

## Estruturas secundárias de proteínas de *Spirulina platensis* obtidas por processo de separação por membranas

Anne Luize Lupatini Menegotto<sup>1</sup>, Jocelei Duarte<sup>2</sup>, Mára Zeni Andrade<sup>3</sup>, Ilizandra Aparecida Fernandes<sup>4</sup>, Juliana Steffens<sup>5</sup>, Eunice Valduga<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Erechim, RS. E-mail: annelupatini@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS. E-mail: jduarte@ucs.br

<sup>3</sup>Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS. E-mail: mzandrad@ucs.br

<sup>4</sup>Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS. E-mail: ilizandrafernandes@yahoo.com.br

<sup>5</sup>Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS. E-mail: julisteffens@uricer.edu.br

<sup>6</sup>Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS. E-mail: veunice@uricer.edu.br

**Resumo:** A *Spirulina platensis* é uma microalga que vem se destacando pelo seu alto conteúdo proteico (60-70% em peso seco), sendo considerada uma fonte não convencional no aporte deste nutriente. Contudo, as condições de obtenção de proteínas desta microalga podem afetar as suas propriedades, levando a necessidade de novos estudos sobre diferentes métodos de extração e purificação de proteínas de *S. platensis*. O processo de separação por membranas (PSM) é uma técnica eficaz, econômica e capaz de separar bioconstituintes, mantendo a sua estrutura. Desta forma, o intuito deste estudo foi alcançar maiores informações sobre as frações proteicas obtidas pelo PSM, através do estudo das estruturas secundárias das proteínas por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Conforme os resultados, foi possível verificar as estruturas secundárias das frações proteicas obtidas pelo PSM são semelhantes com as estruturas da biomassa de *S. platensis*, confirmando a eficiência do processo em aumentar a concentração proteica, mantendo suas propriedades. A presença das conformações estruturais,  $\alpha$ -hélice e  $\beta$ -folha, pode estar relacionada com as propriedades térmicas e tecno-funcionais que as frações proteicas de *S. platensis* podem vir a apresentar.

**Palavras-chave:** espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), microalgas, parâmetros espectrais,  $\alpha$ -hélice,  $\beta$ -folha.

### 1. Introdução

A insuficiência proteica na alimentação humana, vem ocorrendo em diversos países subdesenvolvido (Chel-Guerrero et al., 2002), assim, para suprir a deficiência proteica, fontes

não convencionais de proteínas, tais como microalgas, são cada vez mais utilizadas (Lupatini et al., 2017b). Entre as microalgas, a *Spirulina* spp. é considerada uma excelente fonte de proteínas, apresentando entre 55,8 a 77% deste componente em peso seco (Barka; Blecker, 2016).

A *Spirulina platensis* é a espécie que mais se destaca, pois além do seu potencial nutricional, pode compor formulações de alimentos, aprimorando seu processamento, devido suas apreciáveis propriedades tecno-funcionais, tais como propriedades emulsificantes, espumantes, gelificantes, entre outras (Menegotto et al., 2019; Benelhadj et al., 2016). Além disso, por apresentar alta concentração de ficobiliproteínas, entre elas a ficocianina (Su et al., 2014), que é considerada um corante natural (Sudhakar et al., 2015) e um composto bioativo com alta atividade antioxidante (Su et al., 2014).

Entretanto, as propriedades das proteínas de *S. platensis* podem ser afetadas de acordo com o seu método de obtenção (Jambrak et al., 2008). Em geral, proteínas com alto grau de pureza necessitam de técnicas de fracionamento sequenciais e com uso de solventes, o que pode causar perda do produto final, alto custo e tempo (Chen et al., 2019). Por outro lado, o processo de separação por membranas (PSM) é uma técnica simples, eficiente, econômica e capaz de separar bioconstituintes, mantendo a sua estrutura nativa (Baldasso et al., 2011). Além disso, o PSM pode ser associado com diafiltrações (DF), o que se refere a adição de um solvente, na maioria das vezes água, à alimentação do processo, e tem contribuído com o aumento da concentração proteica (Abel et al., 2018).

