equilibrium was achieved and the major adsorption capacity were 5.11 U per resin mL. However, the maximum adsorption capacity was only achieved determining the adsorption isotherm. Only by the Langmuir model the Q_m and kd values could be estimated, 9.18 U/mL and 0.591, respectively. A column made of glass with an inner diameter of 1 cm was used for the expanded bed adsorption (EBA). The resident time was reduced 10 fold by increasing the expansion degree 2.5 times; nonetheless the N value was reduced only 2 fold. After adsorption, the bromelain was eluted in packed bed mode, with a downward flow. The purification factor was about 13 fold and the total protein was reduced 4 fold. EBA showed to be feasible for purification of bromelain.

Keywords: Adsorption; Enzyme Activity; Purification; Axial Dispersion; Expanded Bed Adsorption; and Bromelain.

1. Introduction

The pineapple (*Ananas comosus* L.) is cultivated extensively in Hawaii, Philippines, Caribe, Malaysia, Australia, Mexico, South Africa and Brazil. Brazil is the pineapple's second worldwide producer with 45,000 planted hectares. The main planted areas are the rain forest and northeast, although it is cultivated all around the country [1].

The stem and fruit bromelains (formers E.C. 3.4.22.4 and E.C. 3.4.22.5, respectively) are extracted from the *A. comosus*. Considered by many as a whole fruit, is indeed infrutescence. Many independent fruits are bonded together in one body around a fibrous stem. The stem bromelain (E.C. 3.4.22.32) is the most abundant endopeptidase cystein in the pineapple's stem. It holds a broad specificity for the cleavage of proteins, but it has a strong preference for Z-Arg-Arg-|-NHMeC among the small molecules substrates [2 – 8]. The fruit bromelain (E.C. 3.4.22.33) is extracted from the pineapple infrutescence. It hydrolyzes proteins with a broad specificity for peptide bonds. Bz-Phe-Val-Arg-|-NHMeC is a good synthetic substrate, but there is no action on Z-Arg-Arg-|-NHMeC [9].

Expanded Bed Adsorption (EBA) is a chromatography technique for separation and purification of biological products directly from crude feedstock, without using centrifugation, microfiltration and other clarification prior steps [10 – 13]. This technique permits crude feeding into chromatographic column without initial treatment, and as the bed expands, it increases adsorbent surface contact, making interaction with the target molecule more effective [14 – 15].

Several researches on expanded bed adsorption are made to achieve a better understanding of the effects of adsorption, emphasizing studies of adsorbent type and size [16 – 17], bed height, linear velocity [18], fluidization and elution solutions effects on

residence time distribution [15, 19] for application in the recovery of important biomolecules.

The axial dispersion in EBA is one of greater importance, as reveals the flow performance, interprets the adsorption and mass transfer mechanisms of biomolecules and to describe the particular adsorption behaviours along the bed. Non-uniform axial distribution of particle size and local bed voidage are always established within the bed, due to broad size and/or particle density, which results in the variation of the axial dispersion with the bed height [20 – 22].

In the present work, bromelain from a crude extract of *Ananas comosus* was purified by expanded bed adsorption with Amberlite IRA 410 ion-exchange resin on a glass column (1 cm i.d.). The effect of expansion degree of resin bed on bromelain purification was studied and also a residence time distribution study was made.

2. Material and Methods

Reagents

Amberlite IRA 410 ion-exchange resin was purchased from VETEC (São Paulo, Brazil). Pineapple, *Ananas comosus* cv. Smooth cayenne, was purchased on local market. All others reagents were analytical grade.

EBA column

A glass column of 1 cm inner diameter and 40 cm height with an adjustable piston on the top, feed inlet on the bottom and an outlet on the top was used. A sixty mesh plate at the feed inlet was used to avoid loss of adsorbent particles. A ruler was placed behind the column to measure the bed height.

Enzyme Extract

The enzyme extract was obtained from the pineapple's (*A. comosus*) infrutescence. The pineapple's stem and fruit were processed in blender and then filtered in a sixty mesh filter to remove the plant tissue fibres.

Enzyme Assay

The bromelain proteolytic activity was estimated by the method described by Kunitz [23] and modified by Walter [24], using casein 2 % (w/v) as substrate and tyrosine as standard. One enzymatic unit was determined as the bromelain amount necessary to produce 1 $\mu\text{mol/mL}$ of tyrosine in 1 minute at 37 °C.

Protein Determination

The total protein concentration was determined by the method described by Deutscher [25] using albumin as standard. The protein concentration was measured by absorbance at 280 nm.

Adsorption Equilibrium and Kinetics

In kinetic experiments, 2 mL of drained resin was mixed up with 20 mL of buffered bromelain solutions (0.1 mol/L phosphate buffer pH 7.5). The adsorption was carried out in shaking incubator at 25 °C. In different time intervals, supernatant samples of 0.5 mL were analysed for bromelain activity. Using this procedure, the time course of bromelain activity concentration decrease was determined.

In adsorption equilibrium experiments, 5 mL of drained adsorbents was added to 25 mL of bromelain extract solutions of different concentrations. The aqueous solution was 0.1 mol/L phosphate buffer (pH 7.5). Adsorption experiments were conducted at 25 °C for 2 h in shaking incubator. At the end of adsorption, solid phase was separated, and supernatant was analyzed for bromelain activity determination. The activity of adsorbed bromelain was calculated by from mass balance.

