

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:  
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS**

**EXTRAÇÃO LÍQUIDO – LÍQUIDO DE XILANASE POR MICELA REVERSA  
NUMA MICROCOLUNA DE CAMPÂNULAS PULSADAS**

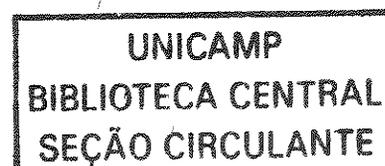
Eliana Maria Gonçalves Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade  
de Engenharia Química como parte dos  
requisitos exigidos para a obtenção do título  
de Doutor em Engenharia Química

Campinas - São Paulo - Brasil

Setembro/2001



|              |                                     |
|--------------|-------------------------------------|
| UNIVERSIDADE | BC                                  |
| Nº CHAMADA:  | T/ UNICAMP                          |
|              | R618e                               |
| EX.          |                                     |
| DMBO BC/     | 47208                               |
| ROC.         | 16-837/02                           |
| C            | <input type="checkbox"/>            |
| D            | <input checked="" type="checkbox"/> |
| REC.         | R\$ 11,00                           |
| ATA          | 15-01-2002                          |
| CPD          |                                     |

CM00162573-B

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

R618e Rodrigues, Eliana Maria Gonçalves  
Extração líquido-líquido de xilanase por micela reversa  
numa microcoluna de campânulas pulsadas / Eliana Maria  
Gonçalves Rodrigues. --Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientador: Elias Basile Tambourgi.  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

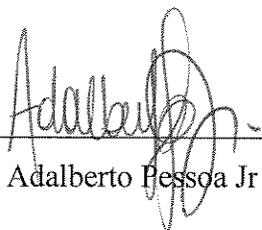
1. Proteínas - Separação. 2. Planejamento  
experimental. 3. Enzimas. 4. Extração - Equipamento.  
I. Tambourgi, Elias Basile. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Tese de Doutorado defendida por Eliana Maria Gonçalves Rodrigues e aprovada em 24 de setembro de 2001 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



---

prof. Dr. Elias Basile Tambourgi



---

prof. Dr. Adalberto Pessoa Jr



---

prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Paula Brescancini Rabelo



---

prof<sup>a</sup>. Dra. Lúcia Helena Innocentini Mei



---

prof. Dr. Roger Josef Zemp

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química.



---

prof. Dr. Elias Basile Tambourgi

Aos meus pais Sebastião G. Rodrigues e M<sup>a</sup> Salete G.S. Rodrigues  
À minha avó Ana Gonçalves da Silva

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me permitido concluir mais uma etapa em minha vida.

Ao Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi, pela orientação, amizade e confiança que estiveram sempre presentes durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof. Dra. Adriane Maria Ferreira Milagres e ao Djalma pela colaboração na produção da enzima.

Aos amigos de laboratório pelo companheirismo, dedicação e colaboração na execução deste trabalho.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Engenharia Química pelo apoio e amizade dispensados durante a realização deste trabalho.

À FAPESP pelo suporte financeiro.

Ao André Antonio de Siqueira pelo incentivo, apoio, amizade e paciência que foram a mim dedicados.

A todos os amigos da Pós-Graduação que compartilharam durante este período momentos de companheirismo, amizade e apoio.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

## RESUMO

Neste trabalho, foi estudada uma microcoluna agitada por campânulas pulsadas, visando promover um eficiente contato entre as fases através de uma agitação suave, aumentando assim o tempo de contato entre elas no interior da microcoluna e também evitando a desnaturação da enzima.

O objetivo deste estudo visou a recuperação da xilanase, produzida pelo fungo *Penicillium janthinellum*, através da técnica de extração líquido – líquido por micela reversa, para o interior micelar. Para tanto, foi utilizado o agente tensoativo catiônico BDBAC (cloreto de benzil dodecil bis (hidroxietil) amônio).

Foram utilizados planejamentos estatísticos com o intuito de se realizar uma triagem das variáveis significativas no processo: frequência de pulsação das campânulas, razão entre as fases aquosa/orgânica e condutividade da fase aquosa; a metodologia de superfície de resposta foi empregada para a quantificação dos níveis das mesmas.

O trabalho resultou em dois modelos matemáticos, um que representa a recuperação da enzima pura, e outro que representa a recuperação da enzima presente no extrato enzimático bruto.

Foram previstos e observados experimentalmente para ambos os modelos obtidos, rendimento em atividade na ordem de 140% para a enzima pura e 43% para o extrato enzimático.

Verificou-se neste trabalho que, a metodologia estatística empregada foi de extrema importância e que, a microcoluna estudada tem operação estável e altos rendimentos em atividade foram alcançados.

**Palavras-chave:** campânulas pulsadas, extração contínua, micela reversa, planejamento estatístico, xilanase.

## ABSTRACT

In this work, it was studied a microcolumn agitated by pulsed caps, due to promote an efficient contact between the phases in the column and also to avoid the enzyme denaturation and the loss of main proteins properties.

This work deals with the purification of xylanase produced by *Penicillium janthinellum* by liquid-liquid extraction on reverse micelles, to micellar inner, utilizing a cationic surfactant BDBAC (N-benzyl-N-dodecyl-N-bis(2-hydroxyethyl)).

It was used design statistical with the intention of realized selection of the main variables in the process: frequency pulsed, volumetric flow and ionic strength; the response surface methodology was employed to the quantified levels of this.

This resulted in two major mathematical models: one representing the use of pure enzyme and the other the use of enzymatic extract.

It was predict and observed experimentally for both models, obtained activity yield in the order of 140% to the pure enzyme and 43% to the enzymatic extract.

It was observed in this work that, the methodology statistical employed was extremely important and that the microcolumn used were stable operation and that high activity yield was reached.

**Keywords:** continuous extraction, pulsed caps, reversed micelles, statistical design, xylanase.

## SUMÁRIO

|   |              |
|---|--------------|
| <b>AGRADECIMENTOS</b> .....   | <b>VI</b>    |
| <b>RESUMO</b> .....   | <b>VII</b>   |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | <b>VIII</b>  |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b> .....   | <b>XII</b>   |
| <b>LISTA DE TABELAS</b> .....   | <b>XV</b>    |
| <b>NOMENCLATURAS</b> .....  | <b>XVIII</b> |
| <br>  |              |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>1</b>     |
| <b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....   | <b>2</b>     |
| 2.1 EXTRAÇÃO LÍQUIDO - LÍQUIDO .....  | 2            |
| 2.2 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NA EXTRAÇÃO LÍQUIDO - LÍQUIDO .....   | 3            |
| 2.3 TRANSFERÊNCIA DE MASSA NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO - LÍQUIDO .....  | 10           |
| <i>2.3.1 Velocidade Relativa e Velocidade Característica</i> .....  | 11           |
| 2.4 EXTRAÇÃO LÍQUIDO - LÍQUIDO POR MICELA REVERSA .....   | 12           |
| 2.5 EXTRAÇÃO CONTÍNUA POR MICELA REVERSA .....  | 21           |
| 2.6 XILANASES.....  | 25           |
| 2.7 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS XILANASES.....   | 29           |
| <b>3. OBJETIVOS</b> .....   | <b>30</b>    |
| <b>4. MATERIAS E MÉTODOS</b> .....  | <b>32</b>    |
| 4.1 MICRORGANISMO .....   | 32           |
| 4.2 MEIOS DE CULTURA .....  | 32           |
| 4.2.1 <i>Meio de Manutenção dos Fungos</i> .....  | 32           |
| 4.2.2 <i>Meio fermentativo formulado a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de – açúcar</i> ..... | 33           |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.3 PRODUÇÃO DAS XILANASES.....   | 33        |
| 4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....   | 33        |
| 4.5 EXTRAÇÃO LÍQUIDO - LÍQUIDO DE XILANASE POR MICELA REVERSA EM PROCESSO CONTÍNUO.....   | 34        |
| 4.5.1 <i>Descrição do Equipamento</i> .....   | 34        |
| 4.5.2 <i>Operação da Microcoluna</i> .....  | 36        |
| 4.6 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DA FRAÇÃO DE RETENÇÃO DA FASE DISPERSA ("HOLD-UP").....   | 38        |
| 4.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DA EXTRAÇÃO LÍQUIDO - LÍQUIDO DE XILANASE POR MICELA REVERSA EM PROCESSO CONTÍNUO UTILIZANDO CAMPÂNULAS PULSADAS E A ENZIMA PURA .....              | 38        |
| 4.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DA EXTRAÇÃO LÍQUIDO - LÍQUIDO DE XILANASE POR MICELA REVERSA EM PROCESSO CONTÍNUO UTILIZANDO CAMPÂNULAS PULSADAS E O EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO ..... | 40        |
| 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....   | 45        |
| 4.10 PURIFICAÇÃO DA XILANASE EM BATELADA PELO PROCESSO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO - LÍQUIDO EM MICELA REVERSA, UTILIZANDO O AGENTE TENSOATIVO CATIONICO (BDBAC) .....                    | 45        |
| 4.11 DETERMINAÇÃO DO RAIO DA MICELA .....   | 45        |
| 4.12 DETERMINAÇÃO DA CONDUTIVIDADE.....   | 46        |
| 4.13 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS TOTAIS.....  | 47        |
| 4.14 METODOLOGIA DE ANÁLISE DE RESULTADOS.....  | 47        |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>  | <b>49</b> |
| 5.1 RESULTADOS PRELIMINARES .....   | 49        |
| 5.1.1 <i>Extração de Xilanase por Micela Reversa em Processo Contínuo utilizando o Agente Tensoativo Aniônico AOT</i> .....   | 55        |
| 5.2 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE XILANASE POR MICELA REVERSA UTILIZANDO UMA MICROCOLUNA COM CAMPÂNULAS PULSADAS E A ENZIMA PURA.....   | 55        |
| 5.3 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE XILANASE POR MICELA REVERSA UTILIZANDO UMA MICROCOLUNA COM CAMPÂNULAS PULSADAS E O EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO.....                                    | 60        |
| 5.4 ESTUDOS EXPERIMENTAIS DA EXTRAÇÃO DE XILANASE POR MICELA REVERSA EM PROCESSO CONTÍNUO .....   | 69        |

|  |            |
|--|------------|
| 5.5 EFEITO DA FREQUÊNCIA DE PULSAÇÃO SOBRE A FRAÇÃO DE RETENÇÃO DA FASE<br>DISPERSA E SOBRE A RECUPERAÇÃO EM ATIVIDADE.....        | 75         |
| 5.6 ANÁLISE DA VELOCIDADE CARACTERÍSTICA NO SISTEMA DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO -<br>LÍQUIDO POR MICELA REVERSA EM PROCESSO CONTÍNUO ..... | 79         |
| 5.7 COMPORTAMENTO DO RENDIMENTO EM ATIVIDADE EM RELAÇÃO AOS GRUPOS<br>ADIMENSIONAIS .....  | 81         |
| <b>6. CONCLUSÕES.....</b>  | <b>85</b>  |
| <b>7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>  | <b>87</b>  |
| <b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>   | <b>88</b>  |
| <b>9. ADENDO.....</b>  | <b>99</b>  |
| <b>APÊNDICE</b>  | <b>119</b> |

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** ESQUEMA DE UM EXTRATOR EM ESTÁGIOS DISCRETOS OU BATELADA 5
- FIGURA 2:** EXTRATORES DIFERENCIAIS QUE ATUAM SOB A FORÇA DA GRAVIDADE. EM (A) COLUNA DE PRATOS FIXOS PERFURADOS, (B) COLUNA RECHEADA E (C) COLUNA "SPRAY"..... 6
- FIGURA 3:** EXTRATORES DIFERENCIAIS MECANICAMENTE AGITADOS. EM (A) COLUNA DE FLUXO PULSADO, (B) COLUNA DE PRATOS PULSADOS E EM (C) COLUNA DE DISCOS ROTATIVOS. .... 8
- FIGURA 4:** AGITAÇÃO POR MEIO DE CAMPÂNULAS NUMA COLUNA DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO - LÍQUIDO PULSADA. (A) CAMPÂNULA PARADA DURANTE O INTERVALO ENTRE OS PULSOS; (B) MOVIMENTO DESCENDENTE DURANTE UM PULSO..... 9
- FIGURA 5:** REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO TENSOATIVO E DAS ESTRUTURAS MICELARES EM DIFERENTES SOLVENTES. .... 14
- FIGURA 6:** DIAGRAMA DE FASES PARA O SISTEMA AOT/ÁGUA/ISOOCTANO, COM AS VÁRIAS ESTRUTURAS POSSÍVEIS PARA OS AGREGADOS. .... 16
- FIGURA 7:** REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA PROTEÍNA ENGLOBADA POR UMA MICELA REVERSA. .... 20
- FIGURA 8:** REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA LOCALIZAÇÃO DE PROTEÍNAS EM MICELAS REVERSAS. A) PROTEÍNA HIDROFÍLICA; B) PROTEÍNA DE INTERFACE; C) PROTEÍNA HIDROFÓBICA. .... 21
- FIGURA 9:** (A) ENZIMAS XILANOLÍTICAS ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DA XILANA. AC: GRUPO ACETIL;  $\alpha$ -4-O-ME-GLCA: ÁCIDO  $\alpha$ -4-O-METIL GLUCURÔNICO. (B) HIDRÓLISE

|   |    |
|---|----|
| DE XILOOLIGOSSACARÍDEOS PELA $\beta$ -XILOSIDASE. ....  | 28 |
| <b>FIGURA 10:</b> MICRO COLUNA DE CAMPÂNULAS PULSADAS.....  | 36 |
| <b>FIGURA 11:</b> EFEITO DA CONDUTIVIDADE NA RECUPERAÇÃO DA ATIVIDADE DA XILANASE EM WP <sub>II</sub> (CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO: FASE AQUOSA: pH 7,0, 0,01M DE TAMPÃO FOSFATO DE SÓDIO; FASE ORGÂNICA: 0,20M DE BDBAC, 7,5% DE HEXANOL; TEMPERATURA AMBIENTE. CONDIÇÃO DE REEXTRAÇÃO: pH 5,5, 1M DE TAMPÃO ACETATO DE SÓDIO, ADICIONADO DE NaCl 0,5M)..... | 52 |
| <b>FIGURA 12:</b> SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E CURVAS DE NÍVEL DESCRITA PELO MODELO DA EQUAÇÃO 5.2.1, QUE REPRESENTA A EXTRAÇÃO DE XILANASE POR MICELA REVERSA UTILIZANDO UMA MICRO COLUNA COM CAMPÂNULAS PULSADAS E A ENZIMA PURA.....   | 59 |
| <b>FIGURA 13:</b> SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E CURVAS DE NÍVEL DESCRITA PELO MODELO DA EQUAÇÃO 5.3.1, QUE REPRESENTA A EXTRAÇÃO DE XILANASE POR MICELA REVERSA UTILIZANDO UMA MICRO COLUNA COM CAMPÂNULAS PULSADAS E O EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO. ....   | 68 |
| <b>FIGURA 14:</b> COMPORTAMENTO DA EXTRAÇÃO DA XILANASE NA FASE AQUOSA (WP <sub>I</sub> ) E FASE AQUOSA DEPOIS DA REEXTRAÇÃO (WP <sub>II</sub> ) DURANTE O TEMPO DE OPERAÇÃO DA MICRO COLUNA. CONDIÇÕES: FREQUÊNCIA DE PULSAÇÃO: 0,33 PULSO/SEG E RAZÃO ENTRE AS FASES: 1. CONDUTIVIDADE: (A) 10 mS/cm E (B) 15 mS/cm. ....                             | 71 |
| <b>FIGURA 15:</b> COMPORTAMENTO DA EXTRAÇÃO DA XILANASE NA FASE AQUOSA (WP <sub>I</sub> ) E FASE AQUOSA DEPOIS DA REEXTRAÇÃO (WP <sub>II</sub> ) DURANTE O TEMPO DE OPERAÇÃO DA MICRO COLUNA. CONDIÇÕES: FREQUÊNCIA DE PULSAÇÃO:0,13 PULSO/SEG E RAZÃO ENTRE AS FASES: 2. CONDUTIVIDADE: (A) 10 mS/cm E (B) 15 mS/cm. ....                              | 72 |
| <b>FIGURA 16:</b> COMPORTAMENTO DA EXTRAÇÃO DA XILANASE NA FASE AQUOSA (WP <sub>I</sub> ) E FASE AQUOSA DEPOIS DA REEXTRAÇÃO (WP <sub>II</sub> ) DURANTE O TEMPO DE OPERAÇÃO DA MICRO COLUNA. CONDIÇÕES: CONDUTIVIDADE: 12,5 mS/cm E FREQUÊNCIA DE PULSAÇÃO: 0,33 PULSO/SEG. RAZÃO ENTRE AS FASES: (A) 0,5 E (B) 1,5. ....                              | 73 |

|  |    |
|--|----|
| <b>FIGURA 17:</b> COMPORTAMENTO DA EXTRAÇÃO DA XILANASE NA FASE AQUOSA ( $WP_I$ ) E FASE AQUOSA DEPOIS DA REEXTRAÇÃO ( $WP_{II}$ ) DURANTE O TEMPO DE OPERAÇÃO DA MICRO COLUNA. CONDIÇÕES: CONDUTIVIDADE: 10 MS/CM E FREQUÊNCIA DE PULSAÇÃO: 0,5 PULSO/SEG. RAZÃO ENTRE AS FASES: (A) 0,5 E (B) 1,5..... | 74 |
| <b>FIGURA 18:</b> INFLUÊNCIA DA FREQUÊNCIA DE PULSAÇÃO DAS CAMPÂNULAS NA FRAÇÃO DE RETENÇÃO DA FASE DISPERSA (“HOLD-UP”).....  | 77 |
| <b>FIGURA 19:</b> COMPORTAMENTO DO SISTEMA MICELAR EM RELAÇÃO À FRAÇÃO DE RETENÇÃO DA FASE DISPERSA NAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS ESTUDADAS. ....  | 78 |
| <b>FIGURA 20:</b> INFLUÊNCIA DA FREQUÊNCIA DE PULSAÇÃO DAS CAMPÂNULAS NO RENDIMENTO EM ATIVIDADE. ....   | 79 |
| <b>FIGURA 21:</b> INFLUÊNCIA DA FREQUÊNCIA DE PULSAÇÃO DAS CAMPÂNULAS E DA VAZÃO TOTAL DAS FASES SOBRE A VELOCIDADE CARACTERÍSTICA ( $V_0$ ).....  | 80 |
| <b>FIGURA 22:</b> INFLUÊNCIA DA VELOCIDADE CARACTERÍSTICA ( $V_0$ ) SOBRE O RENDIMENTO EM ATIVIDADE.....   | 81 |
| <b>FIGURA 23:</b> INFLUÊNCIA DO NÚMERO DE REYNOLDS ( $Re$ ) SOBRE O RENDIMENTO EM ATIVIDADE.....   | 82 |
| <b>FIGURA 24:</b> INFLUÊNCIA DA FRAÇÃO DE RETENÇÃO DA FASE DISPERSA (HOLD-UP) SOBRE O RENDIMENTO EM ATIVIDADE. ....  | 83 |
| <b>FIGURA 25:</b> INFLUÊNCIA DA FRAÇÃO DE RETENÇÃO DA FASE DISPERSA (HOLD-UP) SOBRE O NÚMERO DE REYNOLDS ( $Re$ ).....   | 84 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| TABELA 1: NÍVEIS DOS FATORES UTILIZADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO $2^2$ COM PONTO CENTRAL.   | 39 |
| TABELA 2: MATRIZ DE UM PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO $2^2$ COM 2 ENSAIOS NO PONTO CENTRAL EM FUNÇÃO DE DIFERENTES VARIÁVEIS QUE INFLUENCIAM A RECUPERAÇÃO CONTÍNUA DE XILANASE POR MICELA REVERSA, UTILIZANDO CAMPÂNULAS PULSADAS.      | 40 |
| TABELA 3: FATORES E NÍVEIS AVALIADOS NO PLANEJAMENTO $2^3$ COM 4 ENSAIOS NO PONTO CENTRAL.....   | 41 |
| TABELA 4: MATRIZ DE UM PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO $2^3$ COM 4 ENSAIOS NO PONTO CENTRAL EM FUNÇÃO DE DIFERENTES VARIÁVEIS QUE INFLUENCIAM A RECUPERAÇÃO CONTÍNUA DE XILANASE POR MICELA REVERSA, UTILIZANDO CAMPÂNULAS PULSADAS. .... | 42 |
| TABELA 5: NÍVEIS DOS FATORES UTILIZADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO $2^3$ COM PONTOS CENTRAIS E FACE CENTRADA. ....  | 43 |
| TABELA 6: MATRIZ DO PLANEJAMENTO UTILIZADA NA EXTRAÇÃO CONTÍNUA DE XILANASE POR MICELA REVERSA, UTILIZANDO CAMPÂNULAS PULSADAS, SEGUNDO UM FATORIAL COMPLETO $2^3$ COM PONTOS CENTRAIS E FACE CENTRADA. ....                             | 44 |
| TABELA 7: BALANÇO DE ATIVIDADE NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO CONTÍNUA DE XILANASE REALIZADA EM UMA MICRO COLUNA COM CAMPÂNULAS PULSADAS .....  | 50 |
| TABELA 8: BALANÇO DE ATIVIDADE NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO CONTÍNUA DE XILANASE REALIZADA EM UMA MICRO COLUNA COM CAMPÂNULAS PULSADAS .....  | 50 |

|  |    |
|--|----|
| TABELA 9: BALANÇO DE ATIVIDADE NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO CONTÍNUA DE XILANASE REALIZADA EM UMA MICRO COLUNA COM CAMPÂNULAS PULSADAS .....  | 51 |
| TABELA 10: BALANÇO DE ATIVIDADE NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO CONTÍNUA DE XILANASE REALIZADA EM UMA MICROCOLUNA COM CAMPÂNULAS PULSADAS .....  | 53 |
| TABELA 11: BALANÇO DE ATIVIDADE NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO CONTÍNUA DE XILANASE REALIZADA EM UMA MICRO COLUNA COM CAMPÂNULAS PULSADAS .....   | 54 |
| TABELA 12: BALANÇO DE ATIVIDADE NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO CONTÍNUA DE XILANASE REALIZADA EM UMA MICRO COLUNA COM CAMPÂNULAS PULSADAS .....   | 54 |
| TABELA 13: ESQUEMA DA MATRIZ UTILIZADA NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO $2^2$ COM 2 ENSAIOS NO PONTO CENTRAL.....   | 56 |
| TABELA 14: EFEITOS ESTIMADOS, VALORES DO TESTE T DE "STUDENT" E ERROS-PADRÃO OBTIDOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO $2^2$ COM 2 ENSAIOS NO PONTO CENTRAL.....   | 57 |
| TABELA 15: ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O ESTUDO DA RECUPERAÇÃO DE XILANASE NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO $2^2$ COM 2 ENSAIOS NO PONTO CENTRAL.....   | 58 |
| TABELA 16: COEFICIENTE DE REGRESSÃO, ERROS-PADRÃO, TESTE T DE "STUDENT" E NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA PARA O MODELO QUE REPRESENTA O PROCESSO CONTÍNUO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO - LÍQUIDO DE XILANASE POR MICELA REVERSA, UTILIZANDO UM PLANEJAMENTO FATORIAL $2^2$ COM FACE CENTRADA..... | 58 |
| TABELA 17: ESQUEMA DA MATRIZ UTILIZADA NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO $2^3$ COM 4 ENSAIOS NO PONTO CENTRAL.....   | 62 |
| TABELA 18: EFEITOS ESTIMADOS, VALORES DO TESTE T DE "STUDENT" E ERROS - PADRÃO OBTIDOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO $2^3$ COM 4 ENSAIOS NO PONTO CENTRAL.....   | 63 |

|  |    |
|--|----|
| TABELA 19: ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O ESTUDO DA RECUPERAÇÃO DE XILANASE NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO $2^3$ COM 4 ENSAIOS NO PONTO CENTRAL.....   | 64 |
| TABELA 20: ESQUEMA DA MATRIZ DO PLANEJAMENTO UTILIZADA NA EXTRAÇÃO DE XILANASE SEGUNDO UM FATORIAL COMPLETO $2^3$ ROTACIONAL COM FACE CENTRADA..   | 65 |
| TABELA 21: EFEITOS ESTIMADOS, VALORES DO TESTE T DE "STUDENT" E ERROS - PADRÃO OBTIDOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO $2^3$ ROTACIONAL COM FACE CENTRADA.....   | 66 |
| TABELA 22: COEFICIENTE DE REGRESSÃO, ERROS-PADRÃO, TESTE T DE "STUDENT" E NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA PARA O MODELO QUE REPRESENTA O PROCESSO CONTÍNUO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO - LÍQUIDO DE XILANASE POR MICELA REVERSA, UTILIZANDO UM PLANEJAMENTO FATORIAL $2^3$ COM FACE CENTRADA..... | 67 |

## NOMENCLATURAS

| Abreviaturas     | Definições  |
|------------------|---|
| $V_S$            | velocidade relativa (cm/min)                                      |
| $V_O$            | velocidade característica (cm/min)                                |
| $v_d$            | velocidade de escoamento da fase dispersa (cm/min)                |
| $v_c$            | velocidade de escoamento da fase contínua (cm/min)                |
| $V_d$            | vazão da fase dispersa (mL/min)                                   |
| $V_c$            | vazão da fase contínua (mL/min)                                   |
| Re               | número de Reynolds  |
| AOT              | 2-etil-hexil-sulfossuccinato de sódio                             |
| BDBAC            | cloreto de benzil dodecil bis(hidroxietil)amônio                  |
| CTAB             | brometo de cetiltrimetil amônio                                   |
| TOMAC            | cloreto de trioctilmetil amônio                                   |
| TTAB             | brometo de trioctiltrimetil amônio                                |
| DNS              | ácido 3,5 dinitrosalicílico                                       |
| $R_m$            | raio micelar  |
| $W_o$            | “water in oil”; quantidade de água presente no interior da micela |
| WP <sub>I</sub>  | “water phase I”; fase aquosa I                                    |
| WP <sub>II</sub> | “water phase II”; fase aquosa II                                  |

## 1. INTRODUÇÃO

O principal objetivo do desenvolvimento de novos processos de separação é a possibilidade de se separar as enzimas diretamente do meio fermentado e sua aplicação a custos viáveis. A purificação de enzimas encontra muitas dificuldades e exige um elevado número de etapas. Por isso, a extração líquido - líquido tem despertado o interesse no processo de purificação e separação de proteínas.

O grande interesse na produção de xilanases está relacionado à vasta aplicação que esta enzima possui no setor industrial, abrangendo desde a substituição de etapas de processos correntes até o estabelecimento de outros inteiramente novos.

Xilanases microbianas são geralmente obtidas a partir de meios complexos e de forma diluída. Sua recuperação envolve normalmente a separação de compostos indesejáveis presentes no meio de fermentação, como células, componentes celulares, proteínas contaminantes, sais e água. O somatório das várias etapas necessárias aos processos de separação atingem de 15 a 70% do custo total do produto.

A extração líquido - líquido por micela reversa pode servir a essas propostas, pois possui a capacidade de solubilizar biomoléculas específicas de uma solução aquosa, sendo portanto, apontada como uma ferramenta útil e versátil.

A extração contínua utilizando colunas com movimentos pulsantes, no caso as campânulas que fornecem áreas livres de circulação, tem sido usada como um aparelho alternativo para os equipamentos de extração. Nesse tipo de extrator há uma alta transferência de massa entre as fases, obtendo principalmente uma alta eficiência na separação.

As variáveis que favorecem a extração em processo contínuo, como a frequência de pulsação das campânulas e a razão entre as fases aquosa/orgânica, e ainda a variável condutividade da fase aquosa foram estudadas através de planejamentos experimentais, em virtude da possibilidade de executar de forma organizada um número reduzido de experimentos, permitindo ainda a identificação da significância de cada uma das variáveis ao processo estudado.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Extração Líquido - Líquido

Uma situação muito comum na Engenharia Química é a separação dos constituintes de uma mistura líquida homogênea composta de dois ou mais componentes. Para realizar esta separação existem vários métodos cuja aplicação é limitada pelas características físicas e químicas dos componentes da mistura a ser separada, pelos custos de processo de separação e pelas condições disponíveis para a implantação do processo escolhido.

A extração líquido - líquido tornou-se um dos principais procedimentos de separação adotados industrialmente. Entretanto, a aplicação desta técnica na separação, concentração e purificação de proteínas ainda é limitada, principalmente porque estas são insolúveis no solvente orgânico utilizado ou porque este não tem a devida seletividade e/ou capacidade, ou ainda, porque a exposição direta da proteína ao solvente pode causar desnaturação (AIRES-BARROS *et al.*, 1994).

A purificação de proteínas encontra muitas dificuldades e exige um elevado número de etapas, como exemplo a remoção dos fragmentos da célula devido ao pequeno tamanho das partículas e à viscosidade da solução. Além disso, as etapas de precipitação podem levar a baixos rendimentos, reprodutibilidade limitada e o uso de procedimentos cromatográficos, em muitos casos, é limitado pela escala e custos operacionais (HUSTEDT *et al.*, 1985). Por isso, a extração líquido - líquido tem despertado o interesse de pesquisadores como mais uma etapa no processo de purificação e separação de proteínas.

Quanto à viabilidade econômica dos processos que empregam a extração líquido - líquido, esta é fortemente influenciada pelos custos do equipamento e pelos custos de

recuperação e reposição de solventes. O custo de operação de um extrator líquido - líquido (consumo de energia mais manutenção) é geralmente negligenciável comparado aos outros fatores (RABELO, 1999).

## 2.2 Equipamentos utilizados na Extração Líquido - Líquido

A extração líquido - líquido pode ser realizada de diversas formas e por meio de vários tipos de equipamentos, mas sempre seguindo os mesmos princípios básicos de contato entre os líquidos, transferência de massa, equilíbrio de fases e separação das fases (RABELO, 1995).

Em virtude da necessidade em se procurar alternativas mais viáveis economicamente para uma dada separação, a extração líquido - líquido vem sendo usada de maneira crescente. Os tipos de equipamentos usados no processo variam desde os clássicos tanques misturadores até as colunas centrífugas de alto desempenho.

Com a finalidade de tornar o processo de extração mais simples e eficiente, foram propostos diversos tipos de equipamentos nos últimos anos. O principal objetivo do desenvolvimento de novos equipamentos para efetuar a extração líquido - líquido é tornar este método mais competitivo com relação aos processos de separação existentes (SOUZA, 1997).