Um método de avaliação das propriedades das proteínas é pela determinação de suas estruturas secundárias, as quais, podem ser quantificadas pela análise de parâmetros espectrais utilizando espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR); na região do infravermelho, as frequências de bandas correspondentes às vibrações amina I, II e III são sensíveis à estrutura secundária das proteínas, sendo a banda da amina I a mais sensível às alterações na estrutura secundária (Miyazawa; Blout, 1961). As conformações  $\alpha$ -hélice e  $\beta$ -folha são as principais estruturas secundárias em proteínas (Nelson; Cox, 2002).

Com base no exposto verifica-se que as proteínas de *S. platensis* são um importante objeto de estudo de diversas áreas de investigação científica. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi determinar as propriedades secundárias das proteínas da biomassa de *S. platensis* e de suas frações proteicas obtidas pelo PSM (permeado e concentrado), através da identificação dos parâmetros espectrais utilizando FTIR.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Extração e separação das proteínas de *S. platensis*

A biomassa inativa da microalga *S. platensis* desidratada foi obtida comercialmente. A extração proteica foi realizada conforme Lupatini et al. (2017a) com adaptações. A biomassa foi suspensa em água purificada (30 g/L) e o pH foi ajustado com NaOH 0,1 M para 9,0. A suspensão foi submetida ao tratamento ultrassônico em banho de ultrassom (Unique, USC-1800A, Indaiatuba) na frequência de 40 kHz, amplitude de 90% por 35 min e, em seguida à agitação mecânica (Fisatom, 712, São Paulo) na velocidade de 100 rpm por 50 min. Para separação das fases realizou-se a centrifugação à 7000 rpm, 25°C por 15 min (Biosystems, MPW-351R, Curitiba). O extrato proteico de *S. platensis* (EPSp), obtido a partir do

sobrenadante coletado na etapa de extração foi submetido a uma filtração convencional (papel filtro qualitativo 60x60 cm, gramatura 80 g) e, em seguida aos ensaios de PSM.

Primeiramente, realizou-se a ultrafiltração (UF) com membrana de poliétersulfona (847, PAM- Membranas, Rio de Janeiro), tipo fibra oca com tamanhos de poros assimétricos de corte de 50 kDa, área de filtração de 0,027 m<sup>2</sup>, fluxo tangencial, pressão de 1,5 bar e 30°C. Em seguida, uma DF foi associada ao processo (UF/DF); considerando o fator de concentração de 1,39, o qual foi calculado de acordo com a Equação 1 (Atra et al., 2015). Para tal, foi adicionada água ao concentrado obtido pela UF, o qual foi novamente filtrado. O volume de água adicionada foi proporcional para completar o volume inicial de EPSp (500 mL).

$$FC = \frac{V_i}{(V_i - V_p)} \quad (1)$$

Onde  $V_i$  é o volume inicial (L) e  $V_p$  o volume de permeado (L).

O processo foi realizado em batelada por aproximadamente 0,7 h, e o fluxo de permeado foi monitorado a cada 5 min, calculado de acordo com Cuartas-Uribe et al. (2007) – Equação 2.

$$J = \frac{V_p}{(A \cdot t)} \quad (2)$$

Onde  $V_p$  é o volume de permeado (L),  $A$  é a área de permeação (m<sup>2</sup>) e  $t$  é o tempo de permeação (h).

A composição de proteínas foi determinada pela quantificação de nitrogênio pelo método de oxidação por combustão catalítica a 720°C com detecção por infravermelho (Shimadzu, TOC-VCSH, Japão), considerando-se o fator de 6,25 para converter nitrogênio em proteína. Os resultados de proteínas foram expressados em base seca (bs); a umidade das amostras foi determinada conforme AOAC (2016).