Determination of Bed Voidage (ε)

Bed voidage was obtained by substitution of data on specific mass (ρ_p) and mass of the adsorbent particles (m_p), cross section area of the column (A_T) and bed height (H) in the following equation [15, 16, 19]:

$$\varepsilon = 1 - \frac{V_p}{V_L} = 1 - \frac{V_p}{A_T H} = 1 - \frac{m_p}{\rho_p A_T H} \quad (1)$$

where V_p is the particle volume.

Residence Time Distribution (RTD) Study

Phosphate buffer at 0.1 mol/L concentration and at pH 7.0 was used as fluidizer; the bed was fluidized until bed height achieved the pre-determinate height (1.5, 2.0 and 2.5 times the initial bed height). All experiments were carried out at standard conditions of temperature and pressure (25 °C and 1 atm). An acetone solution (2.5 % v/v) was used as tracer. The acetone solution was feed in the column until it reached maximum UV signal and then, the feed was stopped and samples were collected in the column outlet from time intervals varying with the flow velocity.

The RTD curves were obtained by the negative pulse method. Figure 01 shows how RTD curves were determined experimentally. The mean residence time (t) and the standard deviation (σ) were substituted in equation (2) to obtain the number of theoretical plates (N).

$$N = \frac{t^2}{\sigma^2} \quad (2)$$

Axial dispersion was calculated as described in equation (3)

$$HEPT = \frac{UH}{2\varepsilon D_{axial}} \quad (3)$$

Bromelain Purification

Expanded bed adsorption was carried out at 25 °C, 1 atm and pH 7.5. Adsorbent bed was pre-equilibrated to the height of working, with 0.1 mol/L phosphate buffer at pH 7.5. A 4.0 cm bed height was expanded at 6.0, 8.0, and 10 cm; these bed heights are corresponded to 1.5, 2.0 and 2.5 expansion degrees, respectively. 25 mL of enzyme solution (crude and diluted) in phosphate buffer at pH 7.5 were loaded in column bottom for adsorption of bromelain on Amberlite IRA 410 ion-exchange resin. The elution was performed with a 0.1 – 0.5 mol/L NaCl stepwise gradient at 0.95 mL/min in downward flow. The bromelain activity and protein concentration were measured from time to time during adsorption, washing and elution periods.

SDS-PAGE

SDS-PAGE was performed according to the method described by Hochstrasser *et al.* [26 – 27] for silver staining. The molecular makers range was from 24 kDa to 66 kDa, where Trypsinogen (24 kDa); Carbonic Anhydrase (29 kDa); Glyceraldehyde-3-phosphate

dehydrogenase (36 kDa); Ovoalbumin (45 kDa); Glutamic dehydrogenase (55 kDa); and Albumin (66 kDa).

3. Results and Discussion

Characterization of Amberlite IRA 410

The figure 02 shows the adsorption isotherms of bromelain to Amberlite IRA 410 ion-exchange adsorbent. The adsorption isotherm was well expressed by the Langmuir equation:

$$Q = Q_m \frac{c}{k_d + c} \quad (4)$$

The adsorption of bromelain was near 6.1 U/mL of resin, although the adsorption capacity (Q_m) was near 9.2 U/mL of resin. The dissociation constant (k_d) was 0.591 U/mL. The biggest difficult to obtain kinetics data from bromelain adsorption was the short quantity of enzyme per cm^3 of vegetable tissue. In other hand, the *Ananas comosus* stem is too fibrous, leading to an addition of distilled water to the extraction of the enzyme, and thus making a diluted extract in extraction.

Lali *et al.* [28] claimed that the wall effect on the bed expansion behaviour is negligible as long as the ratio of column to particle diameter is larger than 20. The value of this ratio in this work was larger than 20, the bed expansion experiments should have not been influenced by the wall effect. The bed expansion degrees for the resin are shown in figure 03, and the expansion degrees for Streamline are also shown for comparison.

The Amberlite IRA 410 has a specific mass (ρ_p) of 1.12 g/mL and a particle diameter of 4×10^{-4} m, although the specific mass is smaller than streamline material [29] the particle

diameter is greater, which proportionated low expansion degrees with higher flow velocities as saw in figure 03.

Residence Time Distribution Study

The figure 04 shows RTD curves for acetone (2.5 % w/v) tracer as it passed into the column bed. Analyzing the RTD obtained after perfect ion-tracer pulse (axial dispersion, plug-flow exchange of mass with stagnant zones) gave a quantitative description of the underlying hydrodynamic situation during EBA process [15].

Table 01 shows the RTD results after substitution of data into equations (1) to (3), according to the methodology used by [15, 16, 19, 30].

As detailed in table 01 the liquid axial dispersion increased with bed height increased with expansion degree. There was a 12-fold increase in axial dispersion when the expansion degree was 1.5 fold and a 51-fold increase as it expansion degree's increased 2.5 fold. This increase in axial dispersion facilitates the flow of particles and biological material into the bed and increases the interaction of target molecule and adsorbents particles, facilitating the feed of crude extract directly to the bed, avoiding fouling and reducing costs, as pre-treatment and pre-purification steps are skipped, which are main chromatographic problems [15, 29, 31].