Durante o processo de extração vários fenômenos acontecem no interior do extrator, alguns dos quais prejudicam a transferência de massa. Os mais conhecidos são:

- “Hold-up”: é a fração de retenção da fase dispersa, sendo essa a razão do volume da fase dispersa que fica retida no interior do equipamento pelo seu volume total;
- Inundação: ocorre quando as condições de operação na coluna fazem com que seja impossível as correntes escoarem em contracorrente e uma fase se dispersar na outra. Nessa situação, as correntes entram e saem da coluna numa mesma extremidade;

- Fluxo Retroativo da Fase Dispersa: é o retorno axial da fase dispersa. A fase dispersa escoar em sentido oposto ao esperado fazendo com que o gradiente de concentração, que é a força motriz da transferência de massa na coluna, diminua, prejudicando a taxa de transferência de massa e a eficiência de separação;
- Fluxo Retroativo da Fase Contínua: é o retorno axial da fase contínua. Ocorre quando a fase contínua é carregada na direção oposta ao esperado;
- Coalescência: é um fator importante em processos de extração líquido - líquido, sendo necessária para a separação das fases, mas, em determinadas condições, é prejudicial à extração, por aumentar o tamanho das gotas.

A coalescência é um fenômeno que se opõe à geração de gotas no interior da coluna e consiste na recombinação das mesmas, originando gotas maiores ou “porções” da fase dispersa nos estágios da coluna. Esse fenômeno está relacionado com a quantidade de gotas presente na mistura entre as fases e com a frequência de colisão das gotas. Segundo HANSON (1968), a coalescência das gotas da fase dispersa numa fase contínua é fundamental para ocorrer a separação das fases. Em geral, quanto menor o tamanho das gotas mais lenta é a coalescência e, quanto menores forem as gotas maior será a tendência da solução emulsificar. Por outro lado, se a agitação imposta às fases é pouco intensa a coalescência também poderá ocorrer, desde que não haja o fornecimento de energia suficiente para promover a fragmentação do líquido em gotas (GOIS, 1995).

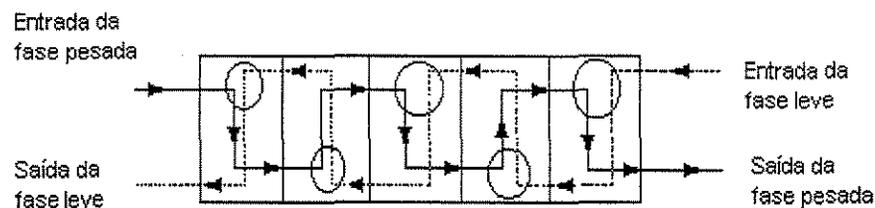
Num processo de extração existem diversos fatores que influenciam o desempenho do extrator, principalmente em escala industrial. Portanto, é necessário um estudo em escala piloto para melhor definir as condições de operação.

A utilização de extratores verticais nos processos de extração líquido - líquido é justificado devido a esses equipamentos ocuparem pequena área, terem boa eficiência de separação e apresentarem facilidades de operação e manutenção.

De acordo com os processos em que podem ser utilizados, é possível classificar os

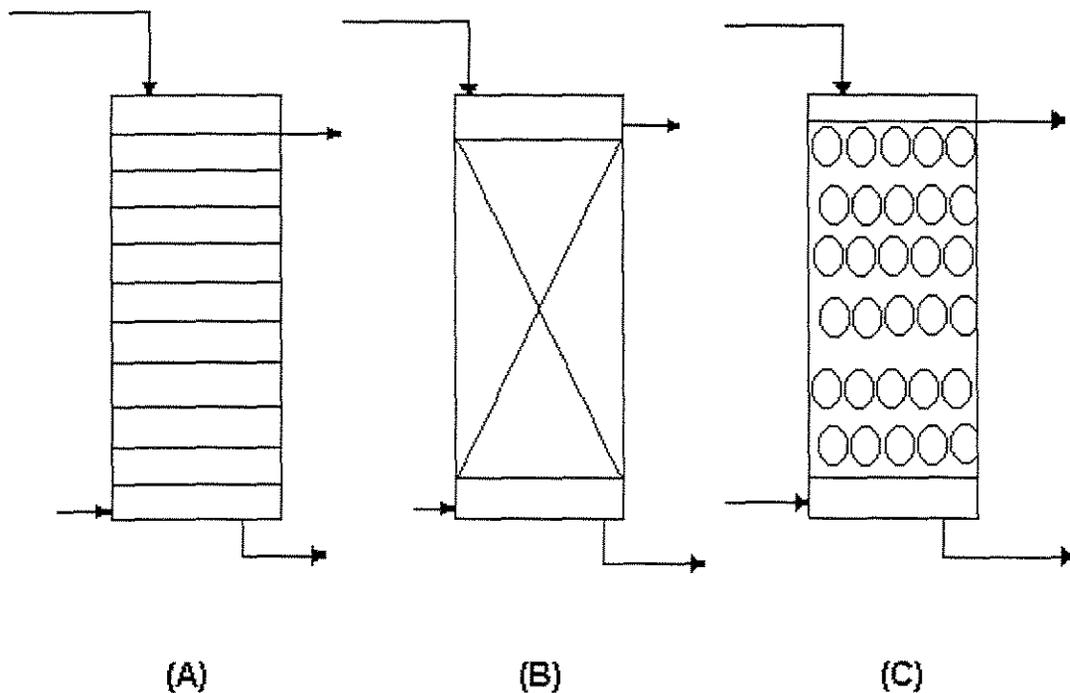
equipamentos de extração líquido - líquido em: equipamentos com estágios discretos em batelada ou descontínuos e equipamentos diferenciais ou contínuos.

Os equipamentos com estágios discretos, FIGURA 1, consistem num equipamento onde se coloca a carga em contato com um solvente, promovendo sucessivas misturas e decantações. Nesse tipo de extrator é desejável que as duas fases permaneçam no equipamento por um tempo até se atingir as proximidades do equilíbrio, para em seguida serem separadas. O número de estágios depende do grau de separação desejado; entretanto, nos casos em que a decantação do sistema é lenta, os compartimentos de decantação podem tornar-se volumosos, impossibilitando seu uso para altas vazões (PORTO, 1998).



**FIGURA 1:** Esquema de um extrator em estágios discretos ou batelada.

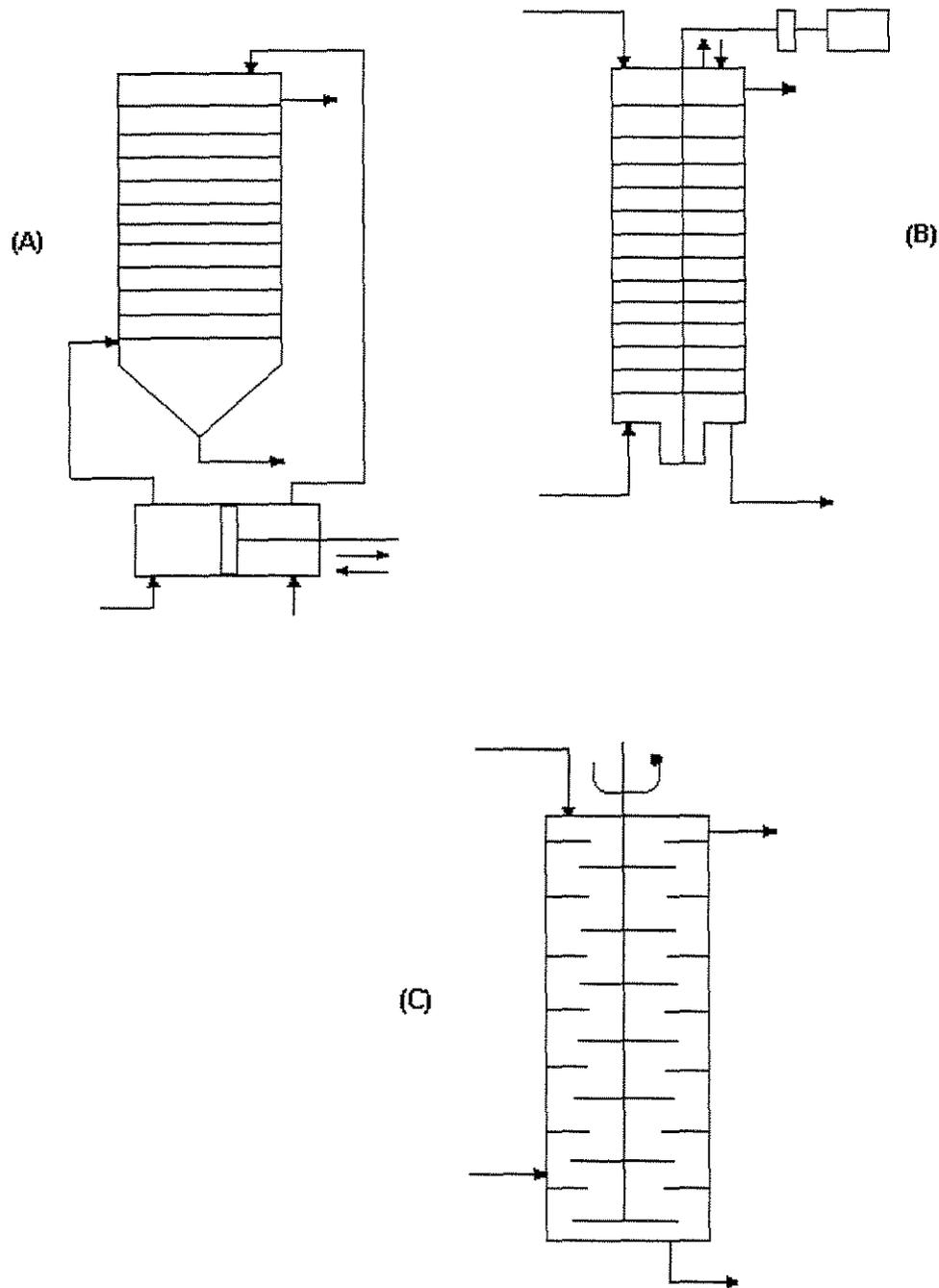
Nos equipamentos diferenciais ou contínuos, normalmente construídos na forma de coluna, os líquidos escoam em contracorrente e são processados em função da diferença de densidade de fases entre os componentes do sistema. A fase dispersa é alimentada no topo ou fundo da coluna, movendo-se em contracorrente no seio da fase contínua. Esses equipamentos classificam-se em equipamentos que atuam sob a força da gravidade (FIGURA 2) e os mecanicamente agitados, de acordo com a existência ou não de agitação (FIGURA 3).



**FIGURA 2:** Extratores diferenciais que atuam sob a força da gravidade. Em (A) coluna de pratos fixos perfurados, (B) coluna recheada e (C) coluna “spray”.

São exemplos de colunas baseadas na força da gravidade: colunas tipo “spray”, colunas de recheio e colunas com pratos perfurados fixos, que apresentam baixos custos de instalação e manutenção, ocupam espaço físico reduzido, embora apresentem uma baixa eficiência de separação. No caso de colunas mecanicamente agitadas, podemos citar colunas de discos rotativos, colunas de pratos pulsantes e campânulas pulsadas. Nesses equipamentos, a presença de agitação mecânica faz elevar a área interfacial através de um aumento no número de gotas com conseqüente aumento na transferência de massa (CARNEIRO-DA-CUNHA *et al.*, 1994b; SOUZA, 1997; RABELO, 1999).

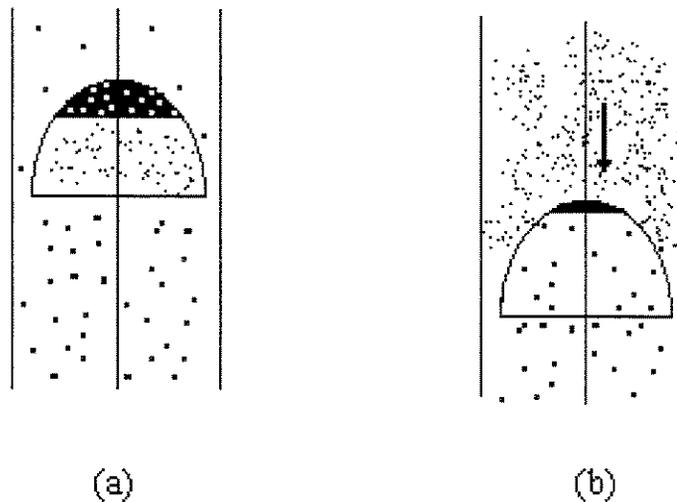
As colunas agitadas por pulsação, apesar de gastarem mais energia em sua operação, oferecem a grande vantagem de proporcionarem taxas de transferência de massa e eficiência bem mais elevadas do que outros tipos de equipamentos. Isto acontece porque nesse tipo de equipamento, a forma de agitação (pulsação) é introduzida no sistema na mesma direção do escoamento das correntes no interior da coluna, o que deve favorecer um contato mais intenso entre as fases, sem prejudicar o escoamento de ambas (RABELO, 1999).



**FIGURA 3:** Extratores diferenciais mecanicamente agitados. Em (A) coluna de fluxo pulsado, (B) coluna de pratos pulsados e em (C) coluna de discos rotativos.

O uso de campânulas em colunas pulsadas é proposto visando obter-se uma agitação eficiente, porém suave, evitando assim a desnaturação das biomoléculas, que pode ocorrer quando é introduzida ao sistema excessiva energia mecânica e agitação extremamente vigorosa. Além disso, as campânulas aumentam o tempo de contato entre as fases na coluna e fazem com que ocorra uma dispersão uniforme das gotas, o que favorece a transferência de massa, fazendo com que o sistema se aproxime do equilíbrio (RABELO, 1999).

Com o sistema de agitação composto por campânulas, as fases que entram na coluna comportam-se da maneira apresentada na FIGURA 4. Como pode ser visto, a fase leve entra na coluna pelo fundo e fica retida na campânula. A peneira, da qual a campânula é construída, não deixa parte da fase leve passar espontaneamente, pois retém a fase leve por um tempo maior do que outros dispositivos comumente usados para promover a agitação. Deste modo, ocorre um aumento do tempo de contato entre as fases (RABELO, 1999).



**FIGURA 4:** Agitação por meio de campânulas numa coluna de extração líquido - líquido pulsada. (a) campânula parada durante o intervalo entre os pulsos; (b) movimento descendente durante um pulso.

Durante o pulso, quando a campânula desce, o líquido mais leve (menor densidade) que fica concentrado no interior da campânula é forçado a passar pelos furos da peneira. A fase leve é "quebrada" em gotas bem pequenas. Uma importante característica da agitação obtida por meio delas é a formação de uma dispersão, bastante uniforme e de gotas pequenas da fase leve na fase contínua (fase pesada), como pode ser visto na FIGURA 4. Essas características são favoráveis à transferência de massa, pois quando a campânula sobe, o movimento ascendente faz com que as fases misturem-se ainda mais (RABELO, 1999).

A principal vantagem entre o sistema de extração contínuo e o descontínuo reside no fato de que o primeiro sistema apresenta menor custo operacional e menor área de operação, uma vez que são mais compactos que os descontínuos.

### **2.3 Transferência de Massa no Processo de Extração Líquido - Líquido**

É de fundamental importância no estudo de um processo de extração líquido - líquido ou de um extrator em particular, a avaliação da transferência de massa nesse equipamento. Esse estudo visa principalmente avaliar o quanto o sistema se aproxima do equilíbrio, podendo definir um limite ideal de operação para o extrator (RABELO, 1999).

Quando um sistema contém dois ou mais componentes cujas concentrações variam de ponto a ponto no sistema, há uma tendência natural da massa ser transferida minimizando as diferenças de concentração no sistema, já que de acordo com a segunda lei da termodinâmica, sistemas que não estão em equilíbrio tendem a alcançá-lo com o tempo.

A transferência de massa ocorre tanto pelo mecanismo molecular quanto pelo convectivo. Estes mecanismos têm se mostrado diretamente dependentes do gradiente de concentração das espécies. Uma vez que o sistema entra em equilíbrio, a taxa de difusão das espécies torna-se igual a zero; portanto não há transferência de massa entre as fases. Para que possa ocorrer novamente a transferência é preciso um afastamento do equilíbrio.

O mecanismo de transferência de massa depende da dinâmica do sistema no qual ela

ocorre. Massa pode ser transferida por movimento molecular aleatório em fluidos sem movimento ou pode ser transferida entre um fluido em movimento e uma superfície, ou ainda entre dois fluidos relativamente imiscíveis, em movimento, sendo dependente das propriedades de transporte e das características dinâmicas do escoamento. O primeiro caso é característico da transferência de massa molecular e o segundo caso é característico da transferência de massa convectiva.

Em equipamentos de extração líquido - líquido que operam em contracorrente, a transferência de massa ocorre por dispersão de gotas que fluem pela ação da gravidade através da fase líquida contínua. Uma maneira de melhorar a transferência de massa em colunas de extração líquido - líquido é o aumento da área interfacial entre as fases e a diminuição do tamanho das gotas. Isto ocorre através do uso de colunas mecanicamente agitadas. Das várias formas de promover a agitação numa coluna, destacam-se as pulsações ou dispositivos rotativos (RABELO, 1999).

Em sistemas de extração líquido - líquido o aumento da agitação causa, inicialmente, um aumento da área interfacial (através do tamanho das gotas) e assim aumenta a taxa de transferência de massa. Entretanto, isso não ocorre indefinidamente pois há um limite para o aumento da área interfacial e também, abaixo de um certo tamanho as gotas começam a se comportarem como esferas rígidas, sem circulação interna, resultando numa transferência de massa mais lenta (RABELO, 1995).

### 2.3.1 Velocidade Relativa e Velocidade Característica

O conceito de velocidade relativa foi primeiramente abordado por DELL e PRATT (1951), para um escoamento bifásico em contracorrente, através da correlação:

$$V_S = (v_d / \phi) + [v_c / (1 - \phi)] \quad (2.3.1)$$

Nesta correlação, a velocidade relativa,  $V_S$ , é o resultado da ação de forças externas e internas sobre as fases contínua e dispersa, sujeitas ao campo gravitacional

(HEYBERGER, 1983).

A velocidade característica,  $V_0$ , segundo HEYBERGER (1983), é derivada da velocidade relativa, na condição em que a fração de retenção da fase dispersa tende a zero. Assim, pode-se interpretá-la como sendo a velocidade de sedimentação ou ascensão das gotas na fase dispersa, no seio da fase contínua, desprezando os efeitos de interação elas, como por exemplo a coalescência.

Uma série de relações foram propostas para estudar a velocidade relativa com a característica, sendo que GAYLER *et al.* (1953) propuseram a mais simples.

$$V_S = V_0 \cdot (1-\phi) \quad (2.3.2)$$

Sendo assim:

$$V_0 \cdot (1-\phi) = (v_d / \phi) + [v_c / (1-\phi)] \quad (2.3.3)$$

## 2.4 Extração Líquido - Líquido por Micela Reversa

Em biotecnologia existe a necessidade de desenvolver novos processos de purificação e concentração de compostos biotecnologicamente ativos, tais como as proteínas, enzimas, ácidos nucleicos e células. Esses processos devem combinar alta seletividade e biocompatibilidade, além de uma fácil ampliação de escala (KILIKIAN *et al.*, 2000).

O processo de extração líquido - líquido, consiste na separação dos componentes de uma mistura de uma fase na outra por contato entre duas fases líquidas imiscíveis, ou parcialmente miscíveis. Esse processo tem sido usado em diferentes setores da indústria química e farmacêutica, tais como, na separação de antibióticos ou na recuperação de ácidos orgânicos diretamente do meio de fermentação. Entretanto, a aplicação dessa técnica na separação, concentração e purificação de proteínas ainda é limitada, principalmente porque estas são insolúveis no solvente orgânico utilizado, ou porque este não tem a devida

seletividade e/ou capacidade, ou ainda, porque a exposição direta da proteína ao solvente pode causar desnaturação, inviabilizando a sua aplicação posterior como um biocatalisador (AIRES-BARROS *et al.*, 1994).

A extração líquido - líquido por micela reversa pode servir a essas propostas, pois possui a capacidade de solubilizar biomoléculas específicas de uma solução aquosa, como exemplo os meios de fermentação e cultura de células, sendo apontada como uma ferramenta útil e versátil para a recuperação de biomoléculas, especialmente de proteínas (KILIKIAN *et al.*, 2000).

Essa técnica baseia-se na propriedade que os agentes tensoativos tem de auto-organizar-se quando em solução, em presença de água, na forma de estruturas esféricas ou elipsoidais, que são chamadas de micelas. Quando em um meio apolar, as micelas apresentam sua orientação inversa em relação à formação da estrutura micelar em água, conforme está ilustrado na FIGURA 5. Em meio orgânico (apolar), forma-se um centro polar, com as porções hidrofílicas orientadas para dentro, onde podem-se solubilizar moléculas como a água, sais e biomoléculas polares. O centro hidrofílico está envolto por uma camada hidrofóbica, composta pelos grupos apolares dos tensoativos, e que estão em contato com o solvente orgânico apolar (BRANDANI *et al.*, 1993; KREI, HUSTEDT, 1989).

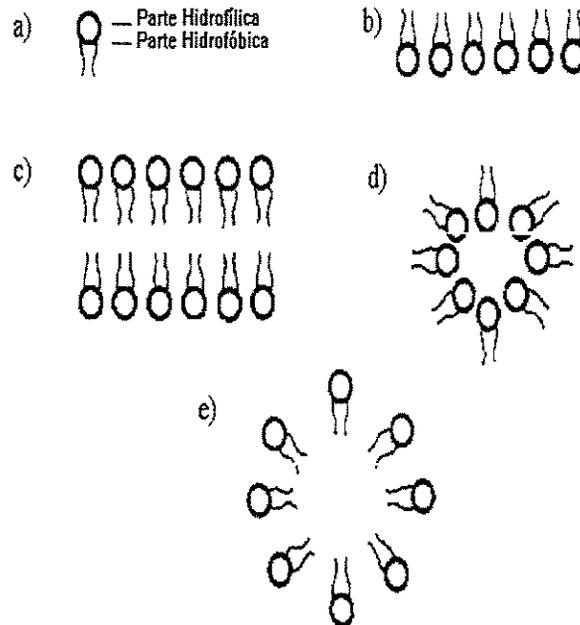
A micela reversa é composta de 3 regiões, sendo que a primeira é formada pela cauda hidrofóbica do tensoativo, que fica em contato direto com o solvente apolar; a segunda é a periferia micelar onde as moléculas de água estão fortemente ligadas aos núcleos polares das moléculas do tensoativo; e a terceira é o centro micelar, formado pela água contida no interior da micela que está ligada ao tensoativo ou água livre (AIRES-BARROS, CABRAL, 1991).

A natureza da água presente no núcleo micelar é de grande importância na solubilização de biomoléculas, uma vez que é desse componente que depende a manutenção das propriedades estruturais responsáveis pela funcionalidade de uma enzima encapsulada na micela reversa. A água intracelular pode ter propriedades físico-químicas distintas da água pura, assemelhando-se a água presente nas membranas e interfaces biológicas, e pode ser classificada em 2 tipos principais: a água ligada ao tensoativo, de menor polaridade e maior viscosidade, e a água livre, com propriedades semelhantes as da água pura

(KILIKIAN *et al.*,2000).

A água da periferia micelar é diferente da água que conhecemos porque existe uma força eletrostática devido à força de atração dos núcleos polares das moléculas do tensoativo com as moléculas de água. Portanto, quanto menor a quantidade de água no interior da micela menor será a extração do bioproduto para o seu interior, já que as condições não são favoráveis a ele (KADAM, 1986; KREI, HUSTEDT, 1992).

Normalmente, a cada molécula de tensoativo aniônico, encontra-se de 4 a 10 moléculas de água ligadas ao seu núcleo polar. Em tensoativos catiônicos, esse número se reduz para uma molécula de água (AIRES-BARROS, CABRAL, 1991).

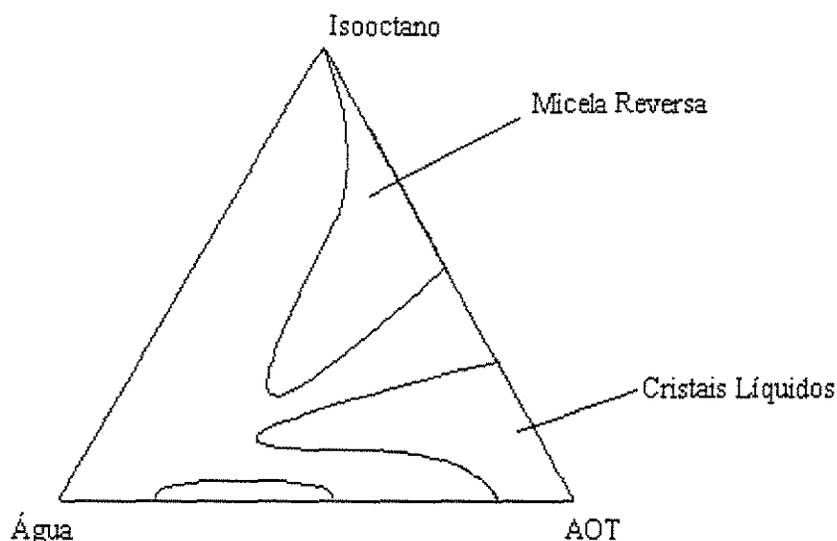


- a) Molécula do Agente Tensoativo
- b) Monocamada de Agente Tensoativo
- c) Dupla Camada de Agente Tensoativo
- d) Micela Reversa (em Solvente Apolar)
- e) Micela (em Solvente Aquoso)

**FIGURA 5:** Representação esquemática do tensoativo e das estruturas micelares em diferentes solventes.

A escolha do agente tensoativo para um processo de extração de proteínas deve levar em conta o valor do ponto isoelétrico das mesmas e o tamanho da micela desejada. Os agentes tensoativos são moléculas anfifílicas com um núcleo polar (parte hidrofílica) e uma cauda hidrofóbica. Eles são classificados de acordo com a carga de sua parte polar em neutros, aniônicos e catiônicos (MEYER, 1992; KREY, HUSTEDT, 1989).

Um sistema de micelas reversas é definido como um sistema ternário composto de água, solvente orgânico e tensoativo. A dissolução de um tensoativo em solvente orgânico, em presença de água, pode levar à formação de agregados de outras estruturas que não apenas as micelas reversas, como as micelas normais, as microemulsões e as mesofases liotróficas (cristais líquidos), conforme está apresentado no diagrama de fases para o sistema AOT/água/isooctano da FIGURA 6. A micelização ou formação das micelas reversas somente ocorre numa região definida do diagrama de fases, e é determinada por um equilíbrio de forças atrativas e repulsivas presentes no sistema. A formação dessas estruturas depende das concentrações dos componentes presentes e de forças como a interação dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido e pontes de hidrogênio (LUISI e MAGID, 1986), sendo o processo de formação caracterizado por um equilíbrio entre as moléculas livres do tensoativo e as micelas completas (CASTRO e CABRAL, 1988).



**FIGURA 6:** Diagrama de fases para o sistema AOT/água/isooctano, com as várias estruturas possíveis para os agregados.

A maioria dos trabalhos realizados com extração líquido - líquido de proteínas utiliza o agente tensoativo AOT (2-etil-hexil-sulfossuccinato de sódio), que é um agente tensoativo aniônico com duas caudas hidrofóbicas e mostra-se adequado para separação de proteínas de elevado ponto isoelétrico. Para proteínas de baixo ponto isoelétrico, são recomendados agentes tensoativos catiônicos como o BDBAC. No entanto, tais tensoativos formam micelas reversas pequenas, tornando-se necessária a adição de um co-solvente, ou ainda de um outro tensoativo não iônico, para obtenção de micelas maiores (HILHORST *et al.*, 1995).

Diversos outros tensoativos podem ser utilizados para a formação de micelas, tais como os halogenetos de alquil amônio (CTAB, TOMAC, TTAB), os fosfolípídeos, como a fosfatidilcolina e os tensoativos derivados de poli - óxidos de etileno (Tween, Span, Triton). Uma das maiores vantagens na utilização do AOT, em relação aos demais, é a sua facilidade para a formação de micelas reversas sem a presença dos chamados co-solventes.

A extração de proteínas por micelas reversas pode ser entendida como um processo de troca iônica, onde as interações eletrostáticas entre as proteínas e os grupos polares do

tensoativo tem um papel fundamental, associado a um efeito de exclusão molecular (KREI, HUSTED, 1992). A transferência de fase das proteínas depende de muitos fatores relacionados às propriedades das biomoléculas. Dentre estes fatores temos o pH, a força iônica, o tipo e a concentração do tensoativo, o tipo de solvente orgânico, as propriedades físico-químicas das proteínas, como o seu ponto isoelétrico, a hidrofobicidade, o tamanho, a densidade e distribuição de cargas (ANDREWS, HAYWOOD, 1994).

A manipulação desses fatores permite a utilização do sistema de micelas reversas no isolamento e purificação de proteínas. Os fatores mais importantes são aqueles que estabelecem as interações eletrostáticas entre as proteínas e os diversos componentes da micela, nomeadamente o pH e a força iônica (AIRES-BARROS *et al.*, 1994).

O pH da fase aquosa inicial tem uma importância significativa na promoção das interações eletrostáticas entre os componentes micelares e as biomoléculas, pois determina a carga elétrica da proteína em solução. A solubilização na fase micelar normalmente ocorre quando a proteína e os grupos polares do tensoativo tem cargas opostas (CABRAL, AIRES-BARROS, 1993). Assim, para tensoativos catiônicos, a solubilização é favorecida em valores de pH superiores aos do ponto isoelétrico da proteína, enquanto que, para os tensoativos aniônicos, a transferência ocorre em valores de pH inferiores ao ponto isoelétrico da proteína (DEKKER *et al.*, 1989). Em alguns casos, entretanto, esse efeito não ocorre ou é apenas parcial, ou seja, não há transferência da proteína pela variação do pH. Nesse caso, os autores sugerem que a transferência das biomoléculas para a fase micelar seja regida principalmente por interações hidrofóbicas (CASTRO, CABRAL, 1988).

O aumento da força iônica da fase aquosa inicial na transferência de proteínas entre as fases está relacionado a dois efeitos principais: à modificação das interações eletrostáticas e ao efeito de exclusão molecular. O aumento da força iônica do sistema leva a uma redução das forças de repulsão eletrostática entre os grupos polares do tensoativo, pelo chamado efeito Debye, causando assim uma diminuição no tamanho da micela com conseqüente exclusão molecular da proteína (HATTON, 1987; GOKLEN, HATTON, 1986; CABRAL, AIRES-BARROS, 1993). Portanto, a conseqüência direta do aumento da força iônica da fase aquosa é a redução da capacidade de solubilização da fase micelar para a água e para as biomoléculas, o que normalmente é evidenciado pela diminuição dos valores de  $W_o$ , ou seja, a quantidade de água no interior das micelas.