## 2.2. Identificação de parâmetros espectrais

A análise da estrutura proteica do concentrado proteico de *S. platensis* foi realizada pela técnica de FTIR. O concentrado proteico liofilizado foi submetido à análise em espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (PerkinElmer, FT-IR Spectrum 100S, Estados Unidos) acoplado com o acessório de reflexão total atenuada (ATR), no intervalo de número de onda de 600–4000 cm<sup>-1</sup>.

As estruturas secundárias das proteínas de *S. platensis* foram avaliadas por meio de deconvolução da região de interesse (1800 – 1500 cm<sup>-1</sup>, correspondente à região da amina I), por meio da segunda derivativa e do *curve-fitting* (ajuste das curvas por deconvolução espectral). Os picos foram ajustados e a área medida por funções gaussianas tendo sido observados os centros e áreas dos mesmos.

### 2.3. Análise Estatística

Os resultados (n=3) foram tratados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) ( $p \leq 0,05$ ), seguido da comparação entre as médias pelo Teste de Tukey a nível de 95% de confiança, utilizando o *software* Statistica 5.0 (StatSoft Inc., EUA). O ajuste dos dados experimentais de FTIR foi realizado com o *software* OriginPro 7.0 (OriginLab Corporation, EUA).

### 3. Resultados e Discussão

Os resultados do PSM em termos de conteúdo proteico (base seca – bs) estão apresentados na Tabela 1. O percentual de proteínas no extrato bruto era 58,23%, ao utilizar UF foi possível aumentar para 60,94% na fração concentrado e com a associação de uma DF, também no concentrado, o conteúdo proteico teve um acréscimo de 17%. Ao incluir a DF no processo, água foi adicionada e os solutos foram diluídos, o que, no início, causou o aumento do fluxo de permeado (Figura 1). Com o passar do tempo, o fluxo diminuiu novamente devido a nova concentração de solutos na superfície da membrana.

Tabela 1 – Percentual de proteínas totais obtido pelo processo de extração proteica, UF e UF/DF de *S. platensis*.

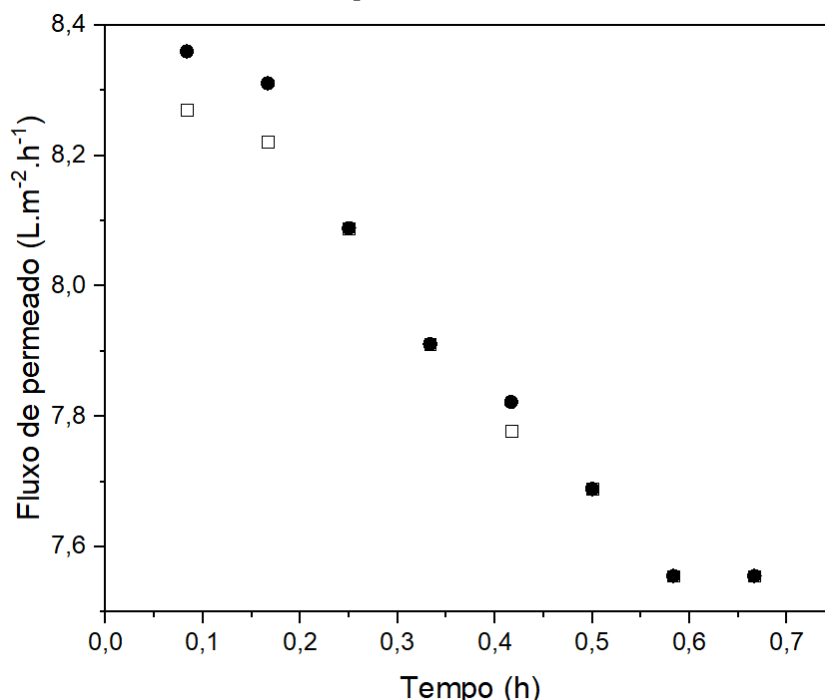
|                  | <b>Proteína (% , bs)</b>  |
|------------------|---------------------------|
| Extrato proteico | 58,23 <sup>c</sup> ± 0,74 |
| UF C             | 60,94 <sup>b</sup> ± 0,54 |
| UF P             | 27,87 <sup>e</sup> ± 0,12 |
| DF C             | 88,09 <sup>a</sup> ± 0,11 |
| DF P             | 55,26 <sup>d</sup> ± 0,21 |