Expanded Bed Adsorption of Bromelain

Table 02 shows the results of Bromelain by expanded bed adsorption on amberlite IRA 410. The recovery yield increased as the expansion degree increased, it should occurs because there are more adsorbent-target molecule interaction in expanded beds than in

fixed beds, by the increase of bed voidage influence. This effect was also reported by Chang *et al.* [32], and Santos [19] working with G6PDH and lysozyme, respectively.

As the expanded beds heighten, there was an increase in the specific activity. This shows that bromelain purification is, somehow, proportional to the expansion degree or flow velocities in the conditions studied reported here. Similar results were found by Toledo *et al.* [30] working with α -amylase. It is also in agreement with the RTD study realised, as the bed height increases the contact between enzymes and the ion-exchange resin, Amberlite IRA 410.

The purification factor also rose as the expanded bed heights increased. The purification factor of the expanded bed at expansion degree of 2.5-fold was over 12-fold, which is much higher than ammonium sulphate precipitation, ultrafiltration [33], also some gel filtration chromatography [34 – 35] and reversed micelles systems [36]. This purification factor was close to others ion-exchange chromatography [37] but way low than purification factors from affinity chromatography [38]. The use of DEAE-cellulose and DEAE-sephacel resins increase the cost of purification of biomolecules, so, with the use of Amberlite IRA 410 ion-exchange resin and the expanded bed condition, it is possible to obtain pure biological products, such as bromelain, with low operational cost, thus, lowering overall process cost [15].

The chromatogram is presented in figure 05. It shows that bromelain was eluted in a single peak, although there was an intersection in the first and second peak. It should have occurred due to buffer composition in the column outlet, the stepwise gradient forms, at least, three different buffer compositions travelling through the column at the same time. This should have caused the intersection to appear in the chromatogram, which showed more than one protein peak, although it is related to a difference in the mobile-phase composition, nor to the heterogeneity of the product [31] as seen in the SDS-PAGE (Figure 06).

The SDS-PAGE analysis shows that eluted peaks, which contained bromelain activity, was electrophoretical pure. The estimated molecular weight of bromelain was around 32.2 kDa, similar results were found by Silverstein and Kezdy [39], 35 kDa; and Murachi [40], 33 kDa. However, Ota *et al.* [41], Takahashi *et al.* [42], Wharton [43], and Suh *et al.* [44] have found different molecular weight for bromelain, 28 kDa, 28 kDa, 28.4 kDa, and 37 kDa respectively.

4. Conclusions

This work showed that Amberlite IRA 410 is viable to expanded bed adsorption of bromelain, presenting a good activity adsorption and a good stability for the purification process as well. It was also showed that by the increasing of flow velocity, bed expansion and bed voidage, an increase of HEPT, axial dispersion and purification factor was achieved, leading to a electrophoretical pure product.

5. Acknowledgement

The authors would like to acknowledge the Monique Ferraz and Igor Teixeira thankful support with SDS-PAGE experiments, and The authors are thankful to Capes and CNPq for financial support.

6. References

[1] Instituto Agronômico de Campinas. IAC.

<http://www.iac.sp.gov.br/Cultivares/Folders/Abacaxi/IACGomo-de-Mel.asp>. Accessed in 29/06/2005.

-
- [2] Hatano, K.; Tanokura, M.; Takahashi, K. The amino acid sequences of isoforms of the bromelain inhibitor from pineapple stem. *J. Biochem.* 124, (1998) 457-461.
- [3] Harrach, T; Eckert, K; Maurer, HR; Machleidt, I; Machleidt, W; Nuck, R. Isolation and characterization of two forms of an acidic bromelain stem proteinase. *J. Protein Chem.* 17, (1998) 351-361.
- [4] Hatano, K.; Sawano, Y.; Tanokura, M. Structure-function relationship of bromelain iso-inhibitors from pineapple stem. *Biol. Chem.* 383, (2002) 1151-1156.
- [5] Haq, S.K.; Rasheedi, S.; Khan, R.H. Characterization of a partially folded intermediate of stem bromelain at low pH. *Eur. J. Biochem.* 269, (2002) 47-52.
- [6] Rasheedi, S.; Haq, S.K.; Khan, R.H. Guanidine hydrochloride denaturation of glycosylated and deglycosylated stem bromelain. *Biochemistry* 68, (2003) 1097-1100.
- [7] Khan, R.H.; Rasheedi, S.; Haq, S.K. Effect of pH, temperature and alcohols on the stability of glycosylated and deglycosylated stem bromelain. *J. Biosci.* 28, (2003) 709-714.
- [8] Gaspani, L; Limiroli, E; Ferrario, P; Bianchi, M. In vivo and in vitro effects of bromelain on PGE(2) and SP concentrations in the inflammatory exudate in rats. *Pharmacology* 65, (2002) 83-86.
- [9] Maurer, HR. Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, (2001) 1234-1245.
- [10] Chase, H.A. Purification of proteins by adsorption chromatography in expanded beds, *Trends Biotechnol.* 12, (1994) 296.
- [11] Hjorth, R. Expanded bed adsorption in industrial bioprocessing: recent developments, *Trends Biotechnol.* 15, (1997) 230.
- [12] Thömmes, J. Fluidized bed adsorption as a primary recovery step in protein purification, *Adv. Biochem. Eng.* 58, (1997) 185.