Dentre os fatores que afetam a solubilização de proteínas em micelas reversas, além dos já reportados pH e força iônica, aqueles relacionados com a fase orgânica, como o tipo e a concentração do tensoativo, também são importantes na otimização das condições de extração de proteínas. Para um dado tensoativo, um aumento da sua concentração segundo GOKLEN (1986), provoca um aumento no número dos agregados micelares e de seu tamanho devido à maior quantidade de água solubilizada. Esse efeito leva normalmente a uma maior transferência das proteínas para a fase micelar, e como também ocorre aumento do raio da micela, proteínas relativamente grandes são mais facilmente solubilizadas (CABRAL, AIRES-BARROS, 1993).

A capacidade de solubilização da fase micelar altera-se diretamente pelo aumento da concentração do tensoativo, possivelmente devido a mudanças nas interações eletrostáticas do sistema. O aumento da concentração do tensoativo resulta num perfil mais amplo de extração em função do pH, ou seja, a interferência do pH na solubilização das biomoléculas tem seu efeito minimizado por aumento da concentração do tensoativo (CABRAL, AIRES-BARROS, 1993).

Com relação aos solventes, uma das condições básicas para a sua utilização no sistema de micelas reversas é que seja imiscível com a água. Entre os solventes orgânicos utilizados como meio dispersivo na formação de micelas, destacam-se os hidrocarbonetos alifáticos, como o n-octano, isooctano, n-heptano, os aromáticos, como o benzeno e o xileno, e os halogenados, como o clorofórmio (LUISI *et al.*, 1988; LUISI, MAGID, 1986).

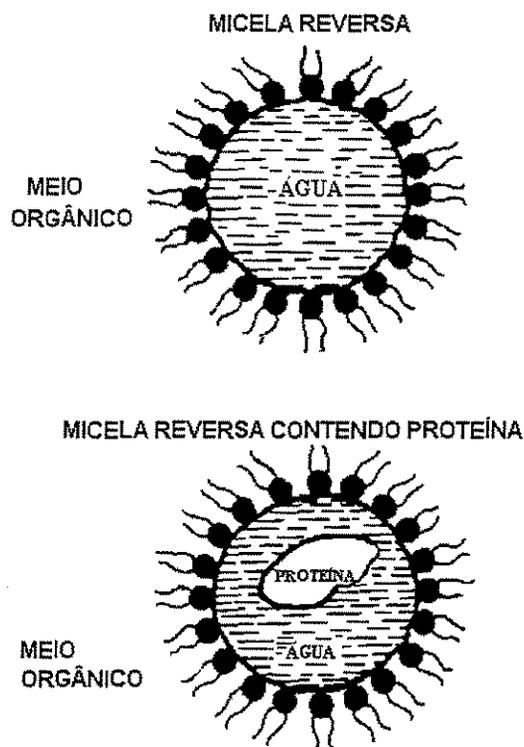
Entre outros fatores que afetam a transferência de fases, são citados a temperatura, a velocidade de agitação e a razão entre as fases. Este último parâmetro torna-se especialmente importante quando se deseja a concentração do produto extraído, em processos em larga escala, que pode ser atingida pela diminuição da razão entre as fases orgânica de extração e aquosa final (CABRAL, AIRES-BARROS, 1993).

A velocidade de agitação pode afetar a separação da proteína, pois interfere no transporte de massa e nas resistências existentes na interface entre as fases aquosa e orgânica. Quando a proteína está se movimentando da fase aquosa para a fase micelar, ela encontra a resistência difusional associada ao transporte do soluto de dentro da solução para a interface e vice-versa. Com o aumento da velocidade de agitação entre as duas fases, ocorre a diminuição drástica da resistência ao englobamento da proteína devido à redução

da camada limite entre as duas regiões. Quando o valor do pH e a concentração de sais são elevados, a partição da proteína independe da velocidade de agitação. Nestas condições a força iônica predomina sobre a resistência na interface (DUNGAN *et al.*, 1991).

A extração líquido - líquido por micela reversa é de grande importância em recuperação de compostos biológicos, pois mesmo com o emprego de solventes orgânicos, consegue-se um ambiente favorável à manutenção da atividade das moléculas de interesse (BRANDANI *et al.*, 1994; JOLIVALT *et al.*, 1993; PIRES, CABRAL, 1993; MEYER, 1992; LUISI *et al.*, 1988).

O método de extração por micela reversa envolve um procedimento simples, que é constituído de duas etapas. A primeira baseia-se na capacidade da micela reversa solubilizar as moléculas presentes em uma fase aquosa inicial para o interior do agregado micelar (FIGURA 7). Na segunda etapa, a molécula solubilizada é reextraída para uma nova fase aquosa, normalmente constituída por um tampão, de pH e força iônica conhecidos.

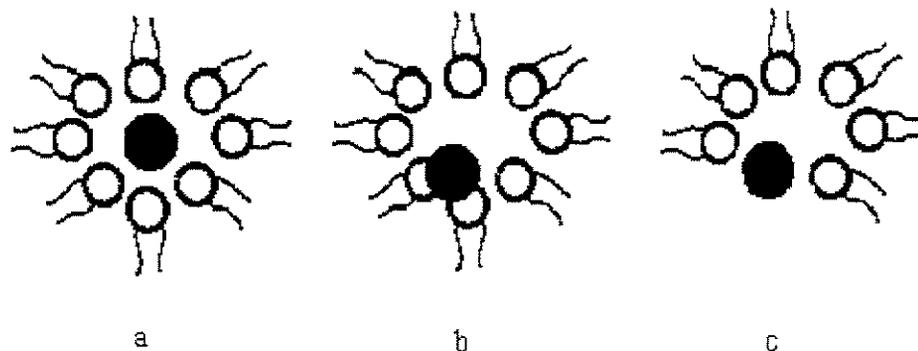


**FIGURA 7:** Representação esquemática de uma proteína englobada por uma micela reversa.

A estrutura microeterogênea do sistema de micelas reversas em solventes orgânicos possibilita a solubilização de proteínas num ambiente propício à manutenção da sua estrutura, pela manipulação dos vários fatores que atuam sobre a solubilização da proteína. O mecanismo de solubilização de biomoléculas em micelas reversas ainda não está esclarecido. LEVASHOV *et al.* (1984) e LUISI e MAGID (1986), propuseram um modelo que está mostrado na FIGURA 8. Segundo esses autores, após o encapsulamento, a localização das proteínas no interior da micela dependerá da natureza da proteína e do

tensoativo. As enzimas com características predominantemente hidrofílicas, localizariam-se no centro micelar, enquanto que as enzimas com características de ativação interfacial estariam associadas à interface. Certas enzimas, com alto caráter hidrofóbico, poderiam mesmo contactar com o solvente orgânico. Entretanto, ainda outras situações podem ocorrer, como a solubilização de uma proteína por ação de diversas micelas via interações hidrofóbicas e a formação de uma rede de muitas micelas em torno das moléculas de proteína (LUISI *et al.*, 1988).

O objetivo deste tipo de extração é fazer com que o bioproduto de interesse que está presente na solução aquosa (caldo fermentado) migre para o interior da micela, enquanto que os contaminantes fiquem na solução aquosa ou na solução orgânica (PIRES *et al.*, 1996).



**FIGURA 8:** Representação esquemática da localização de proteínas em micelas reversas. a) proteína hidrofílica; b) proteína de interface; c) proteína hidrofóbica.

## 2.5 Extração Contínua por Micela Reversa

A maioria dos processos de extração de proteínas têm sido realizados de modo

descontínuo, entretanto, a utilização de processos contínuos vem ganhando um grande impulso com a extração em colunas operando em contracorrente, uma vez que o processamento contínuo apresenta inúmeras vantagens (BOLAND, 1990), pois:

- Reduz o tempo de processamento, uma vez que permite processar rapidamente grandes quantidades de material com instalações reduzidas em relação a quantidade de material que está sendo processada, resultando economia de capital e energia;
- Automatiza o processo, o que significa baixa mão-de-obra a ser empregada;
- Obtém produtos mais homogêneos, a combinação entre o processo contínuo e a automação mantém o processo mais constante, com poucas variações e maior uniformidade ao longo da corrida;
- Aumenta o rendimento de produtos devido a rapidez do processo e as perdas de materiais são minimizadas;
- Possibilita a reciclagem dos componentes das fases.

Entre os equipamentos que trabalham em contracorrente e de modo contínuo, as colunas de discos perfurados rotativos e de campânulas pulsadas tornaram-se alternativas atrativas quando comparadas a outros equipamentos convencionais de separação líquido - líquido. Entre as vantagens deste equipamento está o aumento do grau de dispersão e da eficiência da separação, devido à agitação mecânica imposta aos discos e campânulas.

A aplicação da extração de proteínas por micelas reversas para a recuperação de bioprodutos, em larga escala, enfrenta os mesmos problemas encontrados em operações de extração tradicionais. É importante manter-se grandes áreas interfaciais entre as fases para assegurar taxas de transferência de massa aceitáveis e isso é geralmente obtido pela dispersão de uma fase na outra por meios mecânicos. Os dispositivos de contato contínuo podem ter baixas eficiência de estágio devido aos problemas de caminhos preferenciais e

mistura incompleta das duas fases. Eles também têm uma faixa restrita de condições de operação, em particular, relativa às taxas de escoamento, o que é essencial para evitar a “inundação” na coluna. Além disso, a presença de altos níveis de tensoativos no sistema poderia levar à formação de emulsões relativamente estáveis. A separação das fases pode ser melhorada com um contator centrífugo. Tais contadores têm sido usados com sucesso por décadas na recuperação de antibióticos de meios de fermentação e os problemas associados com a formação de emulsão têm sido superados em grande parte (HATTON, 1989).

O uso da extração líquido - líquido por meio de micela reversa para purificar enzimas é bastante promissor, pois utilizando somente a extração líquido - líquido algumas enzimas tornam-se insolúveis em solventes orgânicos ou são irreversivelmente desnaturadas quando em contato com estes solventes (AIRES-BARROS, CABRAL, 1991). O uso de micela reversa faz com que as enzimas sejam solubilizadas no centro dos agregados tensoativos que são polares e se estabilizam no solvente orgânico por meio de uma camada tensoativa que protege o biomaterial da desnaturação.

Estudos têm sido realizados para a aplicação do processo contínuo em sistemas micelares. O desempenho da extração e da reextração na recuperação da  $\alpha$ -amilase em processo contínuo foi demonstrado por DEKKER *et al.* (1986, 1987) através de duas unidades misturador - decantador, uma para cada passo da extração, onde a fase micelar foi circulada entre as duas unidades. Esse esquema foi utilizado para transferir a  $\alpha$ -amilase de uma solução aquosa para uma fase micelar de TOMAC em isooctano durante a extração e para transferir para uma segunda fase aquosa durante a reextração. A operação em estado estacionário foi mantida até cerca de duas recirculações, mas a eficiência da extração começou a diminuir depois de aproximadamente 3,5 recirculações. Essa diminuição na eficiência foi atribuída à perda de tensoativo para a fase aquosa (menos 15% por passagem). Repondo o tensoativo perdido, a eficiência da extração retornou ao seu valor original. Sob condições de operação escolhidas, cerca de 45% da atividade enzimática foi recuperada na corrente de produto. A inativação da enzima foi considerada como 30% da atividade, os 25% restantes ficaram retidos na fase de alimentação. Os resultados obtidos mostraram um aumento na concentração da enzima, na fase aquosa da reextração, de 8 vezes maior que na solução inicial, mostrando que o processo de extração contínuo é bastante promissor para a

recuperação de enzimas em larga escala industrial. Estes resultados estimulam e garantem a possibilidade de usar micelas reversas na recuperação e concentração de bioprodutos, em larga escala, sendo que a principal desvantagem de sistemas agitados é a intensa mistura requerida para efetuar um maior contato entre as duas fases e os problemas resultantes da separação das fases e possível emulsificação DEKKER *et al.* (1986, 1987).

Um estudo sobre extração líquido - líquido por micela reversa em processo contínuo e descontínuo foi realizado por CARNEIRO-DA-CUNHA *et al.* (1994a,b, 1995). Estes autores estudaram a utilização das micelas reversas na purificação de uma cutinase recombinante com atividade lipolítica (CARNEIRO-DA-CUNHA *et al.*, 1994a). Foram estudados os efeitos do pH, da força iônica, da concentração de AOT e da temperatura na extração e reextração desta proteína, a partir de um sistema modelo contendo a proteína purificada. As melhores condições encontradas para o processo global foram: temperatura de 20°C, uma fase aquosa tamponada com Tris/HCl (50mM) a pH 9,0, contendo 100mM de KCl, e uma concentração de 100mM de AOT/isooctano. Os rendimentos globais reportados foram de 38% de recuperação da proteína total e 45% de recuperação de atividade. Ainda sobre o mesmo tema, CARNEIRO-DA-CUNHA (1995) publicou a recuperação desta mesma enzima diretamente do meio de fermentação, contendo fragmentos celulares. Os resultados demonstraram a viabilidade da extração líquido - líquido como uma etapa prévia na purificação deste material, com rendimento global de 14% de recuperação de proteínas, 21,8% de recuperação de atividade e um fator de purificação de 1,6 vezes. Um outro trabalho deste grupo (CARNEIRO-DA-CUNHA *et al.*, 1994b) reporta a utilização do sistema AOT/isooctano em micelas reversas em sistema contínuo de extração, composto por uma coluna de discos rotativos. Para este caso, a quantidade de proteína extraída foi maior (54,5%), se comparada à extraída diretamente do meio contendo fragmentos celulares em sistema descontínuo reportado acima.

Esses mesmos autores (CARNEIRO-DA-CUNHA *et al.* 1996) publicaram a realização de uma extração contínua de uma cutinase recombinante em sistema micelar usando disco perfurado rotativo. A extração foi realizada diretamente do meio a 20°C em solução 100mM de AOT em isooctano. A partir das condições ótimas de extração, eles obtiveram um rendimento de 54,4%.

Outro exemplo de recuperação de proteínas por extração contínua foi realizado por

HAN *et al.* (1994). Os autores estudaram a recuperação de uma proteína intracelular de *Candida utilis* por extração com micela reversa de CTAB/hexanol numa coluna “spray”. Foi analisado o efeito da variação do número de circulações, do fluxo de alimentação e do comprimento da coluna. O número ótimo de circulações e do fluxo para a extração das proteínas foi de 2 e 0,2 mL/seg, respectivamente. No entanto, a quantidade de proteína recuperada na reextração foi bastante afetada pelo número de circulações, apresentando um aumento considerável entre a sétima e a nona circulação. Com o aumento do comprimento da coluna de 20 para 40 cm, a quantidade de proteína extraída também aumentou, devido ao maior contato entre as fases, permitindo uma maior permeabilização celular pela ação da solução micelar e da solubilização da proteína.

## 2.6 Xilanases

Para este estudo foi escolhida a xilanase, uma enzima de grande interesse, por apresentar uma vasta aplicação no setor industrial (CUROTTO *et al.*, 1994).

Os fungos filamentosos são particularmente produtores interessantes de xilanases do ponto de vista industrial, devido ao fato de serem enzimas extracelulares. Além disso, a produção de xilanases a partir da cultura de fungos é geralmente maior que a produzida por leveduras e bactérias. Outra característica importante é que as xilanases produzidas por fungos liberam um complexo de várias enzimas xilanolíticas que auxiliam na degradação da xilana (HALTRICH *et al.*, 1996).

As xilanases têm como substratos naturais as hemiceluloses, que são polissacarídeos presentes em matérias primas lignocelulósicas. As hemiceluloses constituem-se de uma mistura de polissacarídeos não celulósicos, que são encontrados geralmente no meio da lamela média das plantas, em toda a extensão da fibra, intimamente associadas à celulose (SUNNA, ANTRANIKIAN, 1997). A hemicelulose mais comumente presente na parede celular das plantas terrestres é a xilana, representando mais de 30% em peso seco (JOSELEAU *et al.*, 1992). As xilanas são compostas de resíduos de ligações

$\beta(1-4)$ D-xilopiranosídicas. A maioria delas se apresenta na forma de heteropolissacarídeos, contendo diferentes grupos substituintes nas cadeias centrais e laterais. Os substituintes mais comuns encontrados na cadeia central das xilanas são grupos acetil, arabinosil e glucuronosil (PULS, POUNTANEN, 1989; BIELY, 1985). Homoxilanas, por outro lado, consistem exclusivamente de resíduos xilosil e não são muito comuns na natureza, mas foram isoladas de gramíneas e talos de tabaco.

Devido à heterogeneidade das xilanas, sua hidrólise requer a ação combinada de um sistema enzimático complexo (FIGURA 9), ou seja, a ação de diferentes enzimas como as  $\beta$ -1-4-endoxilânase,  $\beta$ -xilosidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase,  $\alpha$ -glucuronidase, acetil (xilana) esterase e ferúlico esterase. Todas estas enzimas atuam conjuntamente para a conversão da xilana em seus açúcares constituintes. A presença de tal sistema enzimático xilanolítico multifuncional é muito comum entre bactérias e fungos (COUGHLAN, HAZLEWOOD, 1993; WONG *et al.*, 1988; WOODWARD, 1984).

Heteroxilanas contêm diferentes grupos substituintes nas cadeias central e lateral. O grupo das enzimas que degradam o esqueleto é formado pela endoxilânase e pela  $\beta$ -xilosidase:

Endoxilânases:  $\beta$ -1,4-D-xilânase (1,4- $\beta$ -D-xilana xilohidrolase; EC 3.2.1.8) hidrolisam as ligações glicosídicas no interior das xilanas, resultando em uma diminuição do grau de polimerização do substrato. O ataque à xilana não é ao acaso, e a ligação para ser hidrolisada depende da natureza do substrato, ou seja, da extensão, do grau de diversidade e da presença de substituintes na cadeia (REILLY, 1981). Durante o começo do processo de hidrólise da xilana, os principais produtos formados são xilooligossacarídeos. Com o prosseguimento da hidrólise, esses oligossacarídeos podem ser hidrolisados em xilotriose, xilobiose e xilose (DEBEIRE-GOSSELIN *et al.*, 1992a,b; WONG *et al.*, 1988; DEKKER, RICHARDS, 1976). Uma interessante propriedade físico-química das endoxilânases de bactérias e fungos parece ser a existência de uma forte relação entre o valor da massa molar e ponto isoelétrico. Assim, WONG *et al.*(1988) sugerem que endoxilânases podem ser agrupadas em proteínas básicas e ácidas, sendo que as básicas apresentam massa molar abaixo de 30 kDa e as ácidas apresentam massa molar acima desse valor. Aproximadamente 70% das endoxilânases ácidas têm o valor da massa molar acima de 30 kDa. Quase a mesma porcentagem de endoxilânases básicas mostram valores de massa

molar menor que 30 kDa. A maior parte das endoxilanases que foram caracterizadas são preferencialmente ativas em temperaturas na faixa de 45 a 75°C, e somente um pequeno número de endoxilanases de bactérias e fungos mostram atividade máxima em temperaturas acima de 80°C.

β-xilosidases: β-D-xilosidases (β-D-xilose xilo-hidrolase; EC 3.2.1.37) são exoglicosidases que hidrolisam pequenos xilooligossacarídeos e xilobiose a partir do terminal não redutor, liberando xilose (WONG *et al.*, 1988). β-xilosidases têm sido encontradas em bactérias e fungos, e existe um grande número dessas enzimas com massa molar entre 60 e 360 kDa, podendo ser proteínas simples ou diméricas. As β-xilosidases são capazes de quebrar o substrato artificial p-nitrofenol β-D-xilose, o qual é usado para determinação de sua atividade enzimática (COUGHLAN, HAZLEWOOD, 1993).

Entre as enzimas que participam na quebra das cadeias laterais destacam-se as α-L-arabinofuranosidases, α-D-glucuronidases, e as esterases que participam na liberação dos substituintes acetil, cumaril e feruloil. Estas enzimas atuam em sinergismo com as endo-xilanases e as β-xilosidases (SUNNA, ANTRANIKIAN, 1997; COUGHLAN, HAZLEWOOD, 1993; ERIKSSON, 1990):

α-L-arabinofuranosidases: Apesar do importante papel da arabinofuranosidase na hidrólise da xilana, somente algumas enzimas foram isoladas e caracterizadas. Existem dois tipos de arabinofuranosidases: a que tem ação exo α-L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) e apresenta atividade para o substrato p-nitrofenil-α-L-arabinofuranosídeo e sobre arabanos ramificados; e a outra arabinofuranosidase é uma endo 1,5-α-L-arabinase (EC 3.2.1.99), que é ativa somente em arabanos lineares (VAN der VEEN *et al.*, 1992).

α-glucuronidases: α-D-glucuronidases (3.2.1.-) hidrolisam as ligações α-1-2 entre o ácido glucurônico e o resíduo de xilose em glucuronoxilana. Devido à falta de atividade de glucuronidase em fungos, essa enzima não havia sido descrita até 1986 (PULS *et al.*, 1986). As cinco α-glucuronidases que foram purificadas até o momento têm massa molar acima de 100 kDa (SUNNA, ANTRANIKIAN, 1997).

Acetil(xilana)esterase: (EC 3.1.1.6) removem o substituinte o-acetil nas posições dos carbono-2 e carbono-3 do resíduo de xilose em xilanas acetiladas. A produção de acetil (xilana) esterase por fungos e bactérias foi descrito pela primeira vez por BIELY *et al.*

(1985). A principal razão para a demora da descoberta dessa enzima foi devido à falta de substratos apropriados para sua análise.

Ferúlico esterase e cumárico esterase: Ferúlico esterase (EC 3.1.1.-) quebra as ligações éster entre a cadeia lateral da arabinose e o ácido ferúlico na xilana. Similarmente, cumárico esterase (EC 3.1.1.-) quebra as ligações éster entre a arabinose e o ácido p-cumarílico (MACKENZIE *et al.*, 1987; MULLER-HARVEY *et al.*, 1986).

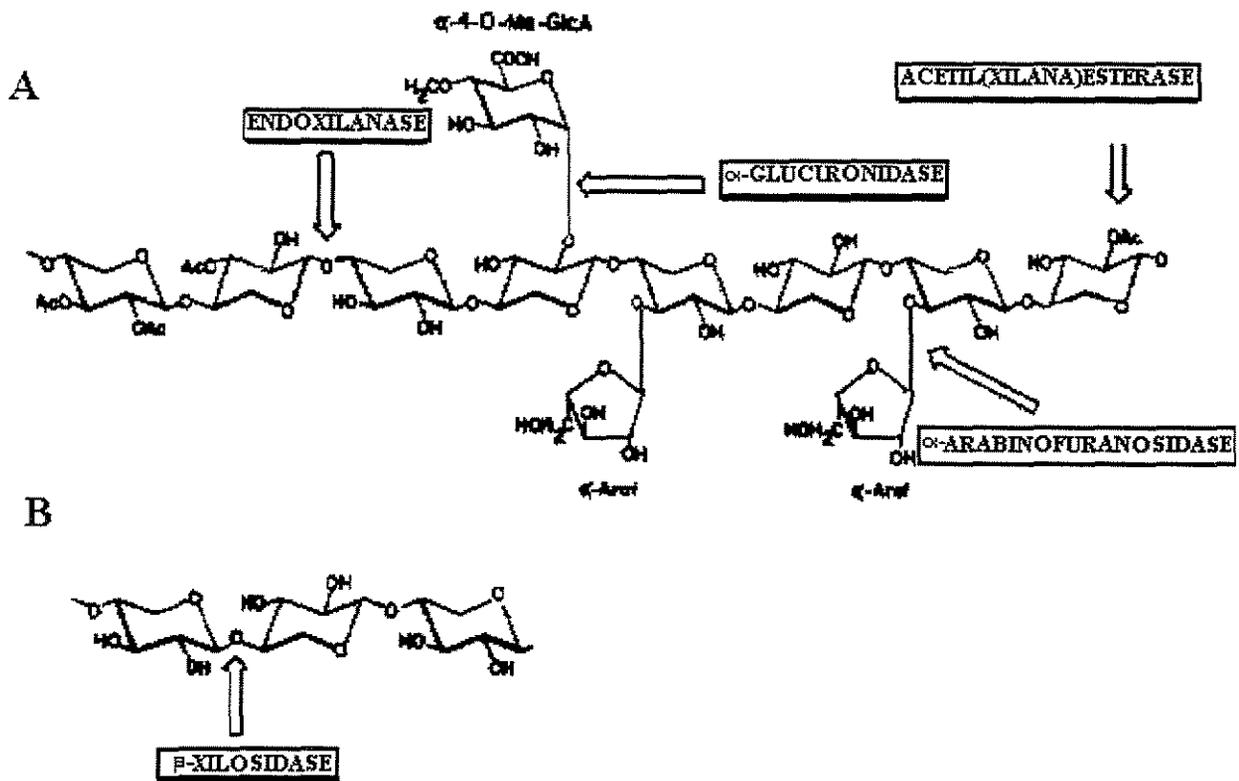


FIGURA 9: (A) Enzimas xilanolíticas envolvidas na degradação da xilana. Ac: grupo acetil;  $\alpha$ -4-o-Me-GlcA: Ácido  $\alpha$ -4-o-metil glucurônico. (B) Hidrólise de xilooligossacarídeos pela  $\beta$ -xilosidase.

## 2.7 Aplicações Biotecnológicas das Xilanases

Xilanases apresentam grande potencial para utilização em processos biotecnológicos. Em alguns deles há a necessidade de utilização de enzimas puras, em outras aplicações é desejável a presença de um conjunto de atividades enzimáticas.

As xilanases podem ser utilizadas na indústria de alimentos e na fabricação de pães, visando aumentar seu volume e melhorar a textura da casca e miolo (MUTSAERS, 1991), na etapa de filtração da cerveja, rompendo sólidos em suspensão (VAN DER BROECK *et al.*, 1990), na clarificação de sucos, extração de café, óleos vegetais e de amido (WONG, SADDLER, 1993).

A adição de xilanase à ração para aves e suínos aumenta sua digestibilidade (BRICE, MORRISON, 1991). Há também o interesse em utilizá-la para produção de xilose, xilobiose e xilo-oligômeros que podem ser empregados como insumos para obtenção de xilitol ou ácido lático por via fermentativa (GILBERT *et al.*, 1992; WONG *et al.*, 1988).

O uso de xilanases em branqueamento de polpas tem sido considerado uma das mais importantes aplicações biotecnológicas dessas enzimas (VIAKARI *et al.*, 1994). O uso de xilanases durante o branqueamento de polpas reduz o consumo de reagentes químicos à base de cloro de 20 a 30%, causando menor agressão ao ambiente por tais agentes (MILAGRES, DURAN, 1992). Sendo também uma alternativa para remoção da lignina residual que confere à polpa uma cor escura.

### 3. OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi estudar o desempenho de uma microcoluna com campânulas pulsadas sobre a recuperação da xilanase pura e presente no extrato enzimático bruto obtida do cultivo de *Penicillium janthinellum* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, utilizando a técnica de extração líquido - líquido por micela reversa, em processo contínuo.

Para atingir tais objetivos, foram desenvolvidas as seguintes etapas:

- Verificar a validade dos dados obtidos em batelada no processo contínuo.
- Determinar o efeito das variáveis condutividade da fase aquosa e razão entre as fases aquosa/orgânica sobre o rendimento em atividade da xilanase, utilizando uma microcoluna com campânulas pulsadas e a enzima pura.
- Determinar o efeito das variáveis condutividade da fase aquosa, frequência de pulsação das campânulas e razão entre as fases aquosa/orgânica sobre o rendimento em atividade da xilanase, utilizando uma microcoluna com campânulas pulsadas e o extrato enzimático bruto.
- Determinar os modelos estatísticos e as variáveis significativas no processo e construção das superfícies de resposta.
- Estudar a influência da frequência de pulsação das campânulas sobre a fração de retenção da fase dispersa.

- Estudar a influência da frequência de pulsação das campânulas sobre a velocidade característica.
- Estudar a influência do número de Reynolds sobre o rendimento em atividade da xilanase na microcoluna.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado no presente trabalho foi o fungo *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115, isolado de madeira em decomposição, em Lorena – SP, por MILAGRES (1988).

### 4.2 Meios de Cultura

#### 4.2.1 Meio de Manutenção dos Fungos

O meio de cultura usado para obtenção de esporos de *P. janthinellum* foi composto por 2% de glicose, 0,25% de extrato de levedura, 2% (v/v) de solução mineral (VOGEL,1956), e 2% de ágar-ágar, que foi autoclavado por 15 minutos a 112°C. Cada mililitro de solução mineral contém citrato de sódio diidratado (0,125 g), fosfato monobásico de potássio (0,250 g), nitrato de amônio (0,100 g), sulfato de magnésio heptaidratado (0,100 g), cloreto de cálcio diidratado (0,050 g), ácido cítrico (0,250 mg), sulfato de zinco heptaidratado (0,250 mg), sulfato ferroso amoniacal pentaidratado (0,050 mg), sulfato de cobre pentaidratado (0,015 mg), sulfato de manganês diidratado (0,002 mg) (MILAGRES, 1988).

#### **4.2.2 Meio fermentativo formulado a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de - açúcar**

Na produção do hidrolisado foi utilizado bagaço de cana-de-açúcar proveniente da Usina São Martinho. O procedimento de hidrólise foi realizado conforme descrito por MILAGRES, LACIS (1991). Foi utilizado 46 mg de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> p.a. por grama de matéria seca em uma relação de matéria seca : solução ácida de 1:10. O bagaço foi seco a 80°C até ser atingida a umidade de 10%, passando em seguida por um moinho com peneira de 20 “mesh”. Posteriormente, foi tratado com ácido (20 mL de ácido sulfúrico p.a. e 8 L de água para 800 g de bagaço) e autoclavado a 121°C por 45 minutos. A fração líquida, constituída principalmente por hemiceluloses, foi recuperada por filtração em papel de filtro e levada a pH 5,5 com NaOH 1N.

A partir do hidrolisado hemicelulósico foi preparado um meio para cultivo de *P. janthinellum* com adição de solução mineral de Vogel (2% v/v) e extrato de levedura (0,1%). O meio foi autoclavado por 15 minutos a 112°C.

#### **4.3 Produção das Xilanases**

A obtenção das xilanases se deu por meio do cultivo de *P. janthinellum* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, previamente filtrado e com pH ajustado para 5,5 com NaOH. Os frascos (Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL de meio) foram incubados a 30°C sob agitação de 60 rpm por 96 horas.

#### **4.4 Avaliação da Atividade Enzimática**

A atividade de xilanase extracelular foi determinada pela quantidade de açúcares

redutores liberados a partir de xilana, de acordo com o método de BAILEY *et al.* (1992). Os açúcares redutores foram dosados pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959).

A solução de xilana foi preparada a partir de 1 g de xilana ("birchwood" - Sigma) diluída com 60 mL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,5. A solução foi fervida sob agitação e o volume completado para 100 mL com o tampão.