\*Média ± desvio padrão seguidas de letras diferentes diferem a nível de 95% de confiança pelo teste de Tukey; UF: ultrafiltração; DF: diafiltração; C: concentrado; P: permeado.

O resultado obtido na fração retida pela membrana pela DF (DF C) faz com que a amostra seja considerada um concentrado proteico de *S. platensis*, de acordo com a Resolução RDC no 268 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Brasil, 2005). O resultado de percentual proteico para o permeado da DF (DF P), também, apresentou um aumento ao comparar com o permeado da UF (UF P), indicando que o processo de diluição dos solutos, também, favoreceu a permeação de proteínas de tamanho molecular menor.

Ao verificar o fluxo de permeado do processo de UF e DF (Figura 1) é possível notar que o fluxo diminui rapidamente até o tempo de 0,5 h e em 0,6 h o fluxo fica constante. Este fenômeno ocorreu devido ao aumento da camada de solutos na superfície da membrana (Galanakis, 2015). Conforme Zhang et al. (2016) a redução do fluxo pode ser explicada pela polarização causada por proteínas depositadas e absorvidas pela membrana em um curto período de tempo, assim, ocorre a incrustação e o fluxo reduz rapidamente. Após isso, devido à capacidade de “autolimpeza” da alta taxa de cisalhamento, o fluxo diminui e quando se torna constante, a camada de incrustação não é aumentada, sendo desenvolvido um equilíbrio entre a pressão e a taxa de cisalhamento.

Figura 1 – Fluxo de permeado do processo de UF (□) e DF (●) do extrato proteico de *S. platensis*.