-
- [13] Anspach, F.B.; Curbelo, D.; Hartman, R.; Garke, G.; Deckwer, W.D. Expanded-bed chromatography in primary protein purification, *J. Chromatogr. A*. 865, (1999) 129.
- [14] Roy, I.; Pai, A.; Lali, A.; Gupta, M.N. Comparison of batch, packed bed and expanded bed purification of *A. niger* cellulose beads. *Bioseparation*. 8, (1999) 317-326.
- [15] Fernandez-Lahore, H.M.; Lin, D-Q.; Hubbuch, J.J.; Kula, M.-R.; Thommes, J. The use of ion-selective electrodes for evaluating residence time distributions in expanded bed adsorption systems. *Biotechnol. Progr.* 17, (2001) 1128-1136.
- [16] Yamamoto, S.; Okamoto, A.; Walter, P. *Bioseparation*, 10, (2001) 1.
- [17] Dainiak, M.B.; Galaev, I.Y.; Matiasson, B.; *J. Chromatogr. A*, 942, (2002) 123.
- [18] Mullick, A.; Flickinger, M.C. *Biotechnol. Bioeng.* 65, (1999) 282.
- [19] Santos, E. S.; Guirardello, R. ; Franco, T. T. . Distributor Effect on Expanded Bed Adsorption. In: International Conference IEX 2000 (Ion Exchange at the Millennium), (2000), Cambridge/UK.
- [20] Bruce, L.J.; Chase, H.A. Hydrodynamics and adsorption behaviour within an expanded bed adsorption column studied using in-bed sampling, *Chem. Eng. Sci.* 56, (2001) 3149.
- [21] Yun, J.X.; Yao, S.-J.; Lin, D.-Q.; Lu, M.-H.; Zhao, W.-T. Modeling axial distributions of adsorbent particle size and local voidage in expanded bed, *Chem. Eng. Sci.* 59, (2004) 449.
- [22] Yun, X.J.; Lin, D.-Q. Lu, M.-H.; Zhong, L.-N.; Yao, S.-J. Measurement and modeling of axial distribution of adsorbent particles in expanded bed: taking into account the particle density difference, *Chem. Eng. Sci.* 59, (2004) 5873.
- [23] Kunitz, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor: II general properties. *J. Gen. Physiol.* 30, (1974) 291-310.

- [24] Walter, H.E. Proteinases: methods with hemoglobin, casein, and azocoll as substrates. Pp. 270-277 in *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 5, H.U. Bergmeyer, ed. Verlag Chemie, Weinheim, Germany. (1984).
- [25] Deutscher, M. P. Guide to protein purification. *Method. Enzymol.* (1990) 182.
- [26] Hochstrasser, D. F., Patchornik, A., and Merrill, C. R. Development of polyacrylamide gels that improve the separation of proteins and their detection by silver staining. *Analyt. Biochem.* 173, (1998) 412–423.
- [27] Hochstrasser, D. F. and Merrill, C. R. ‘Catalysts’ for polyacrylamide gel polymerization and detection of proteins by silver staining. *Appl. Theor. Electrophoresis* 1, (1998) 35–40.
- [28] Lali, A.M.; Khare, A.S.; Joshi, J.B. *Powder Tech.* 57, (1989) 39.
- [29] Amersham Pharmacia Biotech. *EBA Handbook: Principles and Methods*. Uppsala, ISBN 91-630-5519-8, (1997).
- [30] Toledo, A.L. *et al.* Purification by expanded bed adsorption and characterization of an α -amylase FORILASE NTL® from *A. niger*, *Journal of Chromatography B*, 846, 51-56, (2006).
- [31] Wheelwright, S.M. *Protein purification: design and scale up of downstream processing*. Munich: Hanser Publishers. (1994).
- [32] Chang, Y.K.; McCreath, G.E.; Chase, H.A. in: Galindo, E.; Ramirez, O.T. (Eds.), *Advances in Bioprocess Engineering*, Kluwer Academics Publisher: Netherlands, (1994) p. 519.
- [33] Kojima, Y.; Yokoe, M.; Mase, T. Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas fluorescens* AK102. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58, (1994) 1564-1568.

- [34] Lee, S.Y.; Rhee, J.S. Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3SK. *Enzyme Microb. Technol.* 15, (1993) 617-623.
- [35] Dharmsthiti, S.; Luchai, S. Production, purification, and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus sp.* THL027. *FEMS Microbiol. Lett.* 179, (1999) 241-246.
- [36] Vicente, M.L.C.; Aires-Barros, M.R.; Cabral, J.M.S.; Purification of *Chromobacterium viscosum* lipases using reversed micelles. *Biotechnol. Tech.* 4, (1990) 137-142.
- [37] Kim, M.H.; Kim, H.K.; Lee, J.K.; Park, S.Y.; Oh, T.K. Thermostable lipase of *Bacillus stearothermophilus*, high level production, purification and calcium-dependent thermostability. *Korea Res. Inst. Biosci. Biotechnol.* 64, (2000) 280-286.
- [38] Kordel, M.; Hofmann, B.; Schomburg, D.; Schimid, R.D. Extracellular lipase of *Pseudomonas sp.* strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization and preliminary X-ray diffraction data. *J. Bacteriol.* 173, (1991) 4836-4841.
- [39] Silverstein, R.M.; Kezdy, F.J. Characterization of the pineapple stem proteases (bromelain). *Arch. Biochem. Biophys.* 167, (1975) 678-686.
- [40] Murachi, T. Bromelain enzymes. *Methods Enzymol.* 45, (1976) 475-485.
- [41] Ota, S.; Horie, K.; Hagino, F.; Hashimoto, C.; Date, H.; Fractionation and some properties of the proteolytically active components of bromelains in the stem and the fruit of the pineapple plant. *J. Biochem.* 71, (1972) 817-830.
- [42] Takahashi, N.; Yasuda, Y.; Goto, K.; Miyake, T.; Murachi, T. Multiple molecular forms of stem bromelain. Isolation and characterization of two closely related components, SB1 and SB2. *J. Biochem.* 74, (1973) 355-373.
- [43] Wharton, C.W. The structure and mechanism of stem bromelain. Evaluation of the homogeneity of purified stem bromelain, determination of the molecular weight and kinetic