Um volume de 0,9 mL de xilana 1% foi colocado em tubos de ensaio e incubados em banho termostaticado, à temperatura de 50°C, por 5 min. Em seguida, acrescentou-se 0,1 mL das amostras contendo enzima. Após 5 min, adicionou-se 1,5 mL de DNS para dosagem dos açúcares liberados, sendo a mistura aquecida em banho de água fervente por 5 min. A reação foi paralisada com o esfriamento da solução em banho de gelo.

As determinações espectrofotométricas foram realizadas a 540 nm. O aparelho foi zerado com uma solução contendo 1 mL de tampão acetato de sódio 50 mM e calibrado a cada determinação com soluções contendo 0,1 mL de enzima e 0,9 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5 (Branco da enzima). Associadamente, preparou-se um tubo que continha 0,1 mL do mesmo tampão e 0,9 mL de xilana (Branco do substrato). A diferença de absorvância obtida entre a amostra e os brancos foram usados para o cálculo de atividade enzimática, detectando-se assim todas as unidades não provenientes da hidrólise da xilana. A curva padrão foi estabelecida a partir de xilose (Merck), nas concentrações entre 2 e 10 mmol/mL.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que causa a transformação de 1 mmol de substrato por minuto a 50°C.

## **4.5 Extração Líquido - Líquido de Xilanase por Micela Reversa em Processo Contínuo**

### **4.5.1 Descrição do Equipamento**

Neste trabalho os resultados experimentais foram obtidos numa microcoluna, de

operação contínua de campânulas pulsadas, disponível e em operação no Laboratório de Processos de Separação e cuja foto é apresentada na FIGURA 10. Optou-se pelas campânulas como dispositivos para promover a agitação, porque elas conseguem promover uma boa dispersão e aumentar o tempo de contato entre as fases.

A microcoluna foi construída em tubo de vidro de 19 cm de altura; 2,84 cm de diâmetro externo e 2,54 cm de diâmetro interno. No interior da mesma foi acoplado um eixo, no qual estão soldadas 3 campânulas que estão distanciadas 4 cm uma das outras. O diâmetro da base é de 2,49 cm. A peneira de aço inox da qual a campânula foi construída tem 24 "mesh" e, portanto, fornece uma área livre de 38%.

Os bocais de alimentação e saída são de inox, e possuem um diâmetro interno de 3,65 mm e 6,85 mm de diâmetro externo.

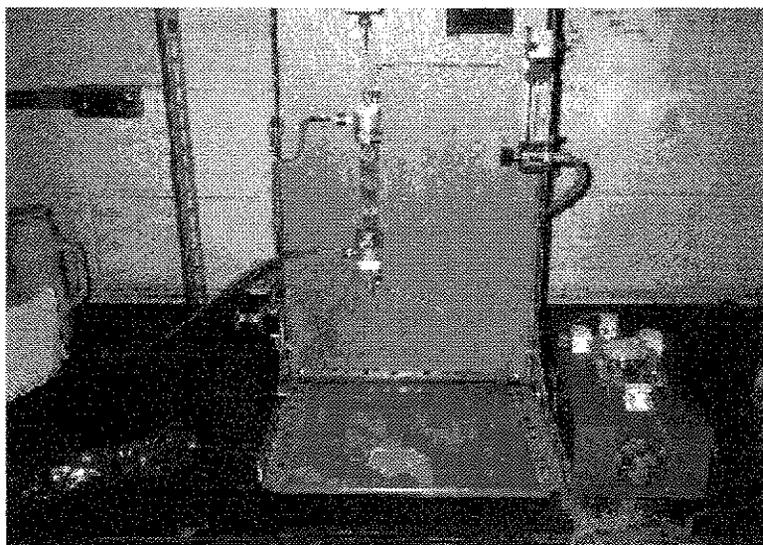
Durante um pulso, a campânula movimenta-se aproximadamente 2,8 cm para baixo e 2,8 cm para cima, o que faz com que a amplitude do pulso seja de aproximadamente 5,6 cm.

Os pulsos são fornecidos por um dispositivo que promove os movimentos alternados (movimenta o eixo para cima e para baixo) e controlados por um dispositivo de frequência de pulsação.

A alimentação da fase contínua, que possui maior densidade, e a alimentação da fase dispersa, que possui menor densidade, foram feitas por meio de bombas peristálticas, previamente calibradas.

Os tubos para conduzir as alimentações e saída são de viton, que é um material resistente à ação do isooctano.

As amostras das fases leve e pesada foram retiradas no topo e fundo da coluna, respectivamente. As condições de carga total alimentada, razão entre as fases alimentadas e intensidade de pulsação, foram determinadas experimentalmente.



**FIGURA 10:** Microcoluna de campânulas pulsadas.

#### 4.5.2 Operação da Microcoluna

Para a operação da microcoluna, com a finalidade de obter dados relativos à transferência de massa e fração de retenção da fase dispersa, deve-se seguir o procedimento descrito a seguir.

Primeiro, encheu-se a microcoluna com a fase contínua (meio fermentado contendo xilanase tamponado com fosfato de sódio 0,01M, pH 7,0). Após preenchida foi ajustada a vazão, por meio de bomba peristáltica no valor desejado. Foi feito também o ajuste da vazão de saída. Na saída das fases leve e pesada tinha uma conexão de plástico transparente, ligado aos bocais, que permitiu a visualização do líquido para verificar se estava fluindo de maneira estável, mantendo o nível de líquido na coluna constante.

A seguir, foi aberta a entrada da fase dispersa (fase orgânica composta de 0,2M

BDBAC em 92,5% isooctano e 7,5% hexanol) e iniciou-se a alimentação desta fase, com a vazão controlada pelas bombas peristálticas. Posteriormente, acionou-se o sistema de pulsação e ajustou a frequência ao valor desejado.

Após este procedimento, iniciou-se a contagem do tempo de operação do equipamento que durou aproximadamente 60 minutos. O tempo de operação foi escolhido baseado em observações preliminares, embora seja observado que, muitas vezes, o estado estacionário é atingido num tempo menor (aproximadamente 30 a 40 minutos). Considerou-se interessante observar o comportamento do sistema por um período de tempo maior, principalmente no estudo da extração de enzimas, onde há a possibilidade de ocorrer a desnaturação.

Periodicamente, durante a operação, foi feita a coleta de amostras na saída das fases. Verificou-se, então, as vazões de cada fase, por meio da medida do volume coletado durante um determinado período de tempo. Essas amostras, analisadas posteriormente, determinaram a concentração de proteína e atividade enzimática. Com esses dados, obteve-se o perfil de atividade durante a operação do equipamento e os cálculos relativos à transferência de massa.

Após 60 minutos de operação terminou a corrida (tempo de um experimento). Foram fechadas, simultaneamente, as entradas e saídas das fases e desligado a pulsação das campânulas. A seguir, foi retirado todo o líquido que estava na microcoluna, sendo medido o volume da fase dispersa e o volume total. Com este procedimento, foi calculada a fração de retenção da fase dispersa.

Com as medidas das vazões de saída das fases e com a atividade enzimática de cada uma destas correntes, foi feito o cálculo dos balanços de massa globais e por componente presente na microcoluna.

#### **4.6 Procedimento Experimental para obtenção da Fração de Retenção da Fase Dispersa ("Hold-up")**

O procedimento experimental adotado, no estudo da fração de retenção da fase dispersa, foi baseado no "método das interrupções simultâneas".

Por meio desse procedimento, obteve-se as medidas da fração de retenção da fase dispersa em cada experimento realizado.

O "método das interrupções simultâneas", consistiu do seguinte procedimento:

- Após alcançado o tempo de operação do equipamento e retiradas as amostras, interrompeu-se simultaneamente a alimentação das duas fases e o mecanismo de pulsação.
- A seguir, foi feita a medida do volume total de líquido na microcoluna e o volume da fase dispersa, por meio da drenagem do líquido, que foi coletado em uma proveta graduada.
- A fração de retenção da fase dispersa foi calculada de acordo com a equação abaixo:

$$\phi = \text{Volume da fase dispersa} / \text{Volume total na coluna}$$

#### **4.7 Delineamento Experimental da Extração Líquido - Líquido de Xilanase por Micela Reversa em Processo Contínuo utilizando Campânulas Pulsadas e a Enzima Pura**

As variáveis consideradas neste estudo foram: condutividade da fase aquosa e razão entre as fases aquosa/orgânica.

O delineamento experimental para verificar a influência das variáveis acima descritas foi realizado segundo um esquema fatorial completo  $2^2$  com 2 ensaios no ponto central. Os níveis dos fatores utilizados são mostrados na TABELA 1, onde (-1), (0) e (+1) significam o menor nível, nível médio e maior nível, respectivamente. A matriz do planejamento desse projeto fatorial fracionário é mostrado na TABELA 2.

**TABELA 1:** Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial completo  $2^2$  com ponto central.

| Fatores |   | Níveis |      |      |
|---------|---|--------|------|------|
|         |   | -1     | 0    | +1   |
| A       | Condutividade (mS/cm)                   | 7,5    | 8,75 | 10,0 |
| B       | Razão entre as Fases<br>Aquosa/Orgânica | 0,6    | 0,8  | 1,0  |

**TABELA 2:** Matriz de um planejamento fatorial completo  $2^2$  com 2 ensaios no ponto central em função de diferentes variáveis que influenciam a recuperação contínua de xilanase por micela reversa, utilizando campânulas pulsadas.

| Ensaio | Fatores |    |
|--------|---------|----|
|        | A       | B  |
| 1      | -1      | -1 |
| 2      | 1       | -1 |
| 3      | -1      | 1  |
| 4      | 1       | 1  |
| 5      | 0       | 0  |
| 6      | 0       | 0  |

A = Condutividade (mS/cm); B = Razão entre as Fases Aquosa/Orgânica

#### 4.8 Delineamento Experimental da Extração Líquido - Líquido de Xilanase por Micela Reversa em Processo Contínuo utilizando Campânulas Pulsadas e o Extrato Enzimático Bruto

O delineamento experimental para verificar a influência das variáveis, condutividade da fase aquosa, frequência de pulsação das campânulas e razão entre as fases aquosa/orgânica, foi realizado seguindo um planejamento  $2^3$  com 4 ensaios no ponto central (BARROS NETO *et al.*, 1995). Os níveis dos fatores e a matriz de planejamento desse projeto são mostrados nas TABELAS 3 e 4, respectivamente. Os valores (-1), (0) e (+1) correspondem ao menor nível, nível médio e maior nível, respectivamente.

Pelos resultados obtidos nesse planejamento, foi feito um segundo planejamento

fatorial completo  $2^3$  com pontos centrais e face centrada. Os níveis dos fatores utilizados no planejamento são mostrados na TABELA 5 e a matriz utilizada no planejamento na TABELA 6.

**TABELA 3:** Fatores e níveis avaliados no planejamento  $2^3$  com 4 ensaios no ponto central.

| Fatores |                                      | Níveis |      |     |
|---------|--------------------------------------|--------|------|-----|
|         |                                      | -1     | 0    | 1   |
| A       | Condutividade (mS/cm)                | 10     | 12,5 | 15  |
| B       | Frequência de Pulsção (pulso/seg.)   | 1:3    | 1:5  | 1:8 |
| C       | Razão entre as Fases Aquosa/Orgânica | 1      | 1,5  | 2   |

**TABELA 4:** Matriz de um planejamento fatorial completo  $2^3$  com 4 ensaios no ponto central em função de diferentes variáveis que influenciam a recuperação contínua de xilanase por micela reversa, utilizando campânulas pulsadas.

| Ensaio | Fatores |    |    |
|--------|---------|----|----|
|        | A       | B  | C  |
| 1      | -1      | -1 | -1 |
| 2      | 1       | -1 | -1 |
| 3      | -1      | 1  | -1 |
| 4      | 1       | 1  | -1 |
| 5      | -1      | -1 | 1  |
| 6      | 1       | -1 | 1  |
| 7      | -1      | 1  | 1  |
| 8      | 1       | 1  | 1  |
| 9      | 0       | 0  | 0  |
| 10     | 0       | 0  | 0  |
| 11     | 0       | 0  | 0  |
| 12     | 0       | 0  | 0  |

A= Condutividade (mS/cm); B = Frequência de Pulsação (pulso/seg.) e C = Razão entre as Fases Aquosa/Orgânica

**TABELA 5:** Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial completo  $2^3$  com pontos centrais e face centrada.

| Fatores |   | Níveis |     |      |
|---------|---|--------|-----|------|
|         |   | -1     | 0   | 1    |
| A       | Condutividade (mS/cm)                   | 7,5    | 10  | 12,5 |
| B       | Frequência de Pulsação(pulso/seg.)      | 1:1    | 1:2 | 1:3  |
| C       | Razão entre as Fases<br>Aquosa/Orgânica | 0,5    | 1   | 1,5  |

**TABELA 6:** Matriz do planejamento utilizada na extração contínua de xilanase por micela reversa, utilizando campânulas pulsadas, segundo um fatorial completo  $2^3$  com pontos centrais e face centrada.

| Ensaio | Fatores |    |    |
|--------|---------|----|----|
|        | A       | B  | C  |
| 1      | -1      | -1 | -1 |
| 2      | 1       | -1 | -1 |
| 3      | -1      | 1  | -1 |
| 4      | 1       | 1  | -1 |
| 5      | -1      | -1 | 1  |
| 6      | 1       | -1 | 1  |
| 7      | -1      | 1  | 1  |
| 8      | 1       | 1  | 1  |
| 9      | -1      | 0  | 0  |
| 10     | 1       | 0  | 0  |
| 11     | 0       | -1 | 0  |
| 12     | 0       | 1  | 0  |
| 13     | 0       | 0  | -1 |
| 14     | 0       | 0  | 1  |
| 15     | 0       | 0  | 0  |
| 16     | 0       | 0  | 0  |
| 17     | 0       | 0  | 0  |
| 18     | 0       | 0  | 0  |

A = Condutividade (mS/cm); B = Frequência de Pulsação (pulso/seg.) e C = Razão entre as Fases Aquosa/Orgânica

#### 4.9 Análise Estatística

Os dados experimentais foram analisados estatisticamente, de acordo com planejamentos predeterminados, para verificar o nível dos efeitos dos fatores em estudo.

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o programa STATISTICA, onde a variável resposta foi o rendimento em atividade. Os resultados foram expressos em tabelas de estimativa de efeitos, erros-padrão, teste t de "Student" e ainda em tabelas de análise de variância.

#### 4.10 Purificação da Xilanase em Batelada pelo Processo de Extração Líquido - Líquido em Micela Reversa, utilizando o Agente Tensoativo Catiônico (BDBAC)

A extração foi realizada a partir do extrato protéico, previamente concentrado com sulfato de amônio. A fim de se obter a concentração de 1,5 mg/mL de proteína, o extrato protéico foi ressuspensão em tampão fosfato 0,04M / pH 7,0. Em um tubo de ensaio adicionou-se 4,0 mL da solução protéica no mesmo volume de BDBAC em isooctano e hexanol, na proporção de 92,5 para 7,5%, respectivamente. Após intensa agitação em vórtice e centrifugação, se obteve uma fase de equilíbrio. Em seguida, procedeu-se a etapa de reextração. Um volume de 2,0 mL da solução micelar contendo a enzima foi misturado, também por agitação em vórtice, com 2,0 mL de uma nova fase aquosa (tampão acetato de sódio pH 5,5, 1M, adicionado de NaCl 0,5 M). A enzima purificada foi obtida na fase externa a solução micelar, que foi então liofilizada.

#### 4.11 Determinação do Raio da Micela

O raio da micela foi determinado segundo a equação (KREI *et al.*, 1995):

$$Rm = [3 \cdot W_o \cdot M_{aqu}] / [a_{tens} \cdot N_{av} \cdot \rho_{aqu}]$$

onde:

$$W_o = [H_2O] / [tens.]$$

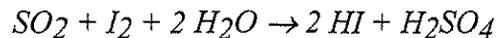
$M_{aqu}$  é a massa molar da água

$\rho_{aqu}$  a densidade da água

$a_{tens}$  denota a área por molécula de tensoativo na interface, que depende das suas propriedades. Para o tensoativo iônico na temperatura ambiente o valor de  $a_{tens}$  está no intervalo de 0,5-0,7 nm<sup>2</sup>

$N_{av}$  é o número de Avogadro

A determinação do valor de  $W_o$  (conteúdo de água) da fase orgânica foi feita por titulação, por meio da reação de Karl-Fisher (WIELAND, 1987), utilizando-se um titulador automático Metler DL 18. A reação ocorre em metanol (isento de água), utilizando uma solução de dióxido de enxofre, iodo e piridina (reagente de Karl-Fisher) para titular a água do sistema e pode ser escrita por:



A detecção do ponto final baseia-se nas diferenças de condutividade entre a espécie  $I^-$  e  $I_2$  (de condutividade maior). Após a titulação de toda a água presente no sistema, ocorre a acumulação de  $I_2$ , provocando uma queda de tensão entre os terminais do eletrodo.

#### 4.12 Determinação da Condutividade

A condutividade, definida também como condutância específica, é uma unidade quantitativa que define a capacidade de uma solução de conduzir corrente elétrica. É o

inverso da resistência elétrica de  $1\text{ cm}^3$  desta mesma solução à temperatura de  $25^\circ\text{C}$ .

Foi determinada por meio de um condutivímetro (ANALYSER modelo 650) e os resultados foram expressos em  $\text{mS/cm}$ .

#### 4.13 Determinação do teor de Proteínas Totais

A determinação de proteínas totais foi baseada no método de LOWRY *et al.* (1951), modificado.

O método de LOWRY utiliza o reagente “Folin-Ciocalteu phenol” 1N e soluções de BSA (albumina de soro bovino) nas concentrações de 50 a 1000  $\mu\text{g/mL}$  como curva de calibração. Este método consiste em adicionar 0,4 mL da amostra a ser analisada a 4 mL da solução fresca (1 mL Sulfato de sódio. 5  $\text{H}_2\text{O}$  - 1%; 1 mL Tartarato de sódio e potássio. 4  $\text{H}_2\text{O}$  - 2%; 10 mL de SDS-Na - 1% e 88 mL Carbonato de sódio - 2% em NaOH 0,1 N), seguida de uma agitação em vórtice e repouso por 10 minutos. Em seguida adicionou-se 0,4 mL do reagente de Folin (1:2), agitou-se e novamente manteve-se a solução em repouso por 30 minutos.

Após esse período foram feitas leituras da absorvância da solução em 578 nm em espectrofotômetro.

#### 4.14 Metodologia de Análise de Resultados

Nos intervalos de tempo predeterminados foram retiradas amostras das fases leve e pesada, onde foram medidas as atividades de xilanase. Valores estes que foram comparados com os inicialmente alimentados, o que possibilitará o conhecimento da quantidade de xilanase extraída. O rendimento em atividade ( $\eta_\alpha$ ) da enzima foi definido como:

$$\eta_a = A_2/A_1 \times 100, \text{ onde:}$$

$A_2$  = atividade na fase extraída

$A_1$  = atividade antes da purificação

As atividades  $A_2$  e  $A_1$  correspondem à atividade enzimática multiplicada pela vazão da fase considerada.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Resultados Preliminares

As enzimas recuperadas do meio de fermentação não são passíveis de utilização direta, devido à sua baixa concentração e, principalmente, à presença de subprodutos e impurezas incompatíveis com a sua aplicação. O grau de purificação da enzima a ser atingido dependerá da sua aplicação.

A extração líquido - líquido utilizando sistema de micela reversa tem sido apresentada como uma das tecnologias mais promissoras para a recuperação de biomoléculas, especialmente de proteínas, podendo ser aplicada diretamente no meio de fermentação.

A recuperação da xilanase, utilizando uma microcoluna de extração contínua com campânulas pulsadas, foi realizada conforme descrita no item 4.5.1 de Materiais e Métodos.

Os resultados apresentados nessa fase do trabalho são preliminares e foram realizados utilizando as condições ótimas obtidas em batelada por RODRIGUES (1997). Seguindo essas condições, foram realizados alguns ensaios na microcoluna de operação contínua, com a intenção de verificar e comparar com os resultados obtidos em batelada. Esses resultados são encontrados nas TABELAS 7, 8 e 9. Podemos observar que nas TABELAS 7 e 8 a maior recuperação em  $WP_{II}$  ocorreu em 10 minutos, ou seja, no início do processo, e que, no decorrer da extração, não apresentou oscilações. Analisando a TABELA 9, constata-se que não houve uma maior recuperação em  $WP_{II}$  pois, nestas condições, manteve-se aproximadamente constante. Entretanto, vale ressaltar que esses resultados foram inferiores aos obtidos nas mesmas condições, quando os ensaios foram realizados em batelada (RODRIGUES, 1997).

**TABELA 7:** Balanço de atividade no processo de extração contínua da xilanase realizada em uma microcoluna com campânulas pulsadas

| Tempo<br>(min) | Atividade recuperada<br>em WP <sub>I</sub> (%) | Atividade recuperada<br>em WP <sub>II</sub> (%) | Atividade<br>Total (%) |
|----------------|--|---|------------------------|
| 10             | 62,8   | 11,5  | 74,3                   |
| 20             | 61,5   | 4,3   | 65,8                   |
| 30             | 65,3   | 4,3   | 69,6                   |
| 40             | 73,2   | 6,7   | 79,9                   |
| 50             | 71,1   | 4,4   | 75,5                   |
| 60             | 71,5   | 6,5   | 78,0                   |
| 65             | 71,6   | 6,3   | 77,9                   |

Condições de extração: Fase aquosa: pH 5,9, 0,01M de tampão fosfato de sódio; Fase orgânica: 0,33M de BDBAC, 7,3% de hexanol; Temperatura ambiente; Agitação 0,33 pulso/seg. Condição de reextração: pH 5,5, 1M de tampão acetato de sódio, adicionado de NaCl 0,5M

**TABELA 8:** Balanço de atividade no processo de extração contínua de xilanase realizada em uma microcoluna com campânulas pulsadas

| Tempo<br>(min) | Atividade recuperada<br>em WP <sub>I</sub> (%) | Atividade recuperada<br>em WP <sub>II</sub> (%) | Atividade<br>Total (%) |
|----------------|--|---|------------------------|
| 7              | 51,4   | 4,1   | 55,5                   |
| 10             | 49,7   | 10,6  | 60,3                   |
| 20             | 33,9   | 6,6   | 40,5                   |
| 30             | 39,3   | 8,9   | 48,1                   |
| 40             | 35,3   | 4,9   | 40,2                   |
| 50             | 27,2   | 5,8   | 33,0                   |

Condições de extração: Fase aquosa: pH 8,1, sem adição de tampão fosfato de sódio; Fase orgânica: 0,38M de BDBAC, 8,6% de hexanol; Temperatura ambiente; Agitação 0,33 pulso/seg. Condição de reextração: pH 5,5, 1M de tampão acetato de sódio, adicionado de NaCl 0,5M.

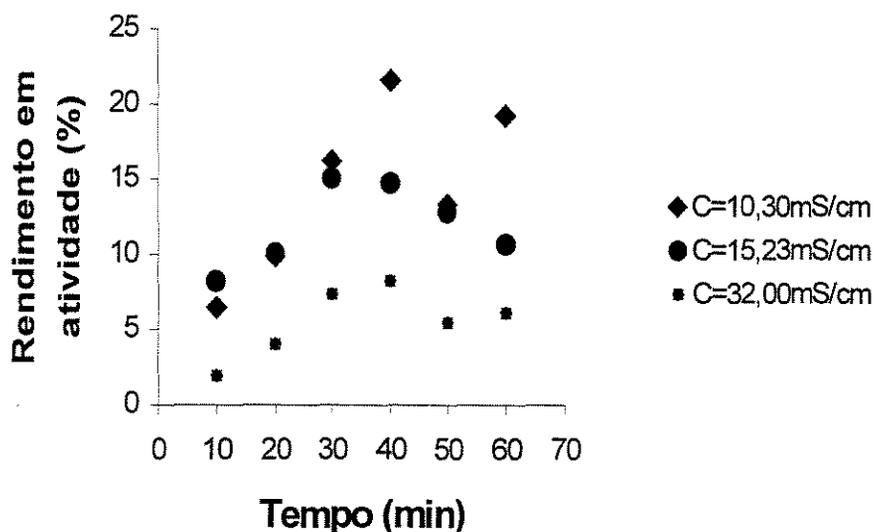
**TABELA 9:** Balanço de atividade no processo de extração contínua de xilanase realizada em uma microcoluna com campânulas pulsadas

| Tempo<br>(min) | Atividade recuperada<br>em WP <sub>I</sub> (%) | Atividade recuperada<br>em WP <sub>II</sub> (%) | Atividade<br>Total (%) |
|----------------|--|---|------------------------|
| 10             | 83,4   | n.d.  | 83,4                   |
| 15             | 81,3   | 4,4   | 85,7                   |
| 20             | 83,0   | 4,1   | 87,1                   |
| 25             | 78,9   | 4,3   | 83,2                   |
| 30             | 71,7   | 3,0   | 74,7                   |
| 40             | 70,0   | 4,0   | 74,0                   |
| 50             | 78,1   | 4,4   | 82,5                   |

Condições de extração: Fase aquosa: pH 7,0, 0,1M de tampão fosfato de sódio; Fase orgânica: 0,18M de BDBAC, 3,6% de hexanol; Temperatura ambiente; Agitação 0,33 pulso/seg. Condição de reextração: pH 5,5, 1M de tampão acetato de sódio, adicionado de NaCl 0,5M.

Como não foi possível obter bons resultados com as condições ótimas obtidas em batelada, optou-se por realizar novos ensaios variando a condutividade da fase aquosa. Esses resultados são apresentados na FIGURA 11, onde observa-se a influência da condutividade sobre o rendimento em atividade da xilanase em WP<sub>II</sub>.

É possível constatar, através da FIGURA 11, uma influência significativa da condutividade no processo de recuperação da xilanase, pois diminuindo a condutividade próximo a metade, ou seja, de 32 para 15,2 mS/cm, observa-se que a recuperação quase dobrou de valor, passando de 8,2 para 14,7%. Além disso, observa-se que, diminuindo ainda mais a condutividade para aproximadamente 1/3, a recuperação quase triplica, passando agora para 21,6%. Nota-se que estes valores são observados em torno de 40 minutos de operação.



**FIGURA 11:** Efeito da condutividade no rendimento em atividade da xilanase (Condições de extração: Fase Aquosa: pH 7,0, 0,01M de tampão fosfato de sódio; Fase Orgânica: 0,20M de BDBAC, 7,5% de hexanol; Temperatura ambiente. Condição de reextração: pH 5,5, 1M de tampão acetato de sódio, adicionado de NaCl 0,5M).

Observando isoladamente os resultados obtidos nos três ensaios em função do balanço de atividade, apresentados nas TABELAS 10, 11 e 12, constata-se que os resultados foram diminuindo com a redução da condutividade. Este fato pode ser explicado pela diluição, pois para diminuir a condutividade foi preciso fazer uma diluição do caldo enzimático e esta foi feita em água. Entretanto, os ensaios futuros serão realizados em tampão, pois resultados nos mostram que há uma menor redução da atividade, quando a diluição é feita no mesmo.

**TABELA 10:** Balanço de atividade no processo de extração contínua da xilanase realizada em uma microcoluna com campânulas pulsadas

| Tempo<br>(min) | Atividade recuperada<br>em WP <sub>I</sub> (%) | Atividade recuperada<br>em WP <sub>II</sub> (%) | Atividade<br>Total (%) |
|----------------|--|---|------------------------|
| 10             | 98,5   | 1,9   | 100,4                  |
| 20             | 98,1   | 4,0   | 102,1                  |
| 25             | 95,3   | 10,7  | 106,0                  |
| 30             | 84,9   | 7,4   | 92,3                   |
| 40             | 106,9  | 8,2   | 115,1                  |
| 50             | 94,6   | 5,5   | 100,1                  |
| 55             | 96,5   | 7,3   | 103,8                  |
| 60             | 104,3  | 6,1   | 110,4                  |
| 70             | 73,2   | 7,1   | 80,3                   |

Condições de extração: Fase aquosa: pH 7,0, 0,01M de tampão fosfato de sódio; C = 32 mS/cm. Fase orgânica: 0,20M de BDBAC, 7,5% de hexanol; Temperatura ambiente; Agitação 0,33 pulso/seg. Condição de reextração: pH 5,5, 1M de tampão acetato de sódio, adicionado de NaCl 0,5M.

**TABELA 11:** Balanço de atividade no processo de extração contínua da xilanase realizada em uma microcoluna com campânulas pulsadas

| Tempo<br>(min) | Atividade recuperada<br>em WP <sub>I</sub> (%) | Atividade recuperada<br>em WP <sub>II</sub> (%) | Atividade<br>Total (%) |
|----------------|--|---|------------------------|
| 10             | 86,4   | 8,2   | 96,6                   |
| 20             | 68,9   | 10,1  | 79,0                   |
| 30             | 78,6   | 15,1  | 93,7                   |
| 40             | 76,6   | 14,7  | 91,3                   |
| 50             | 69,3   | 12,8  | 82,1                   |
| 60             | 75,2   | 10,7  | 85,9                   |
| 70             | 61,9   | 7,4   | 69,3                   |

Condições de extração: Fase aquosa: pH 7,0, 0,01M de tampão fosfato de sódio; C=15,2 mS/cm. Fase orgânica: 0,2M de BDBAC, 7,5% de hexanol; Temperatura ambiente; Agitação 0,33 pulso/seg. Condição de reextração: pH 5,5, 1M de tampão acetato de sódio, adicionado de NaCl 0,5M.

**TABELA 12:** Balanço de atividade no processo de extração contínua de xilanase realizada em uma microcoluna com campânulas pulsadas

| Tempo<br>(min) | Atividade recuperada<br>em WP <sub>I</sub> (%) | Atividade recuperada<br>em WP <sub>II</sub> (%) | Atividade<br>Total (%) |
|----------------|--|---|------------------------|
| 10             | 39,0   | 6,5   | 45,5                   |
| 20             | 39,1   | 9,9   | 49,0                   |
| 30             | 39,9   | 16,2  | 56,1                   |
| 40             | 30,6   | 21,6  | 52,2                   |
| 50             | 30,9   | 13,3  | 44,2                   |
| 60             | 31,3   | 19,2  | 50,5                   |

Condições de extração: Fase aquosa: pH 7,0, 0,01M de tampão fosfato de sódio; C=10,3 mS/cm. Fase orgânica: 0,2M de BDBAC, 7,5% de hexanol; Temperatura ambiente; Agitação 0,33 pulso/seg. Condição de reextração: pH 5,5, 1M de tampão acetato de sódio, adicionado de NaCl 0,5M.