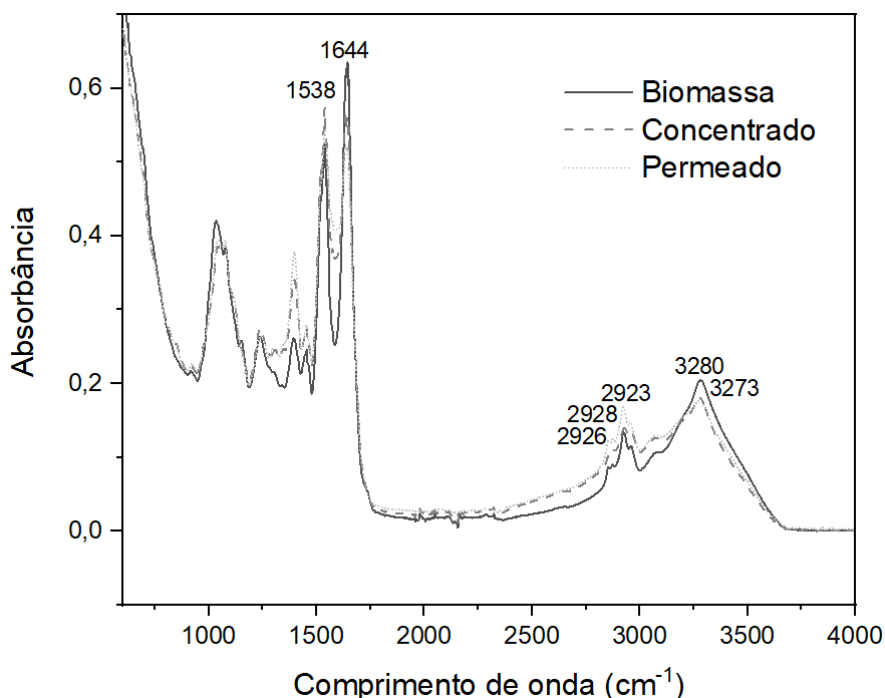


A Figura 2 apresenta o espectro de FTIR da biomassa de *S. platensis*, do concentrado e do permeado do processo de UF/DF. Nos três espectros é possível identificar bandas características de proteínas (Figura 2). Em  $1644\text{ cm}^{-1}$  as amostras apresentaram o pico de maior intensidade, característico do grupamento amina I ( $1600\text{ a }1700\text{ cm}^{-1}$ ), o qual é atribuído devido ao estiramento da ligação C=O da ligação peptídica e a ligação entre proteína e água (Nelson; Cox, 2002).

Além disso, foi possível identificar a banda característica da amida II que ocorreu em  $1538\text{ cm}^{-1}$  para as três amostras. Outras bandas decorrentes de proteínas, também, foram observadas, tais como:  $2923$ ,  $2928$  e  $2926\text{ cm}^{-1}$  na biomassa, concentrado e permeado, respectivamente, que ocorrem devido as ligações C–H e  $3280$  (biomassa) e  $3273\text{ cm}^{-1}$  (concentrado e permeado) que são bandas resultantes da deformação axial da ligação N–H (Silverstein et al., 2012). Outros estudos encontrados na literatura, também, indicam os valores similares para amida I em amostras de biomassa e/ou concentrados proteicos de *S. platensis*. Gunasundari e Kumar (2017), estimaram que a banda de  $1626\text{ cm}^{-1}$  corresponde a amida I da biomassa de *S. platensis*, e Suganya et al (2015) verificou a banda da amida I do concentrado de *S. platensis* em  $1664\text{ cm}^{-1}$ . O espectro de FTIR, também, revelou que o processo de UF/DF reduziu a intensidade da banda da amida I, como esperado, devido a separação das proteínas de *S. platensis*.

Os resultados obtidos por meio das análises de *curve-fitting* da segunda derivativa (Figura 3) revelaram os conteúdos (%) e a presença das estruturas secundárias nas amostras avaliadas. Para determinação das bandas pertencentes aos diferentes grupos das estruturas secundarias, levaram-se em consideração os intervalos para proteína do leite  $\beta$ -lactoglobulina (Li; Ma; Ngadi, 2013).

Figura 2 – Espectros de FTIR da biomassa de *S. platensis*, e do concentrado e permeado de UF/DF.