analysis of the bromelain-catalysed hydrolysis of N-benzyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-serine methyl ester. *Biochem. J.* 143, (1974) 575-586.

[44] Suh, H.J.; Lee, H.; Cho, H.Y.; Yang, H.C. Purification and characterization of bromelain isolated from pineapple. *Han'guk Nonghwa Hakhoechi* 35, (1992) 300-307.

Figure List:

Figure 01: Scheme of UV-signal record during RTD test

Figure 02: Adsorption Equilibrium Curve

Figure 03: Expansion degree. (●) Streamline resin; (■) Amberlite IRA 410 ion-exchange resin

Figure 04: RTD tests. (■) H = 4.0 cm; (●) H = 6.0 cm; (▲) H = 8.0 cm; (◆) H = 10 cm

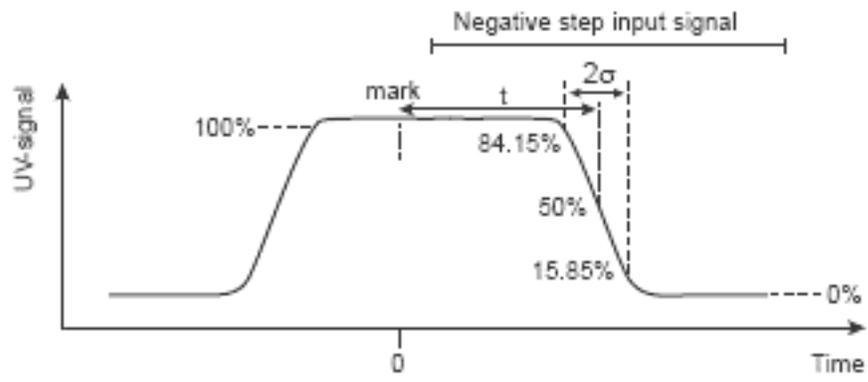
Figure 05: Bromelain Elution Chromatogram.

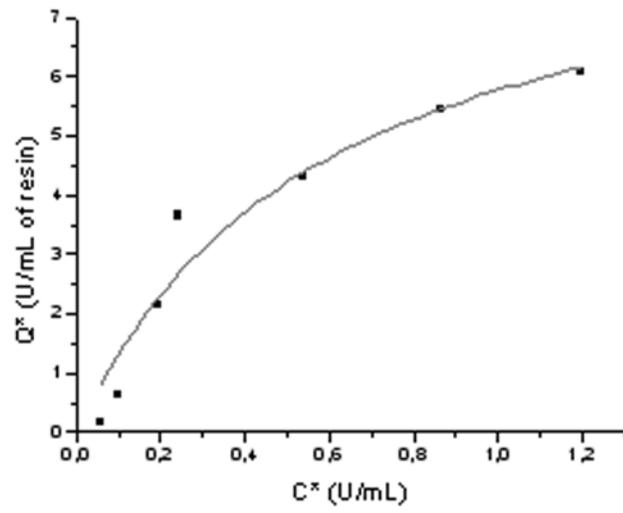
Figure 06: SDS-PAGE. Lane 1 - molecular weight markers; Lane 2 - Crude Extract; Lane 3 - Elution peaks. The molecular markers are Trypsinogen (24 kDa); Carbonic Anhydrase (29 kDa); Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36 kDa); Ovoalbumin (45 kDa); Glutamic dehydrogenase (55 kDa); and Albumin (66 kDa)

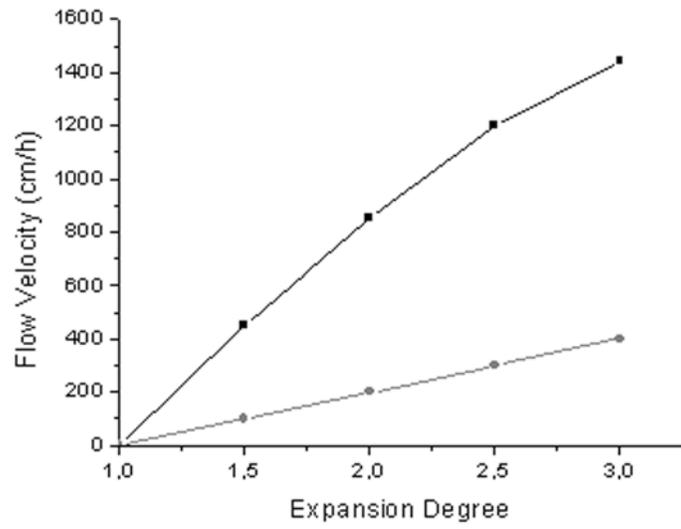
Table List:

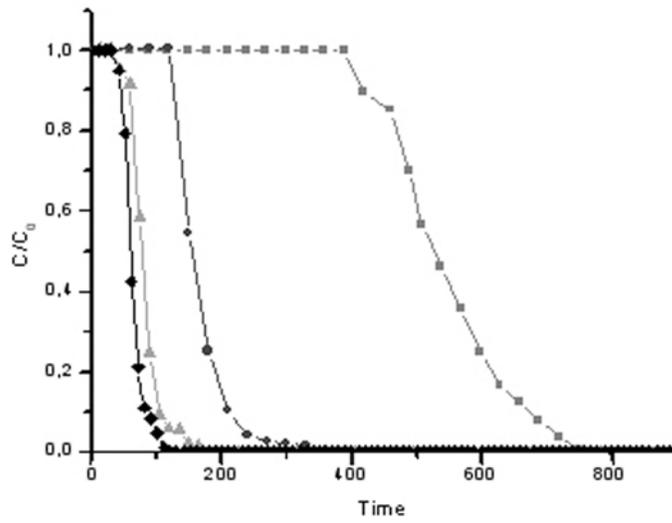
Table 01 – Experimental stability parameters obtained by RTD tests

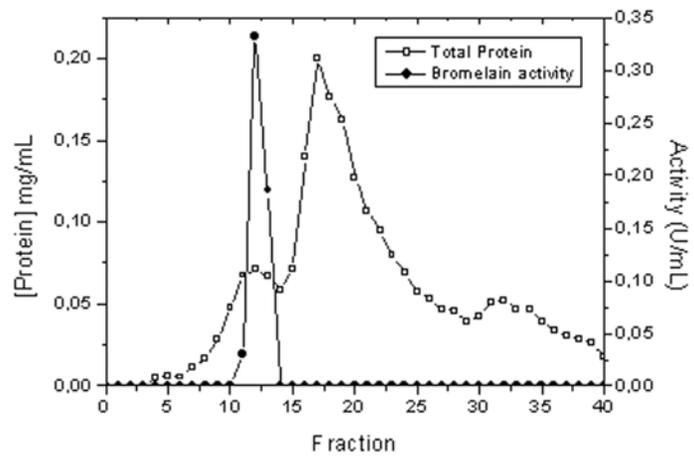
Table 02 – Expanded bed height influence on Bromelain recovery by EBA

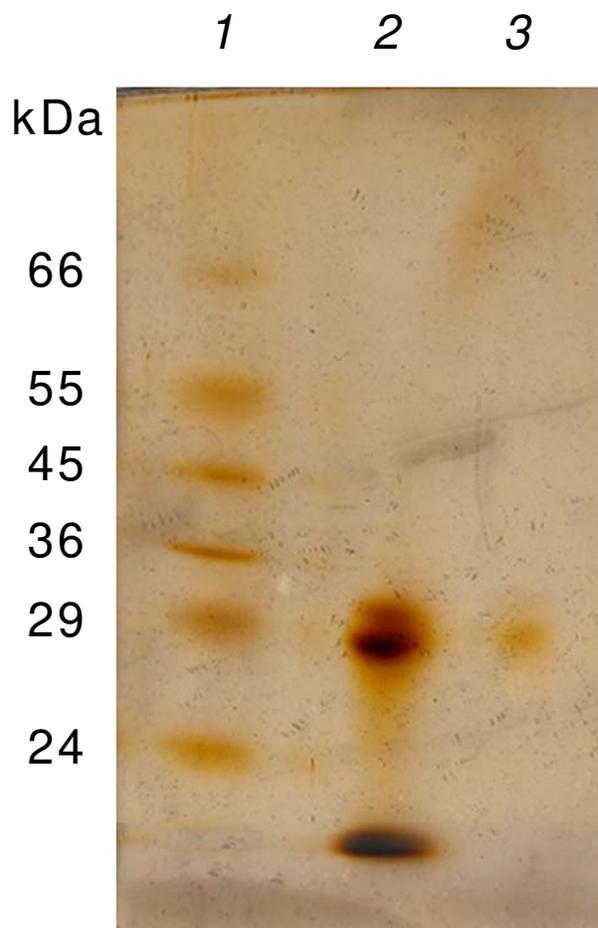












Bed	H (cm)	N	HETP (10^{-3})	ε	U (cm/h)	D_{axial} (cm^2/s)
Fixed	4.0	37.09	1.08	0.440	72.61	0.089
	6.0	20.21	2.97	0.627	454.39	1.076
Fluidized	8.0	19.68	4.06	0.720	850.7	2.401
	10.0	16.89	5.92	0.776	1200	4.578

Samples	H (cm)	Activity (U/mL)	Protein (mg/mL)	S.A. (U/mg)	P.F.
Crude	n/a	1.02	2.7	0.379	1
	4.0	0.088	0.104	0.851	2.24
Recurved	6.0	0.146	0.080	1.829	4.82
	8.0	0.263	0.081	3.214	8.48
	10.0	0.330	0.071	4.641	12.24

S.A. = specific activity; P.F. = Purification Factor

7. Conclusões

- Foi observado que a bromelina apresentou uma atividade ótima em pH neutro, e temperatura de 45 °C, onde retém mais de 75% de sua atividade inicial após 150 minutos;
- A resina comercial, Amberlite IRA 410, é viável para a Adsorção em Leito Expandido de bromelina;
- Foi observado também que com o aumento da velocidade linear, da expansão do leito e da porosidade do leito, um aumento na altura equivalente de pratos teóricos (*HEPT*), dispersão axial e fator de purificação foram obtidos; e
- A bromelina foi purificada em nível eletroforético.