### **5.1.1 Extração de Xilanase por Micela Reversa em Processo Contínuo utilizando o Agente Tensoativo Aniônico AOT**

Nesta fase inicial do trabalho foram também realizados ensaios com o agente tensoativo aniônico AOT. Entretanto, nesses ensaios, não foi possível determinar a recuperação em atividade em  $WP_{II}$ , ou seja, na fase reextraída, pode ter acontecido que a enzima não foi extraída, ou ainda que tenha ocorrido a desnaturação.

Como os resultados obtidos em batelada por RODRIGUES (1997) com o AOT foram baixos e no processo contínuo não houve recuperação, optou-se por não realizar mais ensaios com este tensoativo.

### **5.2 Otimização da Extração de Xilanase por Micela Reversa utilizando uma Microcoluna com Campânulas Pulsadas e a Enzima Pura**

Planejamento estatístico de experimentos é uma ferramenta de grande utilidade na pesquisa científica, pois possibilita com uma menor quantidade de experimentos fornecer maior quantidade de informação e de indicações sobre a influência das variáveis, e principalmente suas interações sobre a variável dependente em estudo.

Para executar um planejamento fatorial é necessário, em primeiro lugar, especificar os fatores que serão estudados bem como selecionar a variável resposta. Os fatores, isto é, as variáveis controladas pelo pesquisador, tanto podem ser quantitativas como qualitativas. Os níveis são os valores dos fatores que serão empregados nos experimentos.

Tendo-se selecionado as variáveis importantes, executa-se os ensaios por uma matriz de experimento e efetua-se os registros das respostas para todas as possíveis combinações dos níveis e fatores. Os resultados obtidos no planejamento são interpretados a partir do cálculo dos efeitos dos fatores isolados (efeitos principais) e dos efeitos de interação entre os fatores. Tanto os efeitos principais quanto os efeitos de interação são calculados a partir de todas as respostas observadas.

O estudo da otimização da extração líquido - líquido da xilanase por micela reversa foi também realizado usando a enzima pura. Para este estudo foi escolhida a enzima purificada por RODRIGUES *et al.*,1999. As condições de trabalho foram pH 7,0, em tampão fosfato de sódio 0,01M, e fase orgânica 0,2M BDBAC em 92,5% isooctano e 7,5% hexanol. As condições de reextração foram fixadas em pH 5,5 em tampão acetato de sódio 1M, adicionado de NaCl 0,5M.

Foram selecionadas duas variáveis para estudo de seus efeitos sobre o rendimento em atividade da enzima, a condutividade da fase aquosa e a razão entre as fases aquosa/orgânica. Os resultados dos experimentos obtidos deste planejamento são apresentados na TABELA 13.

**TABELA 13:** Esquema da matriz utilizada no planejamento fatorial completo  $2^2$  com 2 ensaios no ponto central.

| Ensaio | Fatores |    | Rendimento em atividade (%) |
|--------|---------|----|-----------------------------|
|        | A       | B  |                             |
| 1      | -1      | -1 | 140,1                       |
| 2      | 1       | -1 | 139,2                       |
| 3      | -1      | 1  | 72,8                        |
| 4      | 1       | 1  | 88,7                        |
| 5      | 0       | 0  | 110,2                       |
| 6      | 0       | 0  | 107,3                       |

A = Condutividade (mS/cm) (-1 = 7,5; 0 = 8,75; 1 = 10,0)

B = Razão entre as Fases Aquosa/Orgânica (-1 = 0,6 ; 0 = 0,8; 1 = 1,0)

Ao analisar os resultados apresentados na TABELA 13, observa-se que o melhor resultado de recuperação em atividade foi de 140%, obtido quando se trabalhou nos menores níveis, ou seja, na condutividade da fase aquosa 7,5 mS/cm e razão entre as fases de 0,6. Observa-se também que, quando passamos do menor nível (-1) para o maior nível (1), temos uma redução de aproximadamente 50% na recuperação em atividade, indicando que para se ter bons resultados é preciso trabalhar com razão entre as fases menores que 1.

A análise estatística dos resultados desse ensaio mostrou que as duas variáveis, condutividade da fase aquosa e razão entre as fases, apresentam efeitos significativos (TABELA 14). Pelo resultado do teste t de "Student" pode-se observar que essas variáveis apresentam valores de t superiores ao tabelado (4,303). O sinal negativo que aparece no efeito da variável razão entre as fases indica que para aumentar a recuperação em atividade é preciso reduzir o nível deste fator, comprovando o que já teria sido observado anteriormente.

**TABELA 14:** Efeitos estimados, valores do teste t de "Student" e erros-padrão obtidos no planejamento fatorial completo  $2^2$  com 2 ensaios no ponto central.

| Efeitos e interações | Estimativas | Erros-Padrão | t         |
|----------------------|-------------|--------------|-----------|
| Média                | 110,167     | +/-0,527     | -         |
| A                    | 7,500       | +/-0,129     | 58,095*   |
| B                    | -58,900     | +/-0,129     | -456,237* |
| AB                   | 8,400       | +/-0,129     | 65,066*   |

A = Condutividade (mS/cm); B = Razão entre as Fases Aquosa/Orgânica

\* Significativos ( $t_{2, 0,95}$ ) = 4,303

Tendo em vista a significância dessas variáveis, procedeu-se uma análise da variância para verificar se os dados experimentais ajustam-se a um modelo linear. Por meio dessa análise, comprova-se os resultados do teste t e obtém-se uma correlação de 0,999, podendo com este valor afirmar que os dados observados se ajustam ao modelo, no caso um modelo linear. Os resultados estatísticos desse estudo se encontram nas TABELAS 15 e 16.

**TABELA 15:** Análise de variância para o estudo da recuperação de xilanase no planejamento fatorial completo  $2^2$  com 2 ensaios no ponto central.

| Efeitos | QM       | F         | P       |
|---------|----------|-----------|---------|
| A       | 56,250   | 3375,000  | 0,0003* |
| B       | 3469,210 | 20815,600 | 0,0000* |
| AB      | 70,560   | 4233,600  | 0,0002* |

$R^2 = 0,999$  QM – Média Quadrática

\*Significativos ao nível de 95% de confiança

**TABELA 16:** Coeficiente de regressão, erros-padrão, teste t de "Student" e nível de significância para o modelo que representa o processo contínuo de extração líquido - líquido de xilanase por micela reversa, utilizando um planejamento fatorial  $2^2$  com face centrada.

| Fatores | Coefficiente | Erros-Padrão | t         | p        |
|---------|--------------|--------------|-----------|----------|
| Média   | 110,167      | +/-0,053     | 2090,266* | 0,0000** |
| A       | 3,750        | +/-0,065     | 58,095*   | 0,0003** |
| B       | -29,450      | +/-0,065     | -456,237* | 0,0000** |
| AB      | 4,200        | +/-0,065     | 65,066*   | 0,0002** |

\* Significativos ( $t_{1,0,95} = 12,706$ )

\*\* Significativos ao nível de 95% de confiança

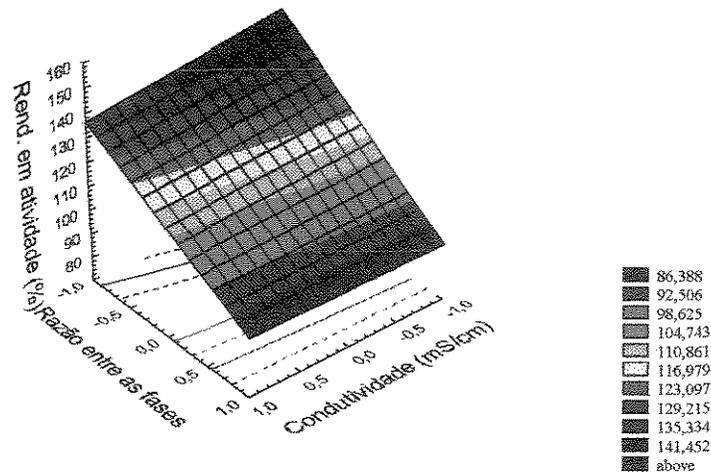
Como o resultado encontrado para a recuperação foi superior a 100% e o modelo é bem representado por um modelo linear, então podemos representar o processo considerando os termos que influenciam a extração, pela Equação 5.2.1:

$$Y = 110,17 + 3,75 A - 29,45 B + 4,2 AB \quad (5.2.1)$$

Sendo que  $Y$  representa o rendimento em atividade da xilanase,  $A$  representa a condutividade da fase aquosa e  $B$  a razão entre as fases.

Dessa forma, obteve-se melhores resultados de recuperação quando se utilizou os valores de condutividade da fase aquosa de 7,5 mS/cm e razão entre as fases de 0,6. Nessas condições, o rendimento máximo estimado pelo modelo foi de 147,57%. Os altos valores de rendimento em atividade obtidos na extração podem indicar que as condições operacionais estão muito próximas ao equilíbrio e que podemos considerar, com isso, a operação da coluna como sendo um único estágio de extração.

As curvas de nível e a superfície de resposta do modelo estão apresentadas na FIGURA 12. É possível observar que, na superfície de resposta, o rendimento máximo obtido para este modelo é de 142%.



**FIGURA 12:** Superfície de resposta e curvas de nível descrita pelo modelo da equação 5.2.1, que representa a extração de xilanase por micela reversa utilizando uma microcoluna com campânulas pulsadas e a enzima pura.

A fim de comparar o valor obtido experimentalmente, foi realizada uma nova extração nas condições definidas pelo modelo, que foram: condutividade da fase aquosa 7,5 mS/cm e razão entre as fases de 0,6. Obteve-se uma recuperação de atividade em xilanase de 137,1% para o interior da micela reversa. O rendimento previsto variou em função do experimental em apenas 7%, estando o mesmo dentro dos valores esperados.

O valor de  $W_o$  calculado foi de 47,7, o que corresponde a um raio micelar de 7,13nm, indicando com este valor que a micela era grande o suficiente para englobar a proteína. Desta maneira pode-se sugerir que  $W_o$  não influenciou na extração, pois estudos realizados por KREI, HUSTEDT (1992), indicaram que uma proteína com massa molar de 100 KDa apresenta um raio de 5 nm. E como a xilanase em estudo, de acordo com RODRIGUES *et al.*(1999), apresenta massa molar de 20,1 KDa, pode-se dizer que o raio parece ser o suficiente para que a proteína seja englobada.

### **5.3 Otimização da Extração de Xilanase por Micela Reversa utilizando uma Microcoluna com Campânulas Pulsadas e o Extrato Enzimático Bruto**

A decisão de adotar um método de planejamento experimental para a realização deste estudo foi feita em virtude da possibilidade de executar de forma organizada um número reduzido de experimentos, permitindo ainda a verificação dos efeitos individuais e de interação de todas as variáveis sobre a resposta, além da definição das variáveis mais importantes para o processo, juntamente com a avaliação dos erros experimentais, regressão e modelagem empírica dos resultados em função das variáveis escolhidas (BARROS NETO *et al.*, 1995; BOX *et al.*, 1978).

É importante ressaltar que, por mais sofisticadas que sejam as teorias matemáticas ou estatísticas envolvidas num método de planejamento experimental, essas não podem substituir medidas experimentais precisas e exatas, o bom senso e o conhecimento sobre o problema em estudo.

As variáveis condutividade da fase aquosa, frequência de pulsação das campânulas e razão entre as fases aquosa/orgânica foram selecionadas para o estudo de seus efeitos sobre

o rendimento em atividade. A escolha dos níveis das variáveis experimentais foi baseada em ensaios preliminares, que definiu como sendo a melhor condição de trabalho o pH 7,0, em tampão fosfato de sódio 0,01M, e fase orgânica 0,2M BDBAC em 92,5% isooctano e 7,5% hexanol. As condições de reextração foram fixadas em pH 5,5 em tampão acetato de sódio 1M, adicionado de NaCl 0,5M.

Definido os níveis das variáveis, foi realizado um planejamento fatorial completo em dois níveis. Utilizou-se uma matriz com 12 ensaios, onde 8 foram previstos pelo modelo e 4 foram referentes aos pontos centrais. Essa metodologia permitiu obter uma estimativa do erro experimental associado à determinação de uma resposta individual. A extensão do erro é importante para verificar se os efeitos são estatisticamente significativos.

Na TABELA 17 são apresentados os resultados referentes à recuperação da xilanase decorrentes do planejamento fatorial completo, juntamente com os valores codificados das variáveis condutividade da fase aquosa, frequência de pulsação das campânulas e razão entre as fases aquosa/orgânica. Verifica-se que a melhor recuperação foi de 34,2%. Nessa melhor condição constata-se que todas as variáveis apresentam-se em seus níveis mais baixos e que, onde temos a menor recuperação (6,2%), as variáveis estão em seus níveis mais altos, podendo esse ser um indicativo de que, para melhorar a recuperação da xilanase, vai ser necessário reduzir o valor dessas variáveis. Para verificar tal evidência foi realizada uma análise estatística para determinar o efeito principal das variáveis juntamente com suas interações sobre a resposta em estudo (TABELA 18).

A análise estatística dos resultados, mostrou que todas as variáveis apresentam efeitos principais significativos com 95% de confiança. Pelo resultado do teste t de "Student" pode-se observar que essas variáveis apresentam valores de t superiores ao tabelado (3,182). O modelo também mostra que parte das interações dessas variáveis são significativas, com exceção da interação AB. O sinal negativo obtido para os efeitos principais de todas as variáveis indica que, para aumentar o rendimento em atividade, deveria reduzir o nível desses fatores.

**TABELA 17:** Esquema da matriz utilizada no planejamento fatorial completo  $2^3$  com 4 ensaios no ponto central.

| Ensaio | Fatores |    |    | Rendimento em atividade (%) |
|--------|---------|----|----|-----------------------------|
|        | A       | B  | C  |                             |
| 1      | -1      | -1 | -1 | 34,2                        |
| 2      | 1       | -1 | -1 | 11,6                        |
| 3      | -1      | 1  | -1 | 23,4                        |
| 4      | 1       | 1  | -1 | 7,8                         |
| 5      | -1      | -1 | 1  | 8,9                         |
| 6      | 1       | -1 | 1  | 6,5                         |
| 7      | -1      | 1  | 1  | 8,5                         |
| 8      | 1       | 1  | 1  | 6,2                         |
| 9      | 0       | 0  | 0  | 16,8                        |
| 10     | 0       | 0  | 0  | 14,4                        |
| 11     | 0       | 0  | 0  | 16,2                        |
| 12     | 0       | 0  | 0  | 15,6                        |

A = Condutividade (mS/cm): (-1 = 10; 0 = 12,5; 1 = 15)

B = Frequência de Pulsação (pulso/seg.): (-1 = 1:3; 0 = 1:5; 1 = 1:8)

C = Razão entre as Fases Aquosa/Orgânica: (-1 = 1; 0 = 1,5; 1 = 2)

**TABELA 18:** Efeitos estimados, valores do teste t de "Student" e erros - padrão obtidos no planejamento fatorial completo  $2^3$  com 4 ensaios no ponto central.

| Efeitos e interações | Estimativas | Erros-Padrão | t        |
|----------------------|-------------|--------------|----------|
| Média                | 14,175      | +/- 0,296    | -        |
| A                    | -10,725     | +/- 0,725    | -14,802* |
| B                    | -3,825      | +/- 0,725    | -5,279*  |
| C                    | -11,725     | +/- 0,725    | -16,182* |
| AB                   | 1,775       | +/- 0,725    | 2,449    |
| AC                   | 8,375       | +/- 0,725    | 11,558*  |
| BC                   | 3,475       | +/- 0,725    | 4,796*   |

A = Condutividade (mS/cm); B = Frequência de Pulsação (pulso/seg.); C = Razão entre as Fases Aquosa/Orgânica

\* Significativos ( $t_{3, 0,95} = 3,18$ )

Pela análise da variância, comprova-se os resultados do teste t e obtém-se uma correlação de 0,987. Os resultados estatísticos desse estudo se encontram na TABELA 19, onde é possível observar uma curvatura significativa ( $p < 0,05$ ). Isso indica que a região submetida à investigação experimental encontra-se próxima da região de curvatura da superfície, representada por um modelo de ordem maior que 1.

**TABELA 19:** Análise de variância para o estudo da recuperação de xilanase no planejamento fatorial completo  $2^3$  com 4 ensaios no ponto central.

| Efeitos   | QM      | F       | P      |
|-----------|---------|---------|--------|
| A         | 230,051 | 219,096 | 0,000* |
| B         | 29,261  | 27,868  | 0,013* |
| C         | 274,951 | 261,858 | 0,000* |
| AB        | 6,301   | 6,001   | 0,092  |
| AC        | 140,281 | 133,601 | 0,001* |
| BC        | 24,151  | 23,001  | 0,017* |
| CURVATURA | 14,884  | 14,175  | 0,032* |

$R^2 = 0,987$

A = Condutividade (mS/cm); B = Frequência de Pulsação das Campânulas (pulso/seg.); C = Razão entre as Fases Aquosa/Orgânica; QM = Média Quadrática

\* Significativos ao nível de 95% de confiança

Em função deste modelo de primeira ordem foi definido um outro modelo, agora de segunda ordem, por meio de uma regressão não linear. Para isso foi realizado um novo planejamento com os pontos ascendentes das 3 variáveis significativas: condutividade da fase aquosa, frequência de pulsação das campânulas e razão entre as fases aquosa/orgânica. Os ensaios correspondentes aos pontos ascendentes foram realizados para determinar qual a região de melhor recuperação da xilanase. Foram realizados 16 experimentos dos quais 8 representam o fatorial completo, 4 experimentos no ponto central e 6 ensaios correspondentes ao planejamento de face centrada. A TABELA 20 representa a matriz utilizada nesse planejamento e os resultados estatísticos desse estudo encontram-se no APÊNDICE 1.

**TABELA 20:** Esquema da matriz do planejamento utilizada na extração de xilanase segundo um fatorial completo  $2^3$  rotacional com face centrada.

| Ensaio | Fatores |    |    | Rendimento em atividade(%) |
|--------|---------|----|----|----------------------------|
|        | A       | B  | C  |                            |
| 1      | -1      | -1 | -1 | 28,2                       |
| 2      | 1       | -1 | -1 | 12,9                       |
| 3      | -1      | 1  | -1 | 32,7                       |
| 4      | 1       | 1  | -1 | 35,1                       |
| 5      | -1      | -1 | 1  | 16,8                       |
| 6      | 1       | -1 | 1  | 2,7                        |
| 7      | -1      | 1  | 1  | 20,8                       |
| 8      | 1       | 1  | 1  | 6,3                        |
| 9      | -1      | 0  | 0  | 9,1                        |
| 10     | 1       | 0  | 0  | 3,3                        |
| 11     | 0       | -1 | 0  | 7,3                        |
| 12     | 0       | 1  | 0  | 5,0                        |
| 13     | 0       | 0  | -1 | 43,5                       |
| 14     | 0       | 0  | 1  | 10,5                       |
| 15     | 0       | 0  | 0  | 9,4                        |
| 16     | 0       | 0  | 0  | 11,8                       |
| 17     | 0       | 0  | 0  | 16,8                       |
| 18     | 0       | 0  | 0  | 12,6                       |

A = Condutividade (mS/cm): (-1 = 7,5; 0 = 10,0; 1 = 12,5)

B = Frequência de Pulsação: (pulso/seg.) (-1 = 1:1; 0 = 1:2; 1 = 1:3)

C = Razão entre as Fases Aquosa/Orgânica: (-1 = 0,5 ; 0 = 1,0; 1 = 1,5)

Com esse novo planejamento conseguiu-se aumentar em 27,2% o rendimento em atividade de xilanase, alcançando um valor máximo de 43,5%.

Observa-se também que há uma diferença nos valores de rendimento em atividade nos pontos centrais, ou seja, nos ensaios de 15 a 18. Pode ser que o resultado do ensaio 17, esteja apresentando uma variação além do esperado para o cálculo do rendimento em atividade, pois a variação dos outros 3 ensaios não ultrapassaram a 7%.

Ao analisar estatisticamente os resultados da TABELA 21, constata-se que são significativos os efeitos das variáveis principais A e C, e da interação quadrática  $C^2$ , ou seja, a condutividade da fase aquosa e a razão entre as fases, e o termo quadrático da razão entre as fases.

**TABELA 21:** Efeitos estimados, valores do teste t de "Student" e erros - padrão obtidos no planejamento fatorial completo  $2^3$  rotacional com face centrada.

| Efeitos e interações | Estimativas | Erros-Padrão | t       |
|----------------------|-------------|--------------|---------|
| Média                | 11,624      | +/- 2,233    | -       |
| A                    | -9,460      | +/-3,589     | -2,636* |
| B                    | 6,400       | +/-3,589     | 1,783   |
| C                    | -19,060     | +/-3,589     | -5,310* |
| AB                   | 4,325       | +/-4,013     | 1,078   |
| AC                   | -3,925      | +/-4,013     | -0,978  |
| BC                   | -4,775      | +/-4,013     | -1,189  |
| AA                   | -8,795      | +/-6,895     | -1,276  |
| BB                   | -8,895      | +/-6,895     | -1,290  |
| CC                   | 32,805      | +/-6,895     | 4,758*  |

A = Condutividade (mS/cm); B = Frequência de Pulsação (pulso/seg.); C = Razão entre as Fases aquosa/Orgânica

\* Significativos ( $t_{8, 0,95} = 2,306$ )

A partir das variáveis significativas e desprezando-se as não significativas, foi feita uma análise do coeficiente de determinação do modelo  $R^2 = 0,73$ , revelando que, este modelo, pode representar o processo de extração líquido - líquido de xilanase por micela reversa, utilizando uma microcoluna com campânulas pulsadas. Os resultados estatísticos deste estudo se encontram na TABELA 22.

**TABELA 22:** Coeficiente de regressão, erros-padrão, teste t de "Student" e nível de significância para o modelo que representa o processo contínuo de extração líquido - líquido de xilanase por micela reversa, utilizando um planejamento fatorial  $2^3$  com face centrada.

| Fatores | Coeficiente | Erros - Padrão | t       | p       |
|---------|-------------|----------------|---------|---------|
| Média   | 9,413       | +/-2,387       | 3,943*  | 0,001** |
| A       | -4,730      | +/-2,135       | -2,215* | 0,044** |
| C       | -9,530      | +/-2,135       | -4,464* | 0,000** |
| $C^2$   | 11,538      | +/-2,135       | 3,603*  | 0,003** |

$R^2 = 0,73$

\* Significativos ( $t_{14, 0,95} = 2,145$ )

\*\* Significativos ao nível de 95% de confiança

O modelo matemático para representar o processo, considerando os termos que influenciam o processo de extração, pode ser expresso pela Equação 5.3.1:

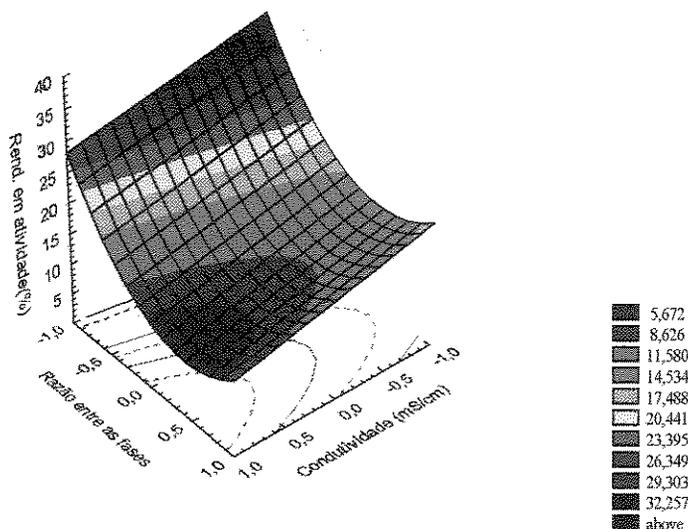
$$Y = 9,413 - 4,73 A - 9,53 C + 11,538 C^2 \quad (5.3.1)$$

Sendo que  $Y$  representa o rendimento em atividade da xilanase,  $A$  representa a

condutividade da fase aquosa e  $C$  a razão entre as fases.

Dessa forma, obteve-se melhores resultados de recuperação quando se utilizou os valores de condutividade de 10 mS/cm e razão entre as fases de 0,5. Nestas condições, o rendimento máximo estimado pelo modelo é de 30,5%.

As curvas de nível e a superfície de resposta do modelo estão representadas na FIGURA 13. É possível observar que na superfície de resposta o rendimento máximo obtido neste modelo é de 36%.



**FIGURA 13:** Superfície de resposta e curvas de nível descrita pelo modelo da equação 5.3.1, que representa a extração de xilanase por micela reversa utilizando uma microcoluna com campânulas pulsadas e o extrato enzimático bruto.

A fim de comparar o valor obtido experimentalmente, foi realizada uma nova extração nas condições definidas pelo modelo, que foram: condutividade da fase aquosa 10 mS/cm e razão entre as fases aquosa/orgânica de 0,5. Obteve-se uma recuperação de 40,5% de xilanase para o interior da micela reversa e um fator de enriquecimento de 1,3

vezes. O rendimento previsto variou em função do experimental em 12,5%, estando o mesmo dentro dos valores esperados.

Para essas condições foi calculado o valor de  $W_o$ , pois este parâmetro determina a quantidade de água solubilizada na micela reversa, através da relação molar entre a água e o tensoativo utilizado. O valor de  $W_o$  é de extrema importância nos sistemas de micelas reversas porque é possível saber o tamanho da micela e o número de moléculas de tensoativos por micela. Além disso, como o bioproduto deve ficar no interior da micela, é importante que a água contida tenha uma composição próxima à da solução aquosa, e, para que isto ocorra, é interessante que a quantidade de água solubilizada seja alta (CASTRO *et al.*, 1988; PIRES *et al.*, 1996). O valor obtido para o  $W_o$  nessas condições foi de 63,1, o que corresponde a um raio micelar de 9,4 nm, indicando com este valor que a micela era grande o suficiente para englobar a proteína. Desta maneira pode-se supor que  $W_o$  não influenciou a extração.

#### **5.4 Estudos Experimentais da Extração de Xilanase por Micela Reversa em Processo Contínuo**

O estudo da extração da xilanase foi realizado a fim de analisar o comportamento da extração líquido - líquido durante o tempo de operação da microcoluna.

O uso de microcolunas com campânulas pulsadas foi estudado por RABELO (1999) e MORO (1999) para a extração de citocromo b5 e tripsina, respectivamente, sendo que RABELO (1999) utilizou o sistema de duas fases aquosas e MORO (1999) o sistema de micelas reversas. Contudo, a utilização da xilanase com este tipo de equipamento não foi ainda descrito na literatura, o que motivou as investigações no sentido de caracterizar hidrodinamicamente este sistema neste tipo de microcoluna e avaliar o processo de extração contínuo de enzimas.

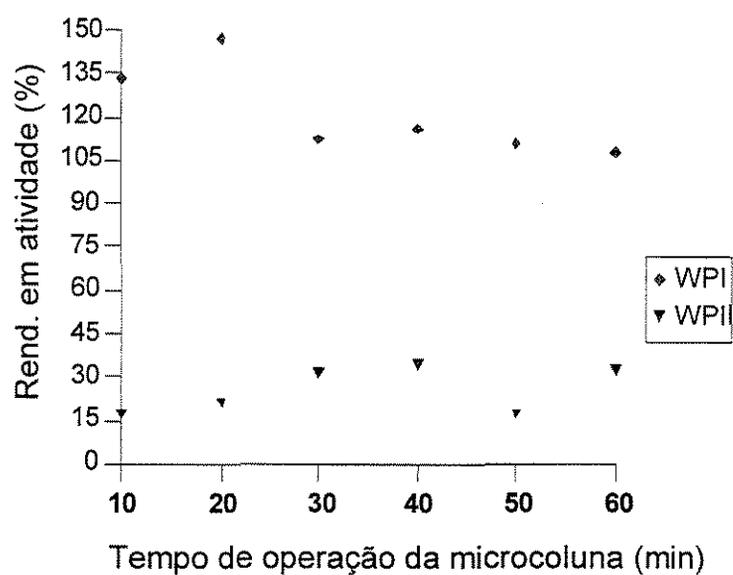
A transferência da xilanase do extrato enzimático para a fase micelar foi estudada analisando-se o efeito da condutividade da fase aquosa, frequência de pulsação das campânulas e razão entre as fases aquosa/orgânica no rendimento em atividade. Estes

parâmetros constituem fatores determinantes para a transferência da enzima e desempenho do equipamento para possível utilização em larga escala. Os ensaios foram realizados nas seguintes condições: pH 7,0 em tampão fosfato de sódio 0,01M e fase orgânica 0,2M BDBAC em 92,5% isooctano e 7,5% hexanol, e reextração no pH 5,5 em tampão acetato de sódio 1M, adicionado de 0,5M NaCl.

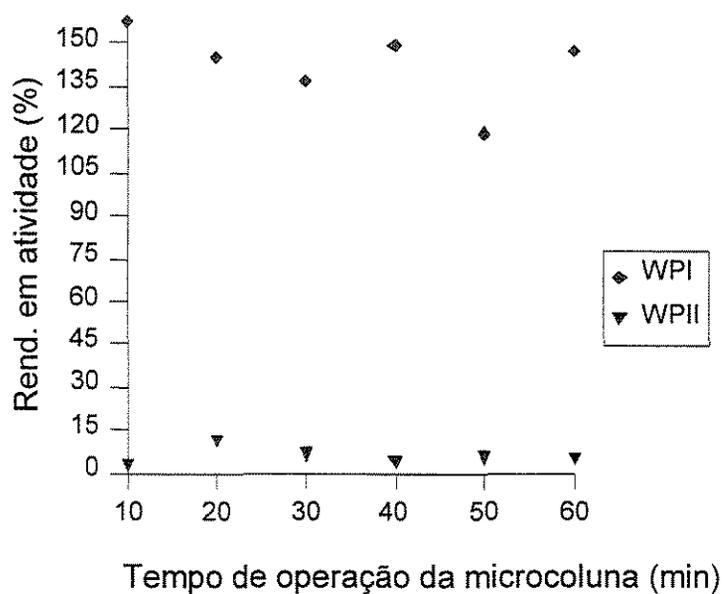
Os dados apresentados nas FIGURAS 14 a 17 demonstram que o rendimento em atividade é superior a 100% em todos os ensaios estudados, e isso pode ser explicado pelo aumento da atividade enzimática que, muitas vezes pode ocorrer, pois as micelas reversas podem retirar algum tipo de inibidor da fase aquosa levando para o interior micelar, fazendo então que ocorra um aumento da atividade na fase externa. Resultados similares foram obtidos por RODRIGUES (1997). Além disso, estes valores podem indicar que as condições operacionais estão muito próximas ao equilíbrio e que, com isso, podemos considerar a operação da coluna como sendo um estágio único de extração.