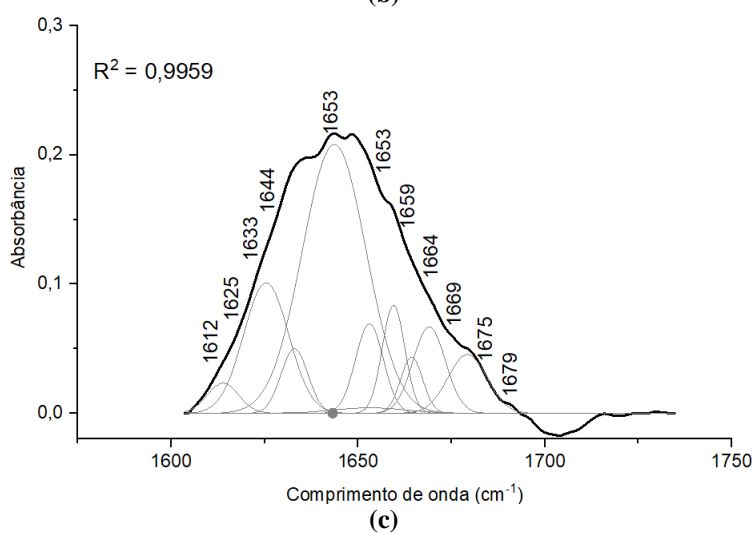
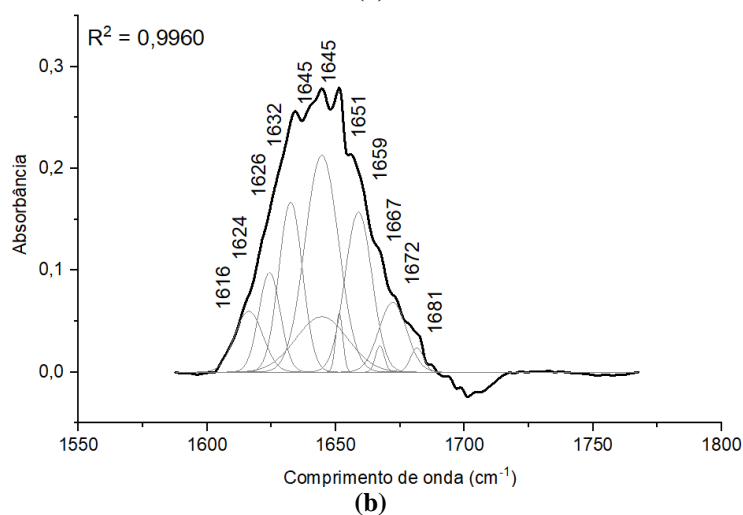
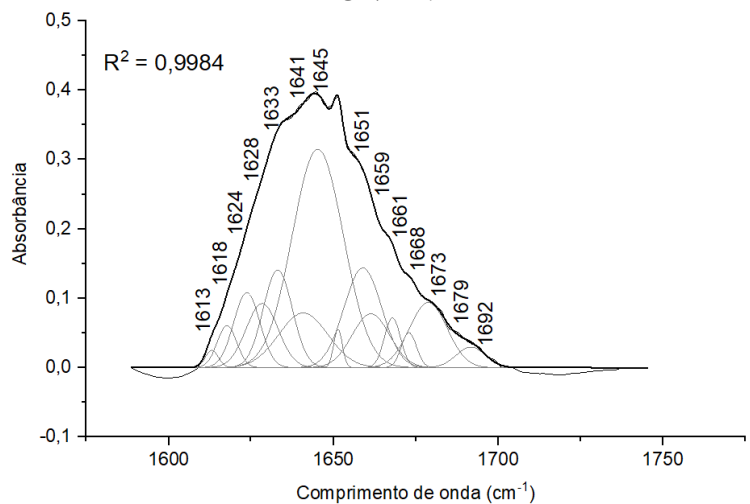
Para as três amostras, a estrutura predominante foi a randômica, contudo, de acordo com Ulrichs et al. (2015) pela identificação das estruturas por FTIR não é possível distinguir claramente as estruturas  $\alpha$ -hélice e randômica. Assim, considerou-se a estrutura randômica/ $\alpha$ -hélice como predominante, com 47,26, 58,55 e 57,96% para biomassa, concentrado e permeado, respectivamente.

A conformação  $\alpha$ -hélice e o aumento de sua concentração na estrutura proteica podem favorecer as propriedades tecno-funcionais da proteína, devido sua constituição em aminoácidos polares e apolares, o que faz que sua característica anfifílica contribua com propriedades emulsificantes, por exemplo (Nelson; Cox, 2002). A estrutura  $\beta$ -folha, também, apresentou alto percentual nas proteínas avaliadas de 32,81, 31,63 e 20,04% para biomassa, concentrado e permeado, respectivamente. Devido a composição de aminoácidos hidrofóbicos, a estrutura  $\beta$ -folha, por sua vez, promove o aumento da estabilidade das proteínas, principalmente em alta temperatura.