8. Sugestões para Trabalhos Futuros

- Avaliar a variação do pH e força iônica do tampão de adsorção;
- Avaliar os métodos de eluição;
- Avaliar o aumento de escala, bem como a quantidade máxima de resina a ser utilizada em cada processo;
- Comparar a purificação com trocadores catiônicos; e
- Caracterizar a bromelina após a purificação em Adsorção em Leito Expandido.

Anexos

A-1: Método de Determinação de Atividade Proteolítica

A determinação da atividade proteolítica pode ser realizada conforme modificações das metodologias propostas por Kunitz (1947) e Walter (1984), como está descrito a seguir:

A. Reagentes

1. NaOH 1 M: Dissolver 4 g de NaOH em 100 mL de água (destilada ou deionizada).
2. Tampão fosfato 1 M, pH 7,5, dissolver:
 - 34 g de KH_2PO_4 em 250 mL de água.
 - 43,5 g de K_2HPO_4 ou 57 g $\text{K}_3\text{PO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ em 250 mL de água.

Juntar (b) com (a) e ajustar o pH para 7,5.

3. Ácido clorídrico, HCl 1 M: Adicionar 9,8 mL de HCl (a pelo menos 32%) em 72 mL de água.
4. Preparo do substrato tamponado.
 - Solução tamponada de caseína (2% m/v; fosfato 0,1 M, pH 7,5):
 - Suspender 2 g de caseína com cerca de 5 mL de água em um frasco volumétrico, adicionar NaOH (1), cerca de 30 mL de água e mexer bem com agitador magnético até que a caseína esteja completamente dissolvida. Adicionar 5 mL de tampão fosfato (2) para clarear a solução. Ajustar o pH 7,5 com HCl (3) e diluir para 100 mL com água. Solução estável por 1 semana.
5. HCl 0,05 mol/L: Diluir 1 mL da solução (3) com 19 mL de água.
6. Solução estoque de tirosina (5 mmol/L): dissolver 45,3 mg de tirosina em 50 mL da solução de HCl (5) - S_0 . Diluir para 3 (P_0), 2 (P_1), 1 (P_2), 0,5 (P_3) e 0,25 (P_4) mM com a solução (5). Homogeneizar a solução antes de diluir.
7. Ácido tricloroacético (TCA) 0,3 mol/L: Dissolver 4,9 g de TCA em 100 mL de água (ou diluir 30 mL de TCA 15% para 90 mL).
8. NaOH 0,5 mol/L: Diluir 50 mL da solução (1) em 50 mL de água.

B. Procedimento

1. Pipetar em tubos de centrífuga separados: 2,5 mL de solução de substrato (4.1) nos tubos T e B₃, 2,5 mL de solução de HCl (5) em B₁ e B₂ e 2,5 mL de cada solução padrão de tirosina (6) (Padrões - P₀, P₁, P₂, P₃, P₄).
2. Deixar em banho por 3 a 5 minutos em temperatura de 37°C.
3. Adicionar 0,2 mL da amostra (enzima) aos tubos T e B₁, e 0,2 mL de HCl 0,05 M (5) aos demais.
4. Misturar e deixar incubando por 10 minutos a 37°C.
5. Ao fim do tempo adicionar 5 mL de TCA (7a).
6. Misturar e adicionar 0,2 mL de amostra ao branco.
7. Deixar em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Remover o precipitado por filtração ou centrifugação por 20 minutos a 4000 g (centrífuga Fanem em velocidade 10 por 20 minutos).

C. Medida da Atividade

Ler a variação de absorbância a 280 nm (no filtrado ou sobrenadante).

- Absorbância da amostra: A_T
- Absorbância do branco B₁: A_{B1}
- Absorbância do branco B₃: A_{B3}
- Através de A_T - A_{B1} - A_{B3}, encontra-se, na curva de calibração, a concentração de tirosina, C_{tir}, produzida pela ação da protease presente em 0,2 mL de amostra em 10 minutos a 37°C.

O resultado final, em atividade enzimática, é dado por:

$$\text{Atividade} = 0,02 \cdot C_{\text{tir}} \quad (\mu\text{mol}/\text{min})$$

*D. Procedimento Esquemático***Tubo T (Teste):**

1. 2,5 mL de caseína 2%; pH 7,5; Tampão fosfato 0,1 M.
2. Repouso 37°C por 3 a 5 min
3. 0,2 mL de amostra
4. Misturar, deixar a 37°C por 10 min

5. 5 mL de TCA
6. Repouso 10 min, temperatura ambiente
7. Centrifugar a temperatura ambiente, 4000 g, 20 min
8. Ler absorbância do sobrenadante em 280 nm.

Tubo B₁ (Branco da amostra):

1. 2,5 mL de HCl 0,05 M
2. Repouso 37°C por 3 a 5 min
3. 0,2 mL de amostra
4. Misturar, deixar a 37°C por 10 min
5. 5 mL de TCA
6. Repouso 10 min, temperatura ambiente
7. Centrifugar a temperatura ambiente, 4000 g, 20 min
8. Ler absorbância do sobrenadante em 280 nm.