Pode-se também observar que, em relação ao tempo, o rendimento em atividade na fase aquosa ( $WP_I$ ) apresenta uma queda entre 20 e 30 minutos e com o passar do tempo mantêm-se aproximadamente constante. Em relação a fase aquosa, depois da reextração ( $WP_{II}$ ), é possível notar que a recuperação fica constante ao longo do ensaio, alcançando um máximo entre 40 e 50 minutos de operação. Entretanto, considerou-se interessante observar o comportamento do sistema por um período de tempo maior para se verificar a possibilidade de ocorrer a desnaturação.

Outro fator importante que pode ser observado é o efeito da condutividade da fase aquosa sobre a recuperação em atividade, pois quando se trabalhou em valores menores, constatou-se melhores resultados de recuperação em  $WP_{II}$ , independente da razão entre as fases e da frequência de pulsação utilizada. Isso pode ser explicado pela forte influência da força iônica sobre as micelas reversas, pois é conhecido que, quanto maior a força iônica menor será a micela reversa formada (CABRAL, AIRES-BARROS, 1993).

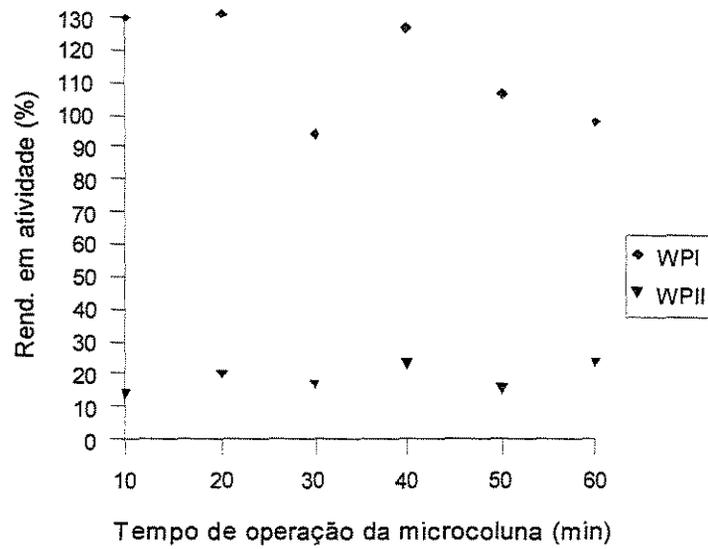


(A)

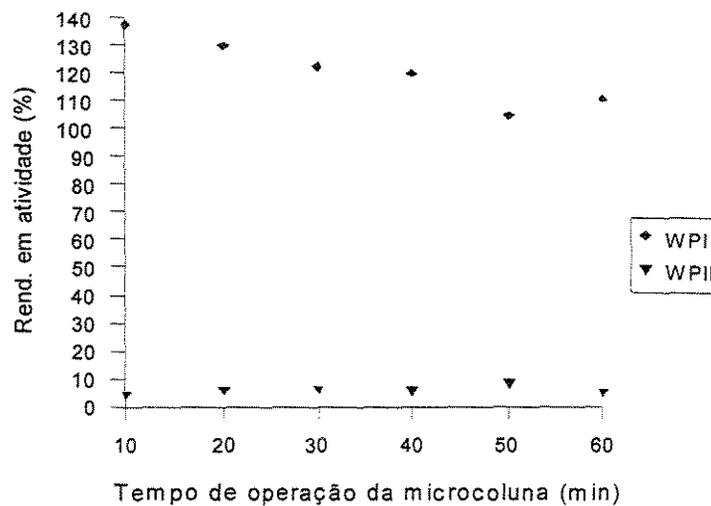


(B)

**FIGURA 14:** Comportamento da extração da xilanase na fase aquosa ( $WP_I$ ) e fase aquosa depois da reextração ( $WP_{II}$ ) durante o tempo de operação da microcoluna. Condições: Frequência de pulsação: 0,33 pulso/seg e Razão entre as fases: 1. Condutividade: (A) 10 mS/cm e (B) 15 mS/cm.

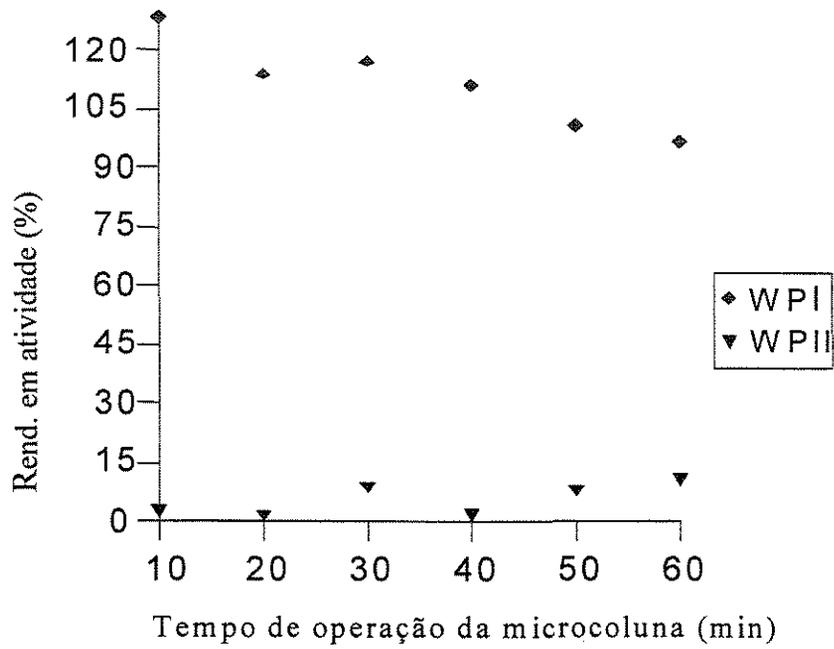


(A)

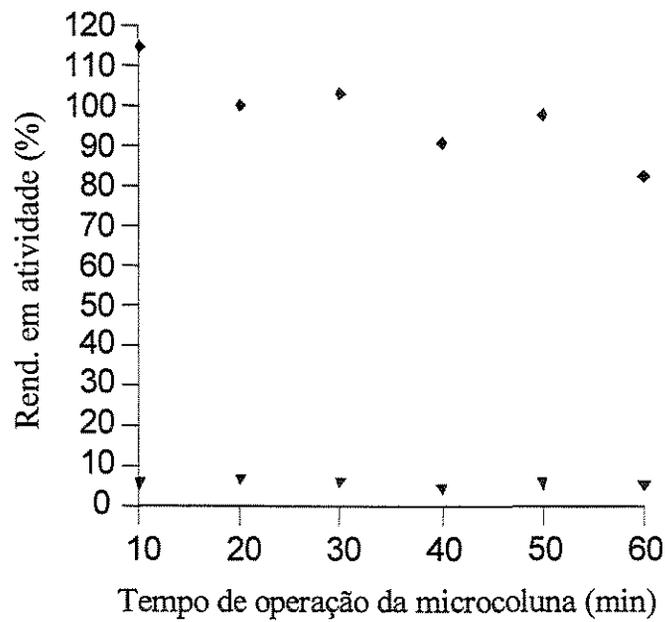


(B)

**FIGURA 15:** Comportamento da extração da xilanase na fase aquosa ( $WP_I$ ) e fase aquosa depois da reextração ( $WP_{II}$ ) durante o tempo de operação da microcoluna. Condições: Frequência de pulsação: 0,13 pulso/seg e Razão entre as fases: 2. Condutividade: (A) 10 mS/cm e (B) 15 mS/cm.

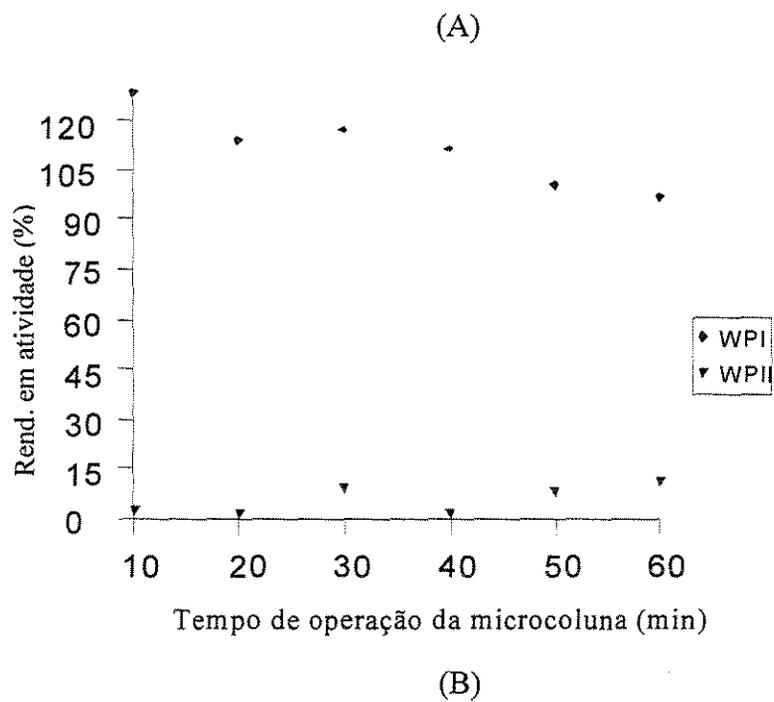
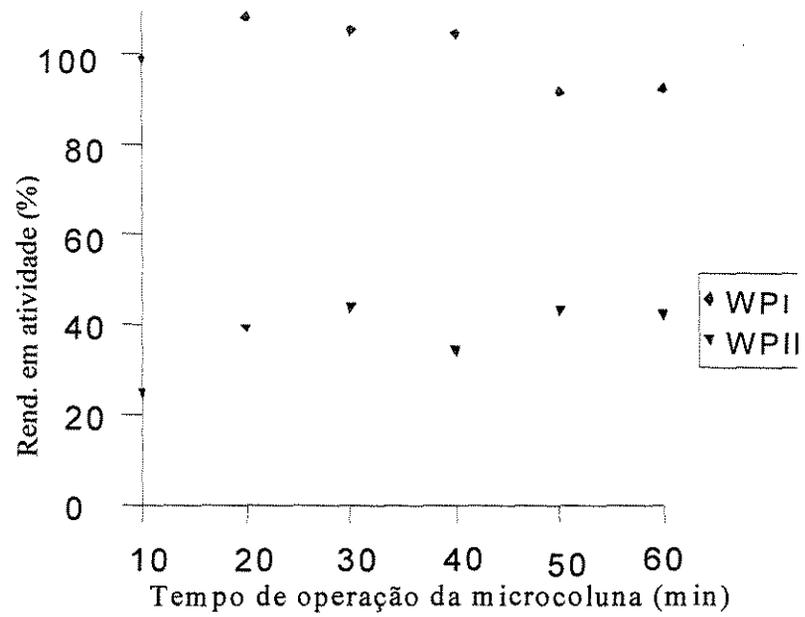


(A)



(B)

**FIGURA 16:** Comportamento da extração da xilanase na fase aquosa ( $WP_I$ ) e fase aquosa depois da reextração ( $WP_{II}$ ) durante o tempo de operação da microcoluna. Condições: Condutividade: 12,5 mS/cm e Frequência de pulsação: 0,33 pulso/seg. Razão entre as fases: (A) 0,5 e (B) 1,5.



**FIGURA 17:** Comportamento da extração da xilanase na fase aquosa ( $WP_I$ ) e fase aquosa depois da reextração ( $WP_{II}$ ) durante o tempo de operação da microcoluna. Condições: Condutividade: 10 mS/cm e Frequência de pulsação: 0,5 pulso/seg. Razão entre as fases: (A) 0,5 e (B) 1,5.

### **5.5 Efeito da Frequência de Pulsação das Campânulas sobre a Fração de Retenção da Fase Dispersa e sobre o Rendimento em Atividade**

Um dos parâmetros importantes para caracterização hidrodinâmica de um equipamento de extração consiste na fração retida de uma das fases, que está disponível para a transferência de massa dentro do equipamento, ou seja, o “hold-up”. Neste trabalho, o “hold-up” se refere a fração retida da fase micelar. Significa, portanto, o percentual da fase rica em solução micelar presente no equipamento capaz de extrair a xilanase do caldo fermentado. Tais medidas da fração de retenção da fase dispersa são informações valiosas para a estimativa da qualidade de transferência de massa de uma unidade de extração sob condições predefinidas, já que o desempenho de uma medida de extração em processo contínuo é altamente dependente da quantidade de solvente que está presente no equipamento para remover o soluto da alimentação (COIMBRA, 1995).

O “hold-up” é um parâmetro que depende do equipamento selecionado, das condições operacionais empregadas e das propriedades físicas das fases.

A fração retida da fase dispersa está diretamente relacionada com a quantidade de gotas existentes no interior da coluna, para uma dada condição operacional. A formação de gotas não é um processo simples e está diretamente ligada às condições de agitação, isto é, à frequência de pulsação imposta às fases no interior do equipamento (SOUZA, 1997).

Nos últimos anos, novos tipos de equipamentos de extração têm sido desenvolvidos para se obter uma melhor flexibilidade operacional, entre as quais se destacam as colunas com elementos pulsantes, no caso as campânulas, já que nestes tipos de extração o contato entre as duas fases depende primeiramente da velocidade de pulsação. O ajuste dessa variável pode atingir as condições mais favoráveis num processo de extração.

A manifestação da agitação se reflete na formação de gotas da fase dispersa que são contactadas com as da fase contínua. Sabe-se também que o mecanismo de geração de gotas depende, dentre outros fatores, da passagem do líquido através dos orifícios dos pratos, ou neste caso, dos orifícios da rede que forma a campânula (RABELO, 1999).

A influência da frequência de pulsação das campânulas na fração retida da fase dispersa foi avaliada em uma microcoluna através da operação em contínuo com sistema de micelas reversas, utilizando os seguintes valores de frequência de pulsação: 1, 0,5, 0,33 e

0,13 pulsos/segundo. Os experimentos foram realizados com o extrato enzimático bruto contendo a xilanase, utilizando-se uma solução orgânica de 0,2M BDBAC em 92,5% isoocatano e 7,5% de hexanol, e uma fase aquosa pH 7,0 em 0,01 M de tampão fosfato de sódio. A vazão total de alimentação ( $V_d+V_c$ ) utilizada foi de 3,9, 4,4 e 5,7 mL/min.

Neste trabalho, a transferência da energia de pulsação às fases líquidas é realizada por meio do movimento alternativo das campânulas no interior da microcoluna. A transferência da agitação se reflete na formação de gotas da fase dispersa que estão em contato com as da fase contínua.

A natureza do escoamento das fases através das campânulas é bastante complexa, pois além de ser utilizado o fluxo em contracorrente, deve-se considerar o movimento das campânulas em relação ao líquido. A combinação das forças associadas ao movimento do dispositivo de pulsação e ao escoamento das fases forçam a passagem do líquido através dos orifícios das campânulas. No momento em que os líquidos atravessam as campânulas, ocorre uma intensa dispersão na microcoluna.

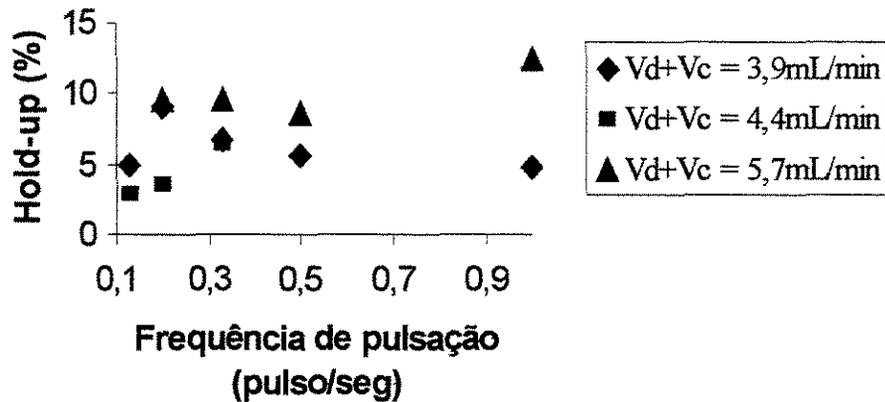
De acordo com a literatura, verifica-se uma tendência de aumento da fração de retenção da fase dispersa com o aumento da frequência de pulsação, ou seja, da agitação imposta ao sistema. Esse comportamento foi observado em trabalhos realizados em colunas de pratos ou fluxo pulsados (GOIS, 1995), além de outros tipos de colunas de discos rotativos e discos perfurados rotativos (SARUBBO, 2000; PORTO, 1998) e também campânulas pulsadas (RABELO, 1999; MORO, 1999).

Os dados apresentados na FIGURA 18 demonstram que não é possível afirmar nenhuma influência da frequência de pulsação em relação a fração de retenção da fase dispersa, pois não observamos nenhuma tendência nos resultados apresentados.

Em trabalho realizado por COIMBRA *et al.* (1994) utilizando sistema de duas fases aquosas PEG - sais de fosfato com extrator Graesser para a separação de proteína do soro de queijo, observou-se também uma independência da fração retida da fase dispersa em relação à velocidade de rotação.

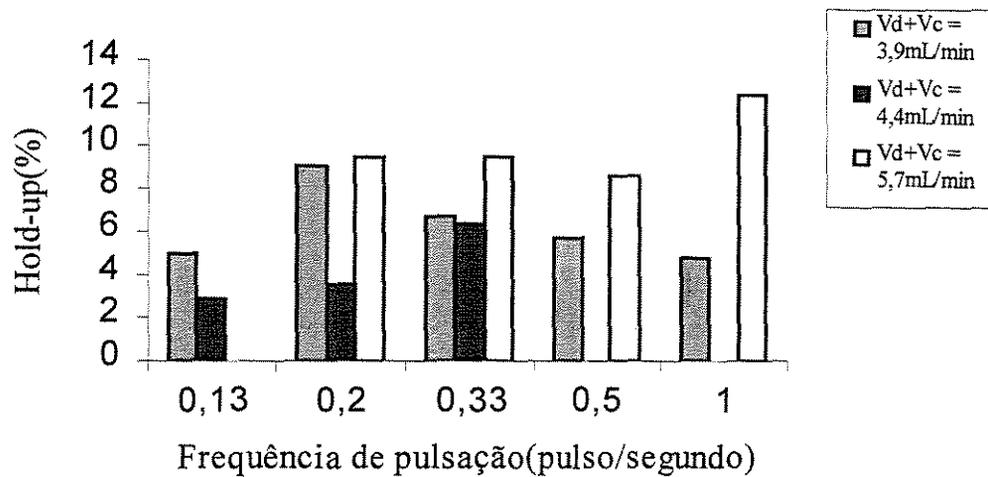
Entretanto, pode-se observar que, quando a vazão total de alimentação utilizada é maior, obtém-se um aumento da fração da retenção da fase dispersa. Isso ocorre principalmente porque a elevação da vazão total de alimentação faz com que cresça a turbulência no interior da microcoluna e, assim, aumente também a mistura das fases. Com

isso, o tempo de residência das gotas da fase dispersa na microcoluna é maior e, conseqüentemente, a fração de retenção da fase dispersa aumenta também.



**FIGURA 18:** Influência da frequência de pulsação das campânulas na fração de retenção da fase dispersa (“Hold-up”).

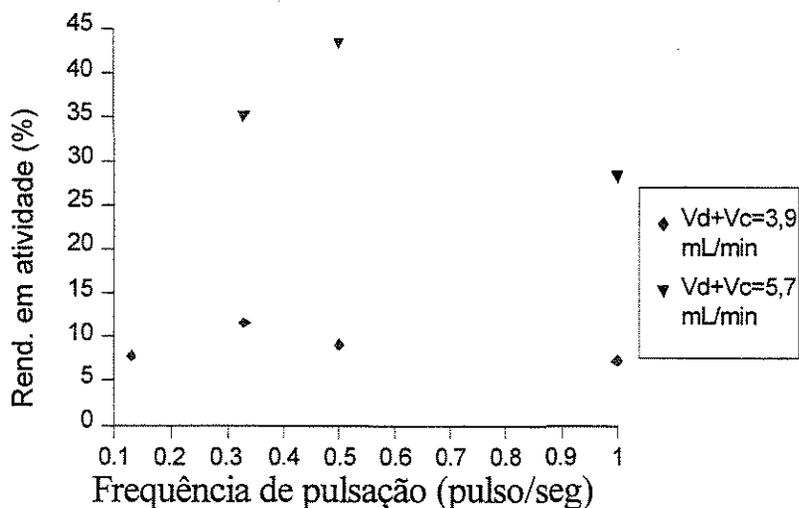
Devido ao aumento da vazão total das fases (carga líquida) na coluna, ocorre uma maior turbulência e mistura das fases. Além disso, a velocidade de escoamento das fases na coluna é maior. Assim, tendo em vista esses fatores, pode-se observar que o aumento da vazão total das fases faz com que a fração de retenção da fase dispersa aumente, fato este observado mais claramente na FIGURA 19.



**FIGURA 19:** Comportamento do sistema micelar em relação à fração de retenção da fase dispersa nas condições experimentais estudadas.

A frequência de pulsação das campânulas também influencia o rendimento em atividade, como pode ser observado na FIGURA 20, onde nota-se que para frequências de pulsação maiores temos uma diminuição no rendimento em atividade.

Em relação a vazão total alimentada, observamos a mesma influência encontrada para a fração de retenção da fase dispersa, ou seja, obtemos melhores valores quando as vazões são maiores.



**FIGURA 20:** Influência da frequência de pulsação das campânulas no rendimento em atividade.

### 5.6 Análise da Velocidade Característica no Sistema de Extração Líquido - Líquido por Micela Reversa em Processo Contínuo

Para o cálculo da velocidade característica ( $V_0$ ), optou-se por utilizar a equação de GAYLER *et al.* (1953), por esta ser simples e não ter sido encontrado nenhuma restrição ao seu uso.

As velocidades de escoamento ( $v_C$  e  $v_D$ ), foram obtidas dividindo-se a vazão das fases ( $\text{cm}^3/\text{min}$ ) pela área da seção transversal da coluna ( $A$ ), em  $\text{cm}^2$ , que é dada pela equação 5.6.1, apresentada a seguir:

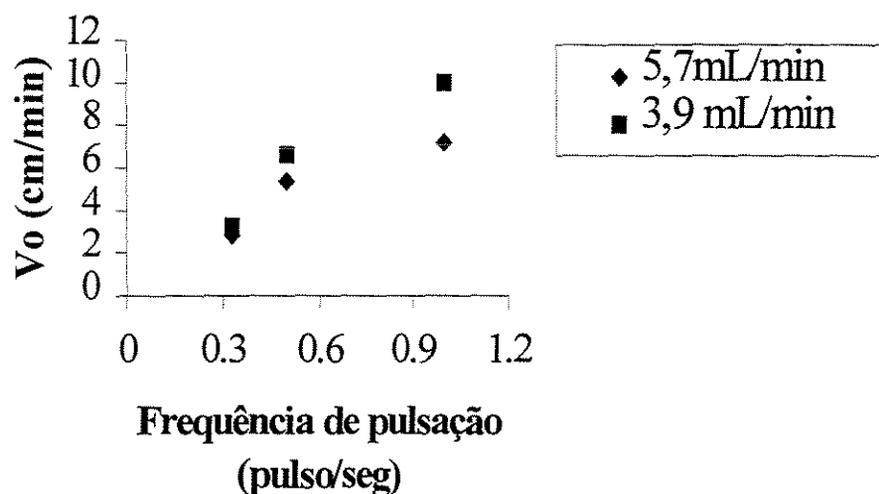
$$A = (\pi d^2) / 4 \quad (5.6.1)$$

Sendo que  $d$  é o diâmetro da microcoluna.

Neste trabalho, a área da seção transversal da coluna é  $5,07 \text{ cm}^2$ .

Utilizando-se os valores das velocidades de escoamento ( $v_C$  e  $v_D$ ) encontrados e os valores experimentais da fração de retenção da fase dispersa ( $\phi$ ), determina-se a velocidade característica ( $V_o$ ) para cada experimento através da equação proposta por GAYLER *et al.*(1953).

Deve-se ressaltar que, de acordo com a literatura, a equação de GAYLER *et al.*(1953) prediz satisfatoriamente os valores da velocidade característica para os casos em que a fração de retenção da fase dispersa seja menor do que 0,20, o que no caso desses experimentos acontece.



**FIGURA 21:** Influência da freqüência de pulsação das campânulas e da vazão total das fases sobre a velocidade característica ( $V_o$ ).

Ao observar a FIGURA 21, onde temos a  $V_0$  em função da frequência de pulsação, constata-se que, aumentando a frequência de pulsação das campânulas há um aumento da velocidade característica.

Analisando a influência da  $V_0$  sobre o rendimento em atividade (FIGURA 22), observa-se um maior rendimento em atividade com o aumento da  $V_0$ . Isto ocorre pelo aumento de solvente na microcoluna, pois quanto maior a quantidade de solvente presente no equipamento para remover o soluto da alimentação, maior será o aumento no rendimento em atividade.

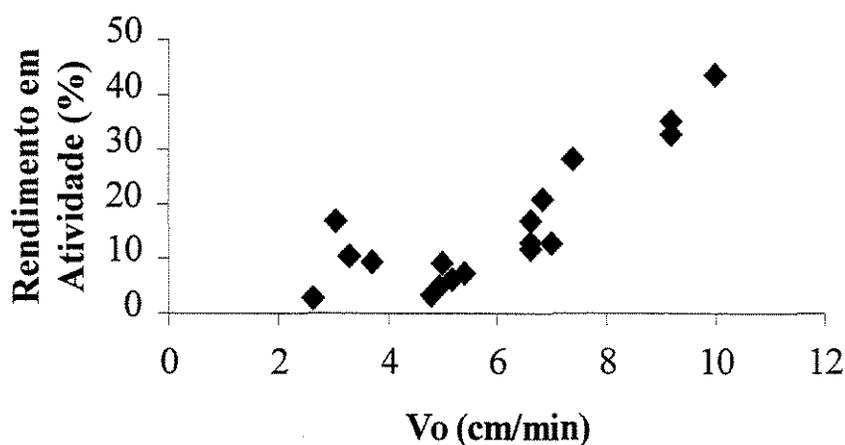


FIGURA 22: Influência da velocidade característica ( $V_0$ ) sobre o rendimento em atividade.

### 5.7 Comportamento do Rendimento em Atividade em Relação aos Grupos Adimensionais

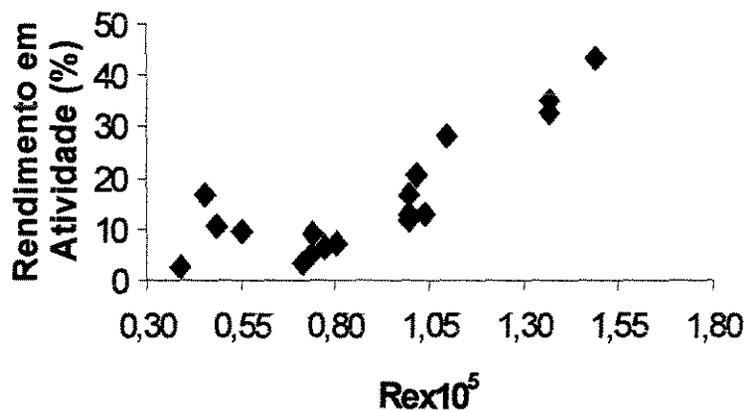
O estudo de modelagem envolve a aplicação da técnica da análise dimensional, onde são determinados os grupos adimensionais, com conhecido significado físico, para

que seja estabelecida a correlação desejada.

No conjunto de grupos adimensionais determinados, devem estar envolvidos os parâmetros que possam influenciar no comportamento relacionado com o rendimento em atividade no interior da microcoluna.

O presente capítulo tem como objetivo a separação das variáveis adimensionais que influenciam o rendimento em atividade, a partir dos dados operacionais e geométricos obtidos experimentalmente através dos ensaios realizados na microcoluna estudada.

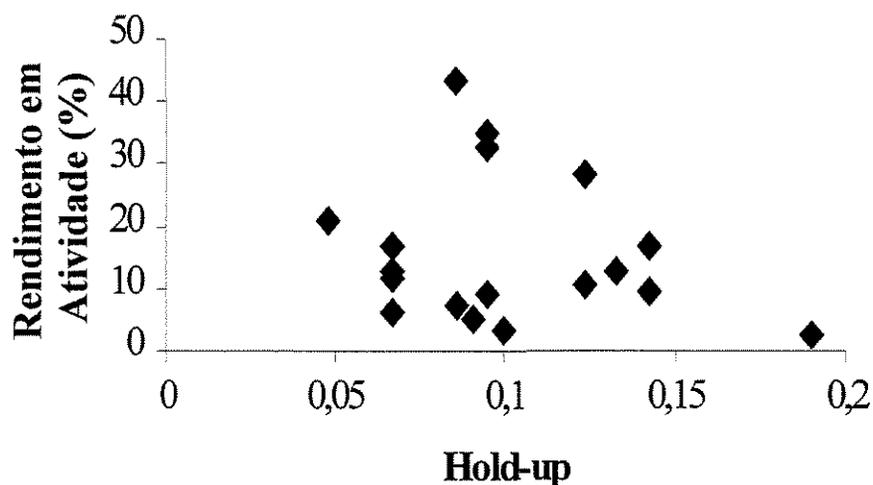
As variáveis adimensionais estudadas foram o número de Reynolds ( $Re$ ) e a fração de retenção da fase dispersa ( $\phi$ ). As medidas de  $\phi$  são informações valiosas para a estimativa da quantidade de transferência de massa em uma extração, já que o desempenho do processo contínuo é altamente dependente da quantidade de solvente que está presente no equipamento para remover o soluto da alimentação. Através da FIGURA 23, pode-se observar que há um aumento do rendimento em atividade em função do aumento do  $Re$ , e isso ocorre devido a uma maior quantidade de solvente presente na microcoluna. Nota-se também que o regime de escoamento presente na microcoluna é turbulento, pois  $Re$  é maior que 2500.



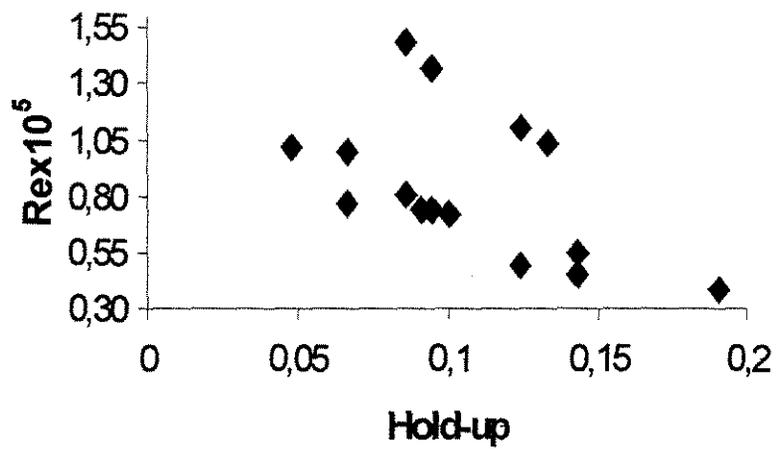
**FIGURA 23:** Influência do número de Reynolds ( $Re$ ) sobre o rendimento em atividade.