Conforme Jiang et al. (2014), o uso de ondas ultrassônicas é responsável por afetar as estruturas secundárias e terciárias das proteínas, melhorando a solubilidade proteica devido à ruptura das interações hidrofóbicas e ao movimento molecular. Como neste trabalho foi utilizado ultrassom para extração proteica, esse fato justifica as alterações nas estruturas secundárias da biomassa e do concentrado e permeado, onde a diminuição no percentual de  $\beta$ -folha e o aumento de  $\alpha$ -hélice estão diretamente relacionados com a solubilidade proteica.

Conforme o exposto, é possível verificar que o PSM foi capaz em garantir que as estruturas secundárias das proteínas de *S. platensis* não sofressem alteração, sendo a diferença entre os resultados entre a biomassa e o concentrado é relativamente pequena, e a alteração da estrutura secundária do permeado se deve, principalmente pela concentração de proteínas menores e com características distintas.

Figura 3 - *Curve-fitting* por meio da segunda derivativa da região amina I da biomassa de *S. platensis* (a) e das frações proteicas, concentrado (b) e permeado (c) obtido pelo processo de UF/DF.





#### 4. Conclusão

Com a associação de uma DF na UF do extrato proteico de *S. platensis* foi possível aumentar cerca de 17% de proteínas, confirmando o potencial da DF para concentrar biomoléculas. Além disso, o PSM não foi responsável por alterar a composição em termos de estruturas secundárias presentes na biomassa e no concentrado. A estrutura secundária do permeado apresentou algumas diferenças, sobretudo pela presença de proteínas menores.

Os resultados também destacam as promissoras características que as proteínas de *S. platensis* podem apresentar, revelando potencial além de suas propriedades nutricionais, podendo compor formulações de alimentos e contribuir com o processamento alimentício.

#### 5. Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES, CNPq, FAPERGS e URI pela concessão de bolsas de estudo e/ou apoio financeiro.

#### 6. Referências Bibliográficas

ABEL, J.; KOSKY, A.; BALL, N.; BACON, H.; KAUSHILK, R.; KLEEMANN, G. R. A small-scale process for prediction of donnan and volume exclusion effects during ultrafiltration/diafiltration process development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 107, 1296–1303, 2018.

AOAC. **Official methods of analysis of AOAC international**. 20. ed. Maryland: AOAC International, 2016.

ATRA, R.; VATAI, G.; BEKASSY-MOLNAR, E.; BALINT, A. Investigation of ultra- and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. **Journal of Food Engineering**, 67, 325–332, 2005.

BALDASSO, C., BARROS, T. C., TESSARO, I. C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. **Desalination**, 278, 381–386, 2011

BARKA, A.; BLECKER, C. Microalgae as a potential source of single-cell proteins. A review. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, 20, 427–436, 2016.

BENELHADJ, S.; GHARSALLAOUI, A.; DEGRAEVE, P.; ATTIA, H.; GHORBEL, D. Effects of pH on the functional properties of *Arthrospira (Spirulina) platensis* protein isolate. **Food Chemistry**, 196, 1056–1063, 2016.

BRASIL. Resolução RDC no 268, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para produtos protéicos de origem vegetal. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**: Brasil, 2005.

Disponível em:  
<[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC\\_268\\_2005.pdf/60145a2f-eb4c-4911-b1e0-46d776357a25](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_268_2005.pdf/60145a2f-eb4c-4911-b1e0-46d776357a25)>. Acesso em: 27 março 2018.



CHEL-GUERRERO, L.; PEREZ-FLORES, V.; BENTACUR-ANCONA, D.; DAVILA-ORTIZ, G. Functional properties of flours and protein isolates from *Phaseolus lunatus* and *Canavalia ensiformis* seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 584–591, 2002.

CHEN, K.-H., WANG, S. S.-S., SHOW, P.-L., LIN, G.-T., CHANG, Y.-K. A rapid and efficient technique for direct extraction of C-phycoerythrin from highly turbid *Spirulina platensis* algae using hydrophobic interaction chromatography in stirred fluidized bed. **Biochemical Engineering Journal**, 140, 47–56, 2019.