Tubo B₂ (Branco do aparelho):

1. 2,5 mL de HCl 0,05 M
2. Repouso 37°C por 3 a 5 min
3. 0,2 mL de HCl 0,05 M (em substituição à amostra)
4. Misturar, deixar a 37°C por 10 min
5. 5 mL de TCA
6. Repouso 10 min, temperatura ambiente
7. Centrifugar a temperatura ambiente, 4000 g, 20 min
8. Ler absorbância do sobrenadante em 280 nm

Tubo B₃ (Branco do substrato):

1. 2,5 mL de caseína 2%; pH 7,5; Tampão fosfato 0,1 M.
2. Repouso 37°C por 3 a 5 min
3. 0,2 mL de HCl 0,05 M (em substituição à amostra)
4. Misturar, deixar a 37°C por 10 min
5. 5 mL de TCA
6. Repouso 10 min, temperatura ambiente
7. Centrifugar a temperatura ambiente, 4000 g, 20 min

8. Ler absorbância do sobrenadante em 280 nm

E. Preparo dos Padrões de Tirosina

Solução Estoque (S_0): 5 mM

P_0 : 3 mL S_0 + 2 mL de água = 3 mM de tirosina

P_1 : 2 mL S_0 + 3 mL de água = 2 mM de tirosina

P_2 : 1 mL S_0 + 4 mL de água = 1 mM de tirosina

P_3 : 2,5 mL P_2 + 2,5 mL de água = 0,5 mM de tirosina

P_4 : 2,5 mL P_3 + 2,5 mL de água = 0,25 mM de tirosina

Tubo P_0 :

1. 2,5 mL de tirosina 3 mM
2. Repouso 37°C por 3 a 5 min
3. 0,2 mL HCl 0,05 M
4. Misturar, deixar a 37°C por 10 min
5. 5 mL de TCA
6. Repouso 10 min, temperatura ambiente
7. Centrifugar a temperatura ambiente, 4000 g, 20 min
8. Ler a absorbância do sobrenadante em 280 nm.

Tubo P_1 :

1. 2,5 mL de tirosina 2 mM
2. Repouso 37°C por 3 a 5 min
3. 0,2 mL HCl 0,05 M
4. Misturar, deixar a 37°C por 10 min
5. 5 mL de TCA
6. Repouso 10 min, temperatura ambiente
7. Centrifugar a temperatura ambiente, 4000 g, 20 min
8. Ler a absorbância do sobrenadante em 280 nm.

Tubo P_2 :

1. 2,5 mL de tirosina 1 mM
2. Repouso 37°C por 3 a 5 min

3. 0,2 mL HCl 0,05 M
4. Misturar, deixar a 37°C por 10 min
5. 5 mL de TCA
6. Repouso 10 min, temperatura ambiente
7. Centrifugar a temperatura ambiente, 4000 g, 20 min
8. Ler a absorvância do sobrenadante em 280 nm.

Tubo P₃:

1. 2,5 mL de tirosina 0,5 mM
2. Repouso 37°C por 3 a 5 min
3. 0,2 mL HCl 0,05 M
4. Misturar, deixar a 37°C por 10 min
5. 5 mL de TCA
6. Repouso 10 min, temperatura ambiente
7. Centrifugar a temperatura ambiente, 4000 g, 20 min
8. Ler a absorvância do sobrenadante em 280 nm.

Tubo P₄:

1. 2,5 mL de tirosina 0,25 mM
2. Repouso 37°C por 3 a 5 min
3. 0,2 mL HCl 0,05 M
4. Misturar, deixar a 37°C por 10 min
5. 5 mL de TCA
6. Repouso 10 min, temperatura ambiente
7. Centrifugar a temperatura ambiente, 4000 g, 20 min
8. Ler a absorvância do sobrenadante em 280 nm.

F. Atividade das Proteases Neutras

- Absorvância da amostra T: A_T
- Absorvância do branco B₁: A_{B1}
- Absorvância do branco B₃: A_{B3}

- Através de $A_T - A_{B1} - A_{B3}$, encontra-se na curva de calibração, a concentração de tirosina, C_{tir} , produzida pela ação da protease presente em 0,2 mL de amostra em 10 min a 37°C .

A-2: Conversão entre fluxo linear (cm/h) e fluxo volumétrico (mL/min) e vice-versa

Para converter fluxo linear em fluxo volumétrico, usa-se o seguinte cálculo:

$$\begin{aligned} \text{Fluxo.Volumétrico} &= \frac{\text{Fluxo.Linear}}{60} \cdot \text{área.da.coluna}(cm^2) \\ &= \left(\frac{Y}{60}\right) \cdot \left(\frac{\pi \cdot d^2}{4}\right) \end{aligned}$$

onde Y é o fluxo linear (cm/h) e d é o diâmetro interno da coluna.

Para converter fluxo volumétrico em fluxo linear, usa-se o seguinte cálculo:

$$\begin{aligned} \text{Fluxo.Linear} &= \frac{\text{Fluxo.volumétrico} \cdot 60}{\text{área.da.coluna}(cm^2)} \\ &= Z \cdot 60 \cdot \left(\frac{4}{\pi \cdot d^2}\right) \end{aligned}$$

onde Z é o fluxo volumétrico (mL/min) e d é o diâmetro interno da coluna.