Já em relação a fração de retenção da fase dispersa (FIGURA 24), não temos um perfil definido em relação ao rendimento em atividade, entretanto, deve-se lembrar que o cálculo da fração de retenção da fase dispersa pode apresentar um erro em torno de 30%, devido a imprecisão do volume, pois como é calculado pelo esvaziamento da microcoluna e medido em proveta volumétrica, pode ocorrer perdas da fase dispersa.

Analisando por sua vez a influência da fração de retenção da fase dispersa sobre o  $Re$ , constata-se, através da FIGURA 25, que o  $Re$  diminui com o aumento da fração de retenção da fase dispersa. Pode ser que, com este aumento, possa ocorrer uma inundação na microcoluna, pela presença de um volume maior de solvente no sistema.



**FIGURA 24:** Influência da fração de retenção da fase dispersa (Hold-up) sobre o rendimento em atividade.



**FIGURA 25:** Influência da fração de retenção da fase dispersa (Hold-up) sobre o número de Reynolds (Re).

## 6. CONCLUSÕES

No presente estudo foi proposto a utilização de uma microcoluna com campânulas pulsadas para a extração líquido - líquido da xilanase utilizando micela reversa.

Com base nos resultados experimentais obtidos, dentro da faixa de operação trabalhada, podemos concluir que:

- 1- É necessário trabalhar com uma fase aquosa de menor força iônica, para se obter melhor rendimento em atividade.
- 2- Não houve reprodutibilidade dos resultados em batelada no processo contínuo.
- 3- A utilização da microcoluna com campânulas pulsadas resultou em altos valores de rendimento em atividade, sem perdas de atividade xilanolítica.
- 4- O máximo rendimento em atividade da xilanase, usando a enzima pura na microcoluna de campânulas pulsadas, foi de 140%, obtida nas condições: condutividade na fase aquosa de 7,5mS/cm e razão entre as fases aquosa/orgânica de 0,6.
- 5- O máximo rendimento em atividade da xilanase, usando o extrato enzimático bruto na microcoluna de campânulas pulsadas, foi de 43%, obtida nas condições: condutividade na fase aquosa de 10mS/cm e razão entre as fases aquosa/orgânica de 0,5.
- 6- A metodologia estatística empregada no trabalho foi de extrema importância, pois determinou quais foram as variáveis significativas no processo de extração e suas interações, além de determinar os modelos matemáticos que representam o processo de

---

extração líquido - líquido de xilanase por micela reversa numa microcoluna de campânulas pulsadas nas condições otimizadas.

- 7- Aplicando-se as melhores condições previstas pelo modelo, pode-se sugerir que as dimensões das micelas reversas foram suficientes para acomodar a enzima.
- 8- No estudo da influência da frequência de pulsação das campânulas sobre a fração de retenção da fase dispersa (“hold-up”) foi observado que, nas condições estudadas não há nenhuma dependência entre elas.
- 9- No estudo da influência da frequência de pulsação das campânulas sobre a velocidade característica foi observado que, com o aumento da frequência de pulsação, há um aumento da velocidade característica.
- 10- No estudo da influência do número de Reynolds sobre o rendimento em atividade foi observado que, com o aumento do mesmo, maior é o rendimento em atividade.

## 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Uma vez que é difícil a obtenção de um trabalho totalmente completo, torna-se importante a apresentação de algumas sugestões que possam contribuir para aprofundar a caracterização do novo sistema. Assim, como continuação do trabalho efetuado, propõe-se:

- Desenvolver estudos de consumo e reciclagem dos reagentes, permitindo assim uma avaliação econômica para o processo nesse tipo de equipamento.
- Avaliar novas condições experimentais para a reextração, de modo a realizar continuamente, juntamente com a extração.
- Avaliar novos grupos adimensionais, que permita uma modelagem fenomenológica do processo, a partir de nova avaliação de parâmetros.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRES-BARROS, M.R., TAIPA, M.A., CABRAL, J.M.S. Isolation and purification of lipases. In WOOLEY, P., PETERSEN, S.B. (eds.). *Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application*. Cambridge University Press, G.B., 1994, p.243-270.
- AIRES-BARROS, M.R., CABRAL, J.M.S. Selective separation and purification of two lipases from *Chromobacterium viscosum* using AOT reversed micelles. *Biotechnology and Bioengineering*, v.38, p.1302-1307, 1991.
- ANDREWS, B.A., HAYWOOD, K. Effect of pH, ion type and ionic strength on partitioning of proteins in reverse micelle. *Journal Chromatography*. v.688, p.55-60, 1994.
- BAILEY, M.J, BIELY, P., POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, v.23, n.3, p.257-270, 1992.
- BARROS NETO, B., SCARMINIO, I.S., BRUNS, R.E. *Otimização e planejamento de experimentos*. Campinas: Editora da UNICAMP, 1995. 291p.
- BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnology*, v.3, p.286-290, 1985.
- BIELY, P., PULS, J., SCHNEIDER, H. Acetyl xylan esterases in fungal xylanolytic systems. *FEBS Letters*, v.186, p.80-84, 1985.
- BOLAND, J.M. Extraction of proteins from animal tissue using multiphase aqueous

---

systems. *Bioseparation*, v.1, p.293-304, 1990.

BOX, G.E.P., HUNTER, G.W., HUNTER, J.S. *Statistics for experimenters -an introduction to design, data analysis, and model building*. New York: John Wiley & Sons, 1978, 653p.

BRANDANI, V., DI GIACOMO, G., SPERA, L. Extraction of  $\alpha$ -amylase protein by reverse micelles. *Process Biochemistry*, v.28, p.411-414, 1993.

BRANDANI, V., DI GIACOMO, G., SPERA, L. Extraction of  $\alpha$ -amylase protein by reverse micelles: II effect of pH and ionic strength. *Process Biochemistry*, v.29, p.363-367, 1994.

BRICE, R.E., MORRISON, I.M. Effect of the addition of D-xylose on xylanase activity and digestibility of fibre in an artificial rumen. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.30, p.9-15, 1991.

CABRAL, J.M.S., AIRES-BARROS, M.R. Reversed micelles in liquid-liquid extraction. In *Recovery Process for Biological Materials*, p.247-271. KENNEDY, J.F. and CABRAL, J.M.S. (Eds.). John Wiley & Sons, U.K. 1993.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G., M.R., CABRAL, J. M. S., AIRES-BARROS. Studies on the extraction and back-extraction of a recombinant cutinase in a reversed micellar extraction process. *Biotechnology Engineering*, v.11, p.203-208, 1994a.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G., AIRES-BARROS, M.R., CABRAL, J. M. S., TAMBOURGI, E. B. Recovery of a recombinant cutinase with reversed micelles in a continuous perforated rotating disc contractor. *Biotechnology Techniques*, v.8, p.413-418, 1994b.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. *Separação e purificação de uma cutinase recombinante*

- utilizando sistemas micelares*. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior Técnico, 1995.181p. Tese (Doutorado)
- CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G., AIRES-BARROS, M.R., CABRAL, J. M. S., TAMBOURGI, E. B. Continuous extraction of a recombinant cutinase from *Escherichia coli* disrupted cells with reversed micelles using a perforated rotating disc contractor. *Bioprocess Engineering*, v.15, p.253-257, 1996.
- CASTRO, M.J.M., CABRAL, J.M.S. Reversed micelles in biotechnological process. *Biotechnology Advances*, v.8, p.151-167, 1988.
- COIMBRA, J.S. R., THOMMES, J., KULA, M.-R. Continuous separation of whey proteins with aqueous two-phase systems in a Graesser contactor. *Journal of Chromatography A*, v.668, p.85-94, 1994.
- COIMBRA, J. S. R. *Desempenho de um extrator tipo Graesser na separação de proteínas do soro de queijo usando sistemas aquosos bifásicos*. Campinas: UNICAMP, 1995. 129p. Tese (Doutorado)
- COUGHLAN, M.P., HAZLEWOOD, G.P.  $\beta$ -1,4-D-Xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v.17, p.259-289, 1993.
- CUROTTO, E., CONCHA, M., CAMPOS, V., MILAGRES, A.M.F., DURAN, N. Production of xylanases by *Penicillium janthinellum* - effect of selected growth conditions. *Applied Biotechnology and Biotechnology*, v.48, p.107-116, 1994.
- DEBEIRE-GOSSELIN, M., LOONIS, M., SAMAIN, E., DEBEIRE, P. Purification and properties of a 22 kDa endoxylanase excreted by a new strains of thermophilic *Bacillus*. In VISSER, J., BELDMAN, G., KUSTERS-van SOMEREN, M.A., VORAGEN, A.G.J. (eds.). *Xylans and Xylanases*. Amsterdam: Elsevier, 1992a. p. 463-466.

- DEBEIRE-GOSSELIN, M., LOONIS, M., SAMAIN, E., DEBEIRE, P. Isoxylanases from the thermophile *Clostridium thermolacticum*. In VISSER, J., BELDMAN, G., KUSTERS-van SOMEREN, M.A., VORAGEN, A.G. (eds.). *Xylans and Xylanases*. Amsterdam: Elsevier, 1992b. p.471-474.
- DEKKER, M., HILHORST, K., LAANE, C. Isolating enzymes by reversed micelles. *Analytical Biochemistry*, v.178, p.217-226, 1989.
- DEKKER, M., VAN'T RIET, K., BALTSSESEN, J. W. A., BISJSTERBOCH, B.H., HILHORST, K., LAANE, C. Reversed micellar extraction of enzymes: investigations on the distribution behaviour and extraction efficiency of  $\alpha$ -amylase. In EUROPEAN CONGRESS BIOTECHNOLOGY, 4, Amsterdam, 1987. *Proceedings*, v.2. p.507-510.
- DEKKER, M., VAN'T RIET, K., WEIJERS, S.R., BALTSSESEN, J. W. A., BISJSTERBOCH, B.H., HILHORST, K., LAANE, C. Enzyme recovery by liquid-liquid extraction using reversed micelles. *Chemistry Engineering Journal*, v.33, p.B27-B33, 1986.
- DEKKER, R.F.H., RICHARDS, G.N. Hemicellulase: their occurrence, purification, properties, and mode of action. *Advances Carbohydrate Chemistry Biochemistry*, v.32, p.277-352, 1976.
- DELL, F.R., PRATT, H.R.C. Liquid-liquid extraction: Part I – Flooding rates for packed columns. *Trans. Inst. Chemical Engineering*, v.29, p.89-109, 1951.
- DUNGAN, S.R., BAUSCH, T., HATTON, T.A., PLUCINSKI, P., NITSCH, W. Interface transport process in the reversed micellar extraction of proteins. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.145, n.1, p.33-50, 1991.
- ERICKSSON, K.E.L. Biotechnology in the pulp and paper industry. *Wood Science and Technology*, v.24, p.79-101, 1990.

- GAYLER, R., ROBERTS, N.W., PRATT, H.R.C. Liquid-liquid extraction: Part IV - A further study of hold-up in packed columns. *Trans. Inst. Chemical Engineering*, v.31, p.57-68, 1953.
- GILBERT, M., BREU, C., YAGUCHI, M., SADDLER, J.N. Purification and characterization of a xylanase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.34/35, p.247-259, 1992.
- GOIS, L.M.N. *Estudo e desenvolvimento de um extrator de pratos perfurados pulsantes*. Campinas: UNICAMP, 1995. p. Tese (Doutorado)
- GOKLEN, K.E. *Liquid-liquid extraction of biopolymers: seletive solubilization of proteins in reverse micelles*. MIT: USA, 1986. Tese (Doutorado)
- GOKLEN, K.E., HATTON, T.A. Liquid-liquid extraction of protein using reverse micelles. In *Proceedings, ISEC'86, Munich, 3, 1986*, p.587-585.
- HALTRICH, D., NIDETZKY, B., KULBE, K.D., STEINER, W., ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanase. *Bioresource Technology*, v.58, p.137-161, 1996.
- HAN, D. H., LEE, S. Y., HONG, W. H. Separation of intracellular proteins from *Candida utilis* using reverse micelles in a spray column. *Biotechnology Technology*, v.8, p.105-110, 1994.
- HANSON, C. Recent research in solvent extraction. *Chemical Engineering*, v.9, p.135-142, 1968.
- HATTON, T.A. Reversed Micellar extraction of proteins. In: SCAMEHORN, J.F., HORWELL, J.H. (eds.). *Surfactant-Based Separation Process*. New York, 1989. v.33, p.55-90.

- HATTON, T.A. Extraction of proteins and amino acids using reversed micelles. In HINZE, W.L., ARMSTRONG, D.W. (Eds.). *ACS Symp. Series*, 342, 1987, p. 170-183.
- HEYBERGER, A. Hold-up and flooding in a vibrating plate extractor. *Col. Cze. Chem. Com.*, v.48, p.989-1000, 1983.
- HILHORST, R., SEGEEVA, M., HEERING, D., RIETVELD, P., FIJNEMAN, P., WOLBET, R.B.G., DEKKER, M., BIJSTERBOSH, B.H. Protein extraction from aqueous phase into a reversed micellar phase: effect of water content and reversed micellar composition. *Biotechnology and Bioengineering*, v.4, n.46, p.375-387, 1995.
- HUSTEDT, H., KORNER, K.-H., MENGE, U., KULA, M., -R. Recovery of protein using two-phase systems. *Trends in Biotechnology*, v.3, p.139-144, 1985.
- JOLIVALT, C., MINIER, M., RENON, H. Extraction of cytochrome C in sodium dodecylbenzenosulfonate microemulsions. *Biotechnology Progress*, v.9, p.456-461, 1993.
- JOSELEAU, J.P., COMTAT, J., RUEL, K. Chemical structure of xylans and their interaction in the plant cell walls. In VISSER, J., BELDMAN, G., KUSTERS-van SOMEREN, M.A., VORAGEN, A.G.J. (eds.). *Xylans and Xylanases*. Amsterdam: Elsevier, 1992. p.1-15.
- KADAM, K.I. Reversed micelles as a bioseparation tool. *Enzyme Microbiology and Technology*, v.8, p.266-273, 1986.
- KILIKIAN, B.V., BASTAZIN, M.R., NINAMI, N.M., GONÇALVES, E.M.R., JUNIOR, A.P. Liquid-liquid extraction by reversed micelles in biotechnological process. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.17, n.1, p.29-38, 2000.
- KREI, G.A., HUSTEDT, H. Extraktion von enzymen mittels reverser mizellen.

*Bioengineering*, v.3/4, p.32-41,1989.

KREI, G.A., HUSTED, H. Extraction of enzymes by reverse micelles. *Chemical Engineering Science*, v.47, p.99-111, 1992.

KREI, G.A., MEYER, U., BORNER, B., HUSTEDT, H. Extraction of  $\alpha$ -amylase using BDBAC reversed micelles. *Bioseparation*, v.5, p.175-183, 1995.

KUMAR, A., HARTLAND, S. Independent prediction of slip velocity and hold-up in liquid-liquid extraction columns. *Canadian Journal Chemical Engineering*, v. 67, p.17-25, 1989.

LEVASHOV, A.V., KHMELNITSKY, Y.L., KLYACHKO, N.L., MARTINEK, K. Reversed micellar enzymology. In MITTAL, K.L., LINDMAN, B. (Eds.). *Surfactants in solution*, Plenum Press, N.Y., v. 2, 1984, p.1069-1091.

LUISE, P.L., MAGID, L.J. Solubilization of enzymes and nucleic acids in hydrocarbon micellar solutions. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, v.20, n.4, p.409-474, 1986.

LUISE, P.L., GIOMINI, M., PILENI, M.P., ROBINSON, B.H. Reversed micelles as hosts for proteins and small molecules. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.947, p.209-246, 1988.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein Measurement with the Folin-Phenol-Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v.193, p.265-275, 1951.

MACKENZIE, C.R., BILOUS, D., SCHNEIDER, H., JOHNSON, K.G. Induction of cellulolytic and xylanolytic enzymes systems in *Streptomyces spp.* *Applied and Environmental Microbiology*, v.52, p.2835-2839, 1987.

- MEYER, U. *Extraktion von Enzymen Mittels Inverser Mizellen*. Braunschweig: Technische Universität Braunschweig, 1992. 58p. Tese (Graduação)
- MILAGRES, A.M.F. *Alguns aspectos da regulação de  $\beta$ -xilanases extracelulares de *Penicillium janthinellum**. Viçosa: UFV, 1988. 79p. Tese (Mestrado)
- MILAGRES, A.M.F., LACIS, L.S. Efficient screening of process variables in *Penicillium janthinellum* fermentation. *Biotechnology Letters*, v.13, n.2, p.113-118, 1991.
- MILAGRES, A.M.F., DURAN, N. Xylanolytic enzymes from *Penicillium janthinellum* and its applications in bleaching of pulp. *Progress Biotechnology*, v.7, p. 539-545, 1992.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v.31, p.426-428, 1959.
- MORO, J. R. *Extração de tripsina numa microcoluna agitada por campânula pulsadas*. Campinas: UNICAMP, 1999. 102 p. Tese (Mestrado)
- MULLER-HARVEY, I., HARTLEY, R.D., HARRIS, P.J., CURZON, E.H. Linkage of p-coumaryl and feruloyl groups to cells wall polysaccharides of barley straw. *Carbohydrate Research*, v.148, p.71-85, 1986.
- MUTSAERS, J.H.G.M. Xylanase in breadmaking. In VISSER, J., BELDMAN, G., KUSTERS-van SOMEREN, M.A., VORAGEN, A.G.J. (eds.). *Xylans and Xylanases*. Amsterdam: Elsevier, 1991. p.48.
- PIRES, M.J., CABRAL, J.M.S. Liquid-liquid extraction of a recombinant protein with a reversed micelle phase. *Biotechnology Progress*, v.9, p.647-650, 1993.
- PIRES, M.J., AIRES-BARROS, M.R., CABRAL, J.M.S. Liquid-liquid extraction of proteins with reversed micelles. *Biotechnology Progress*, v.12, p.290-301, 1996.

- PORTO, A.L.F. *Extração líquido - líquido de proteínas utilizando sistemas de duas fases aquosas em coluna de discos perfurados rotativos*. Campinas: UNICAMP, 1998. 97p. Tese (Doutorado)
- PULS, J., POUNTANEN, K. Mechanisms of enzymatic hydrolysis hemicelluloses (xylans) and procedures of determination of the enzyme activities involved. In COUGHLAN, M.P. (ed.). *Enzyme Systems for Lignocellulose Degradation*. London: Elsevier, 1989. p.151-165.
- PULS, J., POUNTANEN, K., SCHIMIDT, O., LINKO, M.  $\alpha$ -1,2-glucuronidase in the hydrolysis of hemicellulose. In INT. CONF. BIOTECHNOLOGY IN THE PULP AND PAPER INDUSTRY, 3, *Proceedings*. K.E.E. Ericksson, P. Ander (eds.). Stockholm: STFI, 1986. p.93-95.
- RABELO, A.P.B. *Estudo da eficiência de separação numa coluna de extração líquido - líquido mecanicamente agitada por paletas rotativas*. Campinas: UNICAMP, 1995. 165p. Tese (Mestrado)
- RABELO, A.P.B. *Estudo e desenvolvimento de uma microcoluna de campânulas pulsantes para a purificação de proteínas*. Campinas: UNICAMP, 1999. 213p. Tese (Doutorado)
- REILLY, P.J. Xylanases: structure and function. In HOLLAENDER, A.E. (ed.). *Trends in the Biology of Fermentation for Fuels and Chemicals*. New York: Plenum Press, 1981. p.111-129.
- RODRIGUES, E.M.G. *Extração líquido-líquido de xilanase por micela reversa*. Lorena: FAENQUIL, 1997. 90p. Tese (Mestrado)
- RODRIGUES, E.M.G., MILAGRES, A.M.F., PESSOA, Jr. A. Selective recovery of xylanase from *Penicillium janthinellum* using BDBAC reversed micelles. *Acta Biotechnology*, v.19, n.2, p.157-161, 1999.

- SARUBBO, L. A. *Caracterização de um novo sistema bifásico aquoso e aplicação em extração de proteínas com coluna de discos perfurados rotativos*. Campinas: UNICAMP, 2000. 174p. Tese (Doutorado)
- SOUZA, R.R. *Estudo e desenvolvimento de um extrator de palhetas rotativas*. Campinas: UNICAMP, 1997. 121p. Tese (Doutorado)
- SUNNA, A., ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, v.17, n.1, p.39-67, 1997.
- VAN der BROECK, H.C., DE GRAAF, L.L., HILLE, J.D.R., VAN OOYEN, A.J.J., VESSER, J., HARDER, A. Cloning and expression of fungal xylanase genes and use of the xylanase in bread making and in preparation of feed and paper products. *European Patent Applied*, v.90, p.202-220, 1990.
- VAN der VEEN, P., FLIPPHI, M.J.A., VORAGEN, A.G.J., VISSER, J. Induction of arabinases from *Aspergillus niger* on monomeric substrates. In VISSER, J., BELDMAN, G., KUSTERS-van SOMEREN, M.A., VORAGEN, A.G.J. (eds.). *Xylans and Xylanases*. Amsterdam: Elsevier, 1992. p. 497-500.
- VIKARI, L., KANTELINEN, A., SUNDQUIST, J., IZAKI, K. Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. *FEMS Microbiology Reviews*, v.13, p.335-350, 1994.
- VOGEL, H.J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (Medium N). *Microbial Genetics Bulletin*, v.13, p.42-43, 1956.
- WIELAND, G. Water determination by Karl Fisher titration: theory and applications. *Git Verlag*, 1987.
- WONG, K.K.Y., SADDLER, J.N. Applications of hemicellulases in the food, feed, and pulp and paper industries. In COUGHLAN, M.P., HAZLEWOOD, G.P. (eds.).

*Hemicelluloses and Hemicellulases*. London: Portland Press, 1993. p.127-143.

WONG, K.K.Y., TAN, L.U.L., SADDLER, J.N. Multiplicity of  $\beta$ -1,4-xylanase in microorganisms. *Functions, Properties and Applications Microbiology Reviews*, v.52, n.13, p. 305-317, 1988.

WOODWARD, J. Xylanases: functions, properties and applications. *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*, v.8, p.9-30, 1984.

## 9. ADENDO

Os resultados obtidos neste trabalho foram submetidos para publicação em revistas internacionais e apresentados em congressos nacionais e internacionais:

RODRIGUES, E.M.G., TAMBOURGI, E.B. Xylanase recovery using continuous extraction with reversed micelles – a statistical approach. *Journal of Chemical Engineering of Japan*. (in Press)

RODRIGUES, E.M.G., TAMBOURGI, E.B. Continuous extraction of xylanase from *Penicillium janthinellm* with reversed micelles using experimental design mathematical model. *Biotechnology Letters*, v.23, p.365-367, 2001.

RODRIGUES, E.M.G., TAMBOURGI, E.B. Xylanase recovery using continuous extraction with reversed micelles – a mathematical model using statistical design. IcheaP-5, The 5<sup>th</sup> Italian Conference on Chemical and Process Engineering, Florence – Italy, 20-23 may, 2001, p.1055-1060.

RODRIGUES, E.M.G., TAMBOURGI, E.B. Extração líquido - líquido de xilanase por micela reversa utilizando uma microcoluna pulsada. XIII COBEQ, Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Águas de São Pedro – São Paulo – Brasil, 24-27 setembro, 2000.

**JOURNAL OF CHEMICAL ENGINEERING OF JAPAN**

The Society of Chemical Engineers, Japan  
Georges Belfort, International Editor of the Americas  
Howard P. Isermann Department of Chemical Engineering  
Rensselaer Polytechnic Institute  
Troy, NY 12180-3590 USA  
[belfog@rpi.edu](mailto:belfog@rpi.edu)

Prof. dr. Elias Basile Tambourgi  
UNICAMP-FEQ-DESQ  
Caixa Postal 6066  
CEP 13083-970-Campinas-SP-Brasil  
email: [elias@desq.feq.unicamp.br](mailto:elias@desq.feq.unicamp.br)  
fax 55 19 37883946

May 31, 2001

Re: "Xylanase Recovery Using Continuous Extraction with Reversed Micelles - an Statistical Approach" by Aliana M.G. Rodrigues and Elias B. Tambourgi, MS#207-02

Dear Dr. Tambourgi:

I am very pleased to inform you that your manuscript listed above has been accepted for publication in the Journal Chemical Engineering of Japan. I have sent it directly to the Publishers in Japan for printing. When you receive the Galley Proofs, please review them very carefully for printing or typing errors. Then return the corrected the Galleys to the return address in Japan (not to me) within three days. Because of scheduling, it is imperative that you return them immediately. Thank you for considering JCEJ. We hope you will again consider JCEJ.

Sincerely,



Georges Belfort  
Professor and International Editor for the Americas

CC: Professor Shigeo Katoh, Editor  
KOBE UNIVERSITY  
Chemical Engineering Department  
Nada-Ku, Kobe 657  
JAPAN  
University phone: 078-881-1212  
Department phone: 078-881-1212x5482  
Department FAX: 078-803-1171



## Continuous extraction of xylanase from *Penicillium janthinellum* with reversed micelles using experimental design mathematical model

E.M.G. Rodrigues & E.B. Tambourgi\*

Chemical Engineering Faculty, Campinas State University, P.O. Box 6066, 13081–970 Campinas (SP), Brazil

\*Author for correspondence (Fax: 0055-19-7883946; E-mail: elias@desq.feq.unicamp.br)

Received 2 October 2000; Revisions requested 11 October 2000/2 November 2000; Revisions received 1 November 2000/19 December 2000; Accepted 19 December 2000

**Key words:** continuous extraction, reversed micelles, statistical design, xylanase

### Abstract

Xylanase recovery from *Penicillium janthinellum* with a reversed micellar system consisting of a cationic surfactant using continuous process was evaluated. A statistical approach was applied to the results and showed that the highest xylanase recovery (140%), indicated by the model, was attained at an ionic strength of  $7.5 \text{ mS cm}^{-1}$  and volumetric flow of  $0.6 \text{ ml min}^{-1}$ . A new xylanase extraction was performed under these conditions to test the model and showed a close similarity between the experimental result and the value predicted by the model.

### Introduction

Reverse micellar systems have been studied as a technique for the extraction and purification of proteins (Rodrigues *et al.* 1999, Pessoa & Vitolo 1997). However, the continuous extraction of the target protein using reversed micellar systems has been limited to only a few examples, namely, the extraction of an  $\alpha$ -amylase in an aqueous solution by TOMAC (trioctyl methyl ammonium chloride) reversed micellar phase using two mixer-settlers units (Dekker *et al.* 1989), the extraction of a pure recombinant cutinase by AOT (sodium di-2-ethylhexyl sulfosuccinate) reversed micelles with a perforated rotating disc contactor (Carneiro-da-Cunha *et al.* 1994) and the recovery of intracellular proteins from *Candida utilis* by reversed micellar extraction in a spray column (Han *et al.* 1994).

This work describes the continuous extraction of extracellular xylanase from *Penicillium janthinellum* to a reversed micellar phase of the cationic surfactant BDBAC [*n*-benzyl-*n*-dodecyl-*n*-bis(2-hydroxyethyl) ammonium chloride] and the influence of the following factors: ionic strength and volumetric flow. Fractional factorial designs, in which

variables can be examined after few experiments, are very efficient.

### Materials and methods

#### *Microorganism and growth*

*Penicillium janthinellum* was isolated from decaying wood (Milagres *et al.* 1993). It was cultivated at  $30^\circ\text{C}$  for 5 days in medium containing 2% (w/v) glucose, 0.25% (w/v) yeast extract, 2% (v/v) concentrated salt solution based on Vogel's medium and 2% (w/v) agar. The medium was sterilized at  $112^\circ\text{C}$  for 15 min. For the inoculum spores were suspended in water and the suspension was filtered through gauze placed on Erlenmeyer flasks to give a final spore concentration of  $10^5 \text{ ml}^{-1}$ .

#### *Preparation of sugar cane bagasse acid hydrolysate*

In order to prepare the hydrolysate for cultivation, 800 g dry milled bagasse was mixed with 8 l  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (0.25% v/v) and autoclaved for 45 min at  $121^\circ\text{C}$ . The liquid fraction was separated by filtration and the pH adjusted to 5.5 with NaOH.

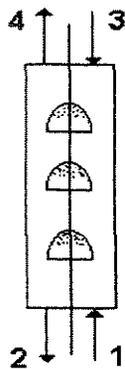


Fig. 1. Experimental column with 100 ml of volume and 19 cm of high and 2.54 cm i.d., where: 1 – inlet organic phase (0.2 M BDBAC-reversed-micelles in isooctane/hexanol 92.5:7.5 v/v); 2 – outlet aqueous solution; 3 – inlet aqueous phase that contains the studied enzyme; 4 – outlet micellar solution.

### Liquid-liquid extraction

The liquid-liquid extraction was performed using a pulsed column, as showed in Figure 1. The column was built of Perspex tube 2.54 cm i.d.  $\times$  19 cm ht. Three caps separated at 4 cm were mounted on a central shaft. The reverse micellar systems used consisted of an organic phase of 0.2 M BDBAC-reversed-micelles in isooctane/hexanol (92.5:7.5 v/v). The volumetric flow of organic and aqueous phases were kept constant by using a multi-channel peristaltic pump. Both aqueous phases were assayed to determine enzyme activity.

### Determination of enzyme activities

Xylanase activities were determined according to Bailey *et al.* (1992). The release of reducing sugars was determined using the 3,5-dinitrosalicylic acid method with xylose as a standard reference.

### Factorial design methodology

To study the xylanase recovery of the present system a  $2^2$  factorial design was planned accommodating two variables, each one at two levels ( $-1/+1$ ) where 6 runs were performed. Ionic strength and volumetric flow were selected as experimental factors.

## Results and discussion

A liquid-liquid extraction of xylanase by reversed micelles was evaluated under different experimental

Table 1. Xylanase recovery (%) obtained as a function of the ionic strength ( $\text{mS cm}^{-1}$ ) and volumetric flow ( $\text{ml min}^{-1}$ ).

| Ionic strength ( $\text{mS cm}^{-1}$ ) | Volumetric flow ( $\text{ml min}^{-1}$ ) | Xylanase recovery (%) <sup>a</sup> |
|--|--|------------------------------------|
| 7.5                                    | 0.6                                      | 140                                |
| 10                                     | 0.6                                      | 139                                |
| 7.5                                    | 1.0                                      | 73                                 |
| 10                                     | 1.0                                      | 89                                 |
| 8.75                                   | 0.8                                      | 110                                |
| 8.75                                   | 0.8                                      | 107                                |

Average values: 2 repetitions.