CUARTAS-URIBE, B.; ALCAINA-MIRANDA, M. I.; SORIANO-COSTA, E.; BES-PIA, A. Comparison of the behavior of two nanofiltration membranes for sweet whey demineralization. **Journal of Dairy Science**, 90, 1094–1101, 2007.

GALANAKIS, C. M. Separation of functional macromolecules and micromolecules: From ultrafiltration to the border of nanofiltration. **Trends in Food Science & Technology**, 42, 44–63, 2015.

GUNASUNDARI, E.; KUMAR, P.S. Higher adsorption capacity of *Spirulina platensis* alga for CR(VI) ions removal: parameter optimization, equilibrium, kinetic and thermodynamic prediction. **IET Nanobiotechnology**, 11, 317–328, 2017.

JAMBRAK, A. R.; MASON, T. J.; LELAS, V.; HERCEG, Z.; HERCEG, I. L. Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. **Journal of Food Engineering**, v. 86, p. 281–287, 2008.

JIANG, L.; WANG, J.; LI, Y.; WANG, Z.; LIANG, J.; WANG, R.; CHEN, Y.; MA, W.; QI, B.; ZHANG, M. Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates. **Food Research International**, 62, 595–601, 2014.

LI, M.; MA, Y.; NGADI, M. O. Binding of curcumin to  $\beta$ -lactoglobulin and its effect on antioxidant characteristics of curcumin. **Food Chemistry**, 141, 1504–1511, 2013.

LUPATINI, A. L.; BISPO, L. O.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V.; CANAN, C.; COLLA, E. Protein and carbohydrate extraction from *S. platensis* biomass by ultrasound and mechanical agitation. **Food Research International**, 99, 1028–1035, 2017a.

LUPATINI, A. L.; COLLA, L. M.; CANAN, C.; COLLA, E. Potential application of microalgae *Spirulina platensis* as a protein source. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 97, 724–732, 2017b.

MENEGOTTO, A. L. L.; DE SOUZA, L. E. S.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V.; SEHN, E.; BITTENCOURT, P. R. S.; FLORES, É. L. M.; CANAN, C.; COLLA, E. Investigation of techno-functional and physicochemical properties of *Spirulina platensis* protein concentrate for food enrichment. **LWT – Food Science and Technology**, 114, 108267, 2019.

MIYAZAWA, T.; BLOUT, E. R. The infrared spectra of polypeptides in various conformations: Amide I and II bands. **Journal of the American Chemical Society**, 83, 712–719, 1961.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. (3rd ed.) São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos LTDA, 2002.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. (8th ed.). New Jersey: John Wiley & Sons, 2012.

SU, C. H.; LIU, C. S.; YANG, P. C.; SYU, K. S.; CHIUH, C. C. Solid-liquid extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis*: Kinetic modeling of influential factors. **Separation and Purification Technology**, v. 123, p. 64–68, 2014.

SUGANYA, K. S. U., GOVINDARAJU, K.; KUMAR, V. G.; DHAS, T. S.; KARTHICK, V.; SINGARAVELU, G.; ELANCHEZHIAN, M. Blue green alga mediated synthesis of gold nanoparticles and its antibacterial efficacy against Gram positive organisms. **Materials Science and Engineering C**, 47, 351–356, 2015.

ULRICHS, T.; DROTTLEFF, A. M.; TERNES, W. Determination of heat-induced changes in the protein secondary structure of reconstituted livetins (water-soluble proteins from hen's egg yolk) by FTIR. **Food Chemistry**, 172, 909–920, 2015.

ZHANG, W.; DING, L.; GRIMI, N.; JAFFRIN, M.; TANG, B. Application of UF-RDM (Ultrafiltration rotation disk membrane) module for separation and concentration of leaf protein from alfalfa juice: Optimization of operation conditions. **Separation and Purification Technology**, 175, 365–375, 2016.