<sup>a</sup>100% = 1.35  $\mu\text{mol}$  reducing sugar formed/min mg protein.

conditions using an experimental design. The effects of different ionic strength and volumetric flow levels on the extraction yield were studied. A  $2^2$  full factorial design in two levels with 2 centre points (to determine the experimental error) was employed. The best yield extraction values obtained from the 6 assays were 140%, where ionic strength  $7.5 \text{ mS cm}^{-1}$  and volumetric flow  $0.6 \text{ ml min}^{-1}$  (Table 1). The value obtained for the extraction indicated that we were near of the equilibrium conditions, and also that we can consider the column as a single stage of extraction.

Analysis of variance was performed and the regression coefficient of the model ( $R^2 = 0.99$ ) calculated. The mathematical model to represent extraction continuous process can be expressed by Equation (1), where  $Y$  = xylanase recovery (%):  $A$  = ionic strength and  $B$  = volumetric flow.

$$Y = 110.17 - 3.75A - 29.45B + 4.2AB. \quad (1)$$

According to this model, xylanase extraction using the best conditions (ionic strength  $7.5 \text{ mS cm}^{-1}$  and volumetric flow  $0.6 \text{ ml min}^{-1}$ ) gives a 148% recovery of activity. To confirm the maximal enzyme recovery predicted by the model, a new extraction was performed using the optimal conditions and a xylanase recovery of 137% was obtained. This value was  $\sim 7\%$  smaller than the value predicted by the model.

## Conclusions

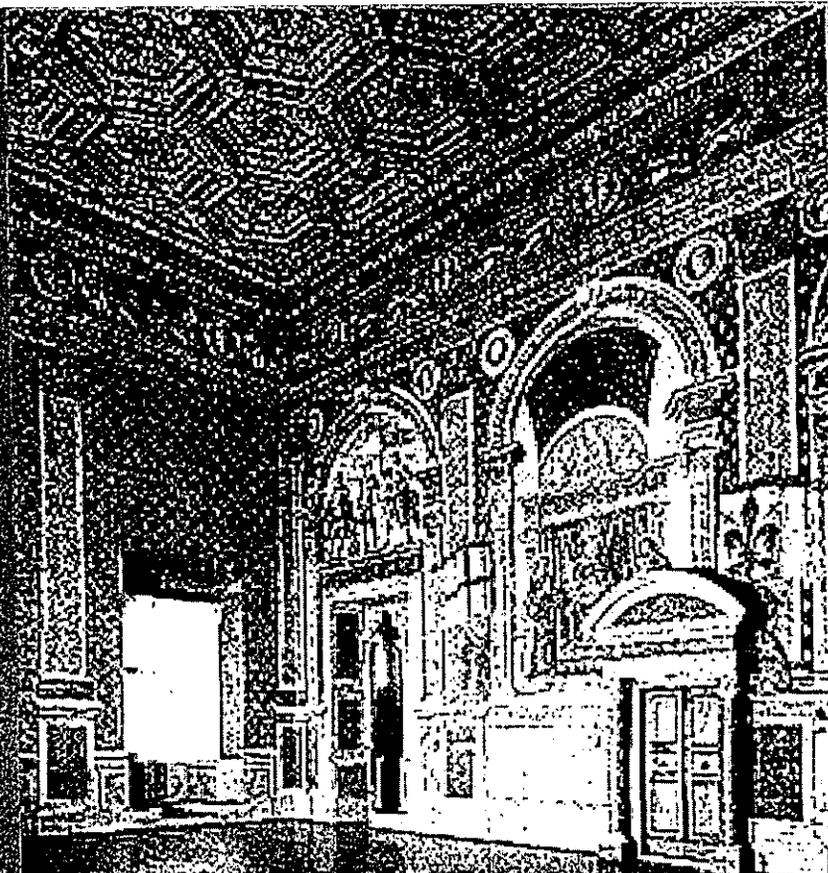
For xylanase recovery by continuous process using BDBAC-reversed micelles, extraction is necessary at low ionic strength of medium and low volumetric flow. The highest enzyme recovery was around 140%. These optimized conditions were: ionic strength  $7.5 \text{ mS cm}^{-1}$  and volumetric flow  $0.6 \text{ ml min}^{-1}$ .

## Acknowledgement

Eliana M.G. Rodrigues acknowledges FAPESP for a Doctor of Science fellowship.

## References

- Bailey MJ, Biely P, Pountanen K (1992) Inter-laboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnol.* **23**: 257-270.
- Carneiro-da-Cunha MG, Aires-Barros MR, Cabral JMS, Tambourgi EB (1994) Recovery of a recombinant cutinase with reversed micelles in a continuous perforated rotating disc contactor. *Biotechnol. Tech.* **8**: 413-418.
- Dekker M, Hilhorst R, Laane C (1989) Isolating enzymes by reversed micelles. *Anal. Biochem.* **178**: 217-226.
- Han DH, Lee SY, Hong WH (1994) Separation of intracellular proteins from *Candida utilis* using reverse micelles in a spray column. *Biotechnol. Tech.* **8**: 105-110.
- Milagres AMF, Lacis LS, Prade RA (1993) Characterization of xylanase production by a local isolate of *Penicillium janthinellum*. *Enzyme Microbiol. Tech.* **15**: 248-253.
- Pessoa Jr A, Vitolo M (1997) Separation of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using reversed micellar extraction. *Biotechnol. Tech.* **11**: 421-422.
- Rodrigues EMG, Milagres AMF, Pessoa Jr A (1999) Xylanase recovery: effect of extraction conditions on the AOT-reversed micellar systems using experimental design. *Proc. Biochem.* **34**: 121-125.



**RESEARCH** ICheaP-5

**4th Conference  
Process Integration,  
Modelling and Optimisation  
for Energy Saving and  
Pollution Reduction**

**5th Italian  
Conference  
on  
Chemical and  
Process Engineering**

**Florence 20-23 May 2001**

**Organized by ADIC**

*Proceedings*

**ICheaP-5 Vol. 2**

|  |             |
|--|-------------|
| <b>ENZYMATIC EXPLOITATION OF POLYMERIC RESIDUES FROM THE AGROFOOD INDUSTRY.</b>  | <b>1031</b> |
| F. Alfari, M. Cantarella, A. Gallifuoco, L. Prosperi and P. Viparelli  |             |
| <b>MODELING GRADIENT ELUTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN NON-LINEAR ION-EXCHANGE-CHROMATOGRAPHY</b>                          | <b>1037</b> |
| A. Wiesel, H. Schmidt-Traub, J. Lenz and J. Strube   |             |
| <b>ON-LINE MONITORING OF OXYGEN UPTAKE RATE (OUR) IN ANIMAL CELL CULTURE.</b>  | <b>1043</b> |
| S. Vanlaethem, V. Halloin, J. Castillo and Abbr. COGNOME   |             |
| <b>AMPEROMETRIC BIOSENSORS BASED ON ENZYME-LOADED LIPOSOME ACTIVITY</b>  | <b>1049</b> |
| M.C. Annesini, A. Masuzzo, A. Memoli and S. Petralito  |             |
| <b>XYLANASE RECOVERY USING CONTINUOUS EXTRACTION WITH REVERSED MICELLES-AN MATHEMATICAL MODEL USING STATISTICAL DESIGN</b> | <b>1055</b> |
| E.M.G. Rodrigues and E.B. Tambourgi  |             |
| <b>THE HISTORY OF B. thuringiensis DEVELOPMENT IN BRAZIL</b>   | <b>1061</b> |
| I.O. Moraes, R.O.M. Arruda, E.B. Tambourgi, R.O. Moraes, L.H. Pelizer, D.M.F. Capalbo and V. Del Bianchi                   |             |
| <b>STUDY ON BIOLOGICAL SULPHATE DEGRADATION</b>  | <b>1065</b> |
| M. Zolezzi, A. Lodi and M. Rovatti   |             |
| <b>OXYGEN INFLUENCE ON THE NITRIFICATION/DENITRIFICATION PROCESS IN A FBR SYSTEM</b>                                       | <b>1071</b> |
| A. Lodi, M. Zolezzi and M. Rovatti   |             |
| <b>LARGE SCALE THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES PRODUCTION THROUGH A MODULAR PLANT</b>                                    | <b>1077</b> |
| G.G. Ronca and G. Ferrari  |             |

*AUTHOR Index at the end of the Volume*

## XYLANASE RECOVERY USING CONTINUOUS EXTRACTION WITH REVERSED MICELLES-AN MATHEMATICAL MODEL USING STATISTICAL DESIGN

E.M.G. Rodrigues and E.B. Tambourgi\*

Chemical Engineering Faculty, Campinas State University, PO Box 6066  
Zip code 13081-970 - Campinas (SP) - Brazil, Fax: 0055-19-7883946. E-mail:  
elias@desq.feq.unicamp.br

### Abstract

Xylanase recovery using continuous extraction by BDBAC-reversed micelles was evaluated under different experimental conditions. A full factorial design with centre points was employed to verify the influence of different factors on the recovery. A mathematical model represented xylanase yield as a function of ionic strength and volumetric flow. The highest xylanase recovery, indicated by the model (30.5%), was attained at ionic strength 10.0 mS/cm and volumetric flow 0.5 ml/min. Under these conditions, and to test the model, a new xylanase extraction was performed in laboratory giving 40.5% recovery yield, this value was higher than the value predicted by model.

### Introduction

The purification of proteins using reverse micellar systems has been studied (Rodrigues et al., 1999; Pessoa Jr. and Vitolo, 1997) since this technique allows the recovery and concentration of protein from a dilute aqueous solution containing other bioproducts (Krei and Hustedt, 1992). Reversed micelles are aggregates of surfactant molecules in the organic solvents. These surfactant aggregates consist of a polar inner core and an inner layer made up of the surfactant hydrophilic head (Chang et al., 1997). Continuous extraction using reversed micellar systems is an efficient process with a reduced number of steps, in the purification of biomolecules. However, few examples of this type of extraction can be found in the literature, namely, the extraction of an  $\alpha$ -amylase in an aqueous solution by TOMAC (tri octyl methyl ammonium chloride) reversed micellar phase using two mixer-settlers units (Dekker et al., 1989), the extraction of a pure recombinant cutinase by AOT (sodium di-2-ethylhexyl sulfosuccinate) reversed micelles with a perforated rotating disc contactor (Carneiro-da-Cunha et al., 1994; 1996) and the recovery of intracellular proteins from *Candida utilis* by reversed micellar extraction in a spray column (Han et al., 1994). In the present work describes the continuous extraction of extracellular xylanase from *P. janthinellum* to a reversed micellar phase of the cationic surfactant BDBAC (N-benzyl-N-dodecyl-N-bis(2-hydroxyethyl)) and the influence of the following factors: ionic strength, frequency pulsed and volumetric flow. The common approach of studying one variable at a time, while keeping the others constant within a set of selected values, has the drawbacks of 1) requiring a large number of experiments and 2) missing the interactions among the variables. This methodology allows not only to study the variables but also to verify the effects of the factors individually and their interactions.

## MATERIALS AND METHODS

### Microorganism and Growth Conditions

*P. janthinellum* was isolated from decaying wood (Milagres *et al.*, 1993) and cultivated on a medium consisting of the above sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate supplemented with 2% (v/v) concentrated salt solution based on Vogel's medium and 0.1% yeast extract.

### Enzyme Production

The cultivation medium consisted of the above sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate supplemented with 2% (v/v) concentrated salt solution based on Vogel's medium and 0.1% yeast extract. Standard cultivation conditions were: temperature 30°C; initial pH 5.5 (uncontrolled); agitation 60 rpm; cultivation time of 96h.

### Liquid-Liquid Extraction

The liquid-liquid extraction was performed using a pulsed column, as showed in Figure 1. The reverse micellar systems used consisted of an organic phase of 0.2M BDBAC-reversed-micelles in isoocctan/hexanol (92.5:7.5 v/v) by process continuous. Initially, the column was filled with 100 ml of aqueous medium. The flow rates of organic, aqueous phases were maintained constant by using a multi-channel peristaltic pump. Both aqueous phases were assayed to determine enzyme activity. The extraction results are reported in terms of total activity recovered (%) in the strip phase using the xylanase content of the initial aqueous phase for reference.

### Water Determination

The micellar solutions were checked for water by titrating 100 µl samples in a Karl-Fischer-Moisture Titrator (Mettler DL18). The results were expressed as weight %.

### Determination of Enzyme Activities

Xylanase activities was assayed according to Bailey *et al.* (1992) using 1% birch-wood xylan (SIGMA, USA). The release of reducing sugar was determined using the 3,5 dinitrosalicylic acid (DNS) method (Miller, 1959), using xylose solution as a standard reference.

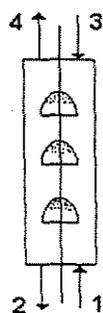


Figure 1: Experimental column with 100 ml of volume and 19 cm of high and 2.54 cm i.d. Where: 1- inlet organic phase (0.2 M BDBAC-reversed-micelles in isooctane/hexanol 92.5:7.5v/v); 2- outlet aqueous solution; 3- inlet aqueous phase that contains the studied enzyme; 4- outlet micellar solution.

### Experimental Designs

A  $2^3$  full factorial central composite design with six star points and four replicates at the center point and eighth cube points was employed to fit a second order polynomial model which indicated that 18 experiments were required for this procedure. Ionic strength, frequency pulsed and volumetric flow were selected as experimental factors. The range and levels of the variables investigated in this study are shown in Table 1.

Table 1 Experimental range and levels of the independent variables

| Variables           | Range and levels |      |      |
|---------------------|------------------|------|------|
|                     | -1               | 0    | +1   |
| Ionic strength      | 7.5              | 10.0 | 12.5 |
| Frequency pulsation | 1:1              | 1:2  | 1:3  |
| Volumetric Flow     | 0.5              | 1.0  | 1.5  |

### RESULTS AND DISCUSSION

A liquid-liquid extraction of xylanase by reversed micelles was evaluated under different experimental conditions using an experimental design. The effects of different: ionic strength, frequency pulsation and flow rates levels on the extraction yield were studied. A  $2^3$  full factorial design in two levels with 4 centre points (to determine the experimental error) was employed. The yield extraction values obtained from the 12 assays were 34.2%. However, under the best extraction conditions (ionic strength = 10.0 mS/cm, frequency pulsation = 1:3 and volumetric flow = 1ml/min) the variables were significant.

As a function of these results a  $2^3$  full factorial design was performed and all the factors studied (ionic strength, frequency pulsation and volumetric flow) statistical analysis indicates a significant curvature in the range of the experimental conditions. As a function of the first-order model a new model was defined, now of second order, using non linear regression. A new experimental design was performed with ascending points of the 3 significant variables: ionic strength, frequency pulsation and volumetric flow. The assays corresponding to the ascending points were performed to determine the best region for xylanase extraction. Eighteen experiments were carried out ( $2^3$  full factorial design + 4 centre points and 6 centre faces). Table 2 presents the matrix employed in this design. The percentage of xylanase recovery under the best conditions (43.5%) (ionic strength = 10.0 mS/cm, frequency pulsation = 1:2 and volumetric flow = 0.5ml/min).

Table 2 Xylanase recovery (%) using the 2<sup>3</sup>-full factorial design + 4 centre points and 6 centre faces under different treatments <sup>a</sup>

| Assay | Factors |    |    | Xylanase recovery (%) |
|-------|---------|----|----|-----------------------|
|       | A       | B  | C  |                       |
| 1     | -1      | -1 | -1 | 28.2                  |
| 2     | 1       | -1 | -1 | 12.9                  |
| 3     | -1      | 1  | -1 | 32.7                  |
| 4     | 1       | 1  | -1 | 35.1                  |
| 5     | -1      | -1 | 1  | 16.8                  |
| 6     | 1       | -1 | 1  | 2.7                   |
| 7     | -1      | 1  | 1  | 20.8                  |
| 8     | 1       | 1  | 1  | 6.3                   |
| 9     | -1      | 0  | 0  | 9.1                   |
| 10    | 1       | 0  | 0  | 3.3                   |
| 11    | 0       | -1 | 0  | 7.3                   |
| 12    | 0       | 1  | 0  | 5.0                   |
| 13    | 0       | 0  | -1 | 43.5                  |
| 14    | 0       | 0  | 1  | 10.5                  |
| 15    | 0       | 0  | 0  | 9.4                   |
| 16    | 0       | 0  | 0  | 11.8                  |
| 17    | 0       | 0  | 0  | 16.8                  |
| 18    | 0       | 0  | 0  | 12.6                  |

<sup>a</sup> A = ionic strength (-1 = 7.5; 0 = 10.0; 1 = 12.5); B = frequency pulsation (-1 = 1:1; 0 = 1:2; 1 = 1:3); C = volumetric flow (-1 = 0.5; 0 = 1.0; 1 = 1.5). Average values: 2 repetitions.

Table 3 Estimated effects, Student's t-test and standard errors of 2<sup>3</sup> full factorial design with centre face <sup>a</sup>

| Variables | Estimated effects | Standard error | t-values |
|-----------|-------------------|----------------|----------|
| Average   | 11.624            | +/-2.233       | -        |
| A         | -9.460            | +/-3.589       | 2.636*   |
| B         | 6.400             | +/-3.589       | 1.783    |
| C         | -19.060           | +/-3.589       | 5.310*   |
| AB        | 4.325             | +/-4.013       | 1.078    |
| AC        | -3.925            | +/-4.013       | 0.978    |
| BC        | -4.775            | +/-4.013       | 1.189    |
| AA        | -8.795            | +/-6.895       | 1.276    |
| BB        | -8.995            | +/-6.895       | 1.290    |
| CC        | 32.805            | +/-6.895       | 4.758*   |

<sup>a</sup> A = ionic strength (mS/cm); B = frequency pulsation (pulse/second); C = volumetric flow (ml/min)

\* Significant ( $t_{8, 0.95} = 2.306$ )

Statistical analysis of the results showed significant effects only for the main variables A and C, and no evidence of any interactions involving these variables were obtained. The quadratic interactions C<sup>2</sup> was significant at 95% confidence level for xylanase recovery (Table 3). The other variables were not significant and therefore were not included in the equation described by the model. Analysis of variance was performed and the regression coefficient of the model (R<sup>2</sup> = 0.73) calculated. The mathematical model to represent extraction continuous process can be expressed by Equation (1), where Y = xylanase recovery (%): A = ionic strength and C = volumetric flow

$$Y = 9.413 - 4.73 A - 9.53 C + 11.538 C^2 \quad (1)$$

According to this model xylanase extraction using the best conditions (ionic strength = 10.0 mS/cm and volumetric flow = 0.5 ml/min) gives a 30.5% activity recovery. To firm the maximal enzyme recovery predicted by the model, a new extraction was performed using the optimal conditions and a xylanase

recovery of 40.5% was obtained. This value was ~ 30% higher than the value (30.5%) predicted by model. The micelle water content ( $W_0$ ) was determined as 63.1 and the micelles radius ( $R_m$ ) as 9.4nm, which showed that the micelle size was not a limiting variable during the extraction. The xylanase recovery by reversed micelles using process continuous provided an enrichment factor of 1.3 fold in the extracted phase and showing some purification. The surface response and the contour lines of the model are represent in Figure 2.

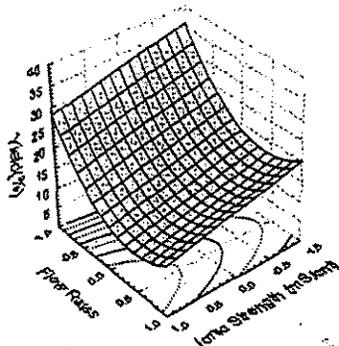


Figure 2 Influence of the ionic strength and volumetric flow on the activity yield obtained by Equation 1.

### Conclusions

For xylanase recovery by continuous process using BDBAC-reversed micelles, extraction is necessary at low ionic strength of the medium and low volumetric flow. The highest enzyme recovery was around 40%, which provided an enrichment factor of 1.3. These optimized conditions were: ionic strength 10.0 mS/cm and volumetric flow 0.5 ml/min.

### Acknowledgements

Eliana M.G. Rodrigues acknowledgements FAPESP for a Doctor of Science fellowship.

### References

- Bailey, M.J., Biely, P. and Poutanen, K. (1992). Inter-laboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J.Biotechnol.* 23, 257-270.
- Carneiro-da-Cunha, M.G., Aires-Barros, M.R. Cabral, J.M.S. and Tambourgi, E.B. (1996). Continuous extraction of a recombinant cutinase from *Escherichia coli* disrupted cells with reversed micelles using a perforated rotating disc contactor. *Bioproc. Eng.* 15, 253-256.
- Carneiro-da-Cunha, M.G., Aires-Barros, M.R. Cabral, J.M.S. and Tambourgi, E.B. (1994). Recovery of a recombinant cutinase with reversed micelles in a continuous perforated rotating disc contactor. *Biotechnol. Tech.* 8, 413-418.
- Chang, Q.-L., Chen, J.-Y., Zhang, X.-F and Zhao, N.-M. (1997). Effect of the cosolvent on the extraction of  $\alpha$ -amylase with reversed micelles: circular dichroism study. *Enz. Microb. Techn.* 20, 87-92.

- Dekker, M., Hilhorst, R. and Laane, C. (1989). Isolating enzymes by reversed micelles. *Anal. Biochem.* 178, 217-226.
- Han, D.H., Lee, S.Y., Hong, W.H. (1994). Separation of intracellular proteins from *Candida utilis* using reverse micelles in a spray column. *Biotechnol. Tech.* 8, 105-110.
- Krei, G.A. and Hustedt, H. (1992). Extraction of enzymes by reversed micelles. *Chem. Eng. Sci.* 47(1), 99-111.
- Milagres, A.M.F., Laci, L.S. and Prade, R.A. (1993). Characterization of xylanase production by a local isolate of *Penicillium janthinellum*. *Enz. Microb. Technol.* 15, 248-253.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426-428.
- Pessoa, Jr. And Vitolo, M. (1997). Separation of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using reversed micellar extraction. *Biotechnol. Technol.* 11, 421-422.
- Rodrigues, E.M.G., Milagres, A.M.F. and Pessoa Jr., A. (1999). Xylanase recovery: effect of extraction conditions on the AOT-reversed micellar systems using experimental design. *Proc. Biochem.* 34, 121-125.

**COBEQ**

Brazilian Congress of Phase Equilibrium and Fluid Properties for Chemical Process Design

XIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química

XIX Interamerican Congress of Chemical Engineering

## EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE XILANASE POR MICELA REVERSA UTILIZANDO UMA MICROCOLUNA PULSADA

Eliana M.G. Rodrigues\*, Elias B. Tambourgi

Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6066  
13081-970, Campinas(SP), Brasil

**Resumo.** O grande interesse na produção de xilanases está relacionado à vasta aplicação que esta enzima possui no setor industrial, abrangendo desde a substituição de etapas de processos correntes até o estabelecimento de outros inteiramente novos. Sua recuperação envolve normalmente a separação de compostos indesejáveis presentes no meio de fermentação. A extração líquido-líquido utilizando sistema de micela reversa tem sido apresentada como uma das tecnologias mais promissoras para a recuperação de biomoléculas, podendo ser aplicada diretamente no meio de fermentação. A extração contínua com movimentos pulsantes, em geral campânulas, tem sido usado como um aparelho alternativo para os equipamentos de extração. O objetivo deste trabalho foi de verificar a influência da frequência de pulsação das campânulas foram realizados experimentos variando sua frequência de pulsação. As condições utilizadas na fase aquosa foram tampão fosfato de sódio 0,1M no pH 7,0 e fase orgânica 0,2M de BDBAC em 92,5% isooctano e 7,5% hexanol. Nestas condições a melhor recuperação de xilanase foi de 10,7% quando a frequência de pulsação utilizada foi de 1 pulso a cada 3 segundos.

**Palavras-chave:** Xilanase, Micela Reversa, Extração Líquido-Líquido

### 1. INTRODUÇÃO

A extração líquido-líquido é um processo bem estabelecido na indústria química, incluindo várias aplicações na indústria bioquímica, uma vez que muitas técnicas de separação sólido-líquido usadas nos processos industriais bioquímicos, tais como filtração e centrifugação, são fortemente dependentes do tamanho da partícula e são limitadas quando se trata do processamento de células ou resíduos celulares.

Os métodos geralmente utilizados no processo de recuperação dos produtos obtidos por fermentação envolvem múltiplos passos, com elevado dispêndio de tempo, conduzindo também a baixos rendimentos de recuperação do produto. No entanto, novas tecnologias de purificação têm sido desenvolvidas, como a extração líquido-líquido, representando um processo alternativo de purificação (COIMBRA, 1995).

Cerca de 50 a 90% do custo de produção para um produto biológico reside na purificação, havendo necessidade de uma técnica de bioseparação em larga escala que seja eficiente e econômica e que atinja altos graus de recuperação e pureza, mantendo a atividade biológica da molécula.

O desenvolvimento tecnológico do mundo atual, e particularmente da indústria química, teve também a conseqüência adversa da poluição ambiental. Paralelamente, o alto consumo energético nas indústrias provocou aumento dos preços dos produtos industriais. É

---

\* A quem a correspondência deve ser dirigida.

neste contexto que se insere o desenvolvimento de uma tecnologia menos poluente e de custo energético comparativamente mais baixo, que tem o uso das enzimas como um dos seus objetivos principais.

Xilanases microbianas são geralmente obtidas a partir de meios complexos e de forma diluída. Sua recuperação envolve normalmente a separação de compostos indesejáveis presentes no meio de fermentação, como células, componentes celulares, proteínas contaminantes, sais e água.

As xilanases são as enzimas mais estudadas para aplicação na etapa de branqueamento de polpas de celulose, por reduzirem o nível de poluição no final do processo e é de grande relevância estudos que visam a sua produção e recuperação em larga escala (MILAGRES, DURAN, 1992).

O processo de extração líquido-líquido por micela reversa tem sido utilizado com sucesso na purificação de várias enzimas. A sua viabilidade tem sido demonstrada, a partir de enzimas puras ou parcialmente purificadas, ou sistemas complexos, como meios fermentados. Entretanto a extração contínua de proteínas usando micela reversa tem sido limitado.

A extração contínua com movimentos pulsantes, em geral o disco perfurado com áreas livres de circulação (campânulas), tem sido usado como um aparelho alternativo para os equipamentos de extração. Com este tipo de extrator, há uma alta transferência de massa entre as fases, obtendo principalmente uma alta eficiência na separação

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Microrganismo e Condições de Crescimento**

O microrganismo utilizado no presente trabalho foi o fungo *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115, isolado de madeira em decomposição em Lorena-SP pôr MILAGRES (1988).

O meio de cultura usado para obtenção de esporos de *P. janthinellum* foi composto pôr 2% de glicose, 0,25% de extrato de levedura, 2% (v/v) de solução mineral (VOGEL, 1956), e 2% de ágar-ágar, que foi autoclavado pôr 15 minutos a 112°C (MILAGRES, 1988).

No hidrolisado foi utilizado bagaço de cana-de-açúcar proveniente da Usina São Martinho e o procedimento de hidrólise foi realizado conforme descrito por MILAGRES, LACIS (1991).

### **2.2 Produção da Xilanase**

A obtenção das xilanases se deu através do cultivo de *P. janthinellum* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, previamente filtrado e com pH ajustado para 5,5 com NaOH. Os frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio foram incubados a 30°C sob agitação de 60 rpm por 96 horas.

### **2.3 Determinação da Atividade Enzimática**

A atividade de xilanase extracelular foi determinada pela quantidade de açúcares redutores liberados a partir de xilana, de acordo com o método de BAILEY *et al.* (1992). Os açúcares redutores foram dosados pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959).

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que causa a transformação de 1  $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto a 50°C.

## 2.4 Extração Líquido-Líquido de Xilanase por Micela Reversa em Processo Contínuo

Neste trabalho, os resultados experimentais foram obtidos numa microcoluna de operação contínua de campânulas pulsadas. Optou-se pelas campânulas como dispositivos para promover a agitação, porque elas conseguem promover uma excelente dispersão e aumentar, de certo modo, o tempo de contato entre as fases. Esta microcoluna foi construída de tubo de vidro de 19 cm de altura; 2,84 cm de diâmetro externo e 2,54 cm de diâmetro interno. No interior da mesma foi acoplado um eixo que contém as campânulas pulsantes e perfuradas. O diâmetro da base da campânula é de 2,49 cm. A peneira da qual a campânula foi construída fornece uma área livre de 38%.

Os bocais de alimentação e saída são de inox, e possuem um diâmetro interno de 3,65 mm e 6,85 mm de diâmetro externo.

Os pulsos são fornecidos por um dispositivo e controlados por um dispositivo de pulsação.

A alimentação da fase contínua, que possui maior densidade e a alimentação da fase dispersa, que possui a menor densidade, foram feitas por meio de uma bomba peristáltica, previamente calibrada.

Os tubos para conduzir as alimentações e saída são de viton, que é um material resistente à ação do isooctano.

As amostras das fases aquosa depois da extração ( $WP_{II}$ ) e fase aquosa ( $WP_I$ ) foram retiradas no topo e fundo da coluna, respectivamente. As condições de carga total alimentada, a razão entre as fases alimentadas e intensidade de pulsação foram determinadas experimentalmente.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proposta inicial deste estudo, era o de estudar as condições de recuperação da xilanase em processo contínuo, utilizando as mesmas condições da fase orgânica obtidas em batelada por RODRIGUES (1997). Entretanto, ao utilizarmos estas condições, observou-se o aparecimento de uma terceira fase, ou seja, excesso de solvente, a qual teve uma influência negativa no processo, pois como o solvente é mais leve ele sai primeiro da microcoluna, permanecendo a fase micelar por mais tempo na mesma. Este fato também foi observado em batelada, porém não afetou o processo, pois esse excesso de solvente era retirado e desprezado.

Os resultados obtidos neste ensaio são apresentados na Tabela 1, onde observa-se que a recuperação em  $WP_{II}$ , ou seja, na fase depois da extração foi no máximo de 6,4%, esta recuperação foi obtida no final da corrida, certamente depois da estabilização do sistema. Além disso foi observado que nos 20 minutos iniciais do processo não teve nenhuma recuperação em  $WP_{II}$ , resultado este decorrente do excesso do solvente. Estes valores encontrados na recuperação em  $WP_{II}$  foram inferiores aos obtidos em batelada que foram em torno de 17% nas mesmas condições, resultados estes obtidos por RODRIGUES (1997).

Contudo, ao analisar a Tabela 2, onde temos o valor da atividade em U/mL do mesmo ensaio e não rendimento em atividade, constata-se não haver perdas, pois durante todo o processo a soma das atividades de  $WP_I$  (fase aquosa) com  $WP_{II}$  (fase aquosa depois da extração) ficou aproximadamente a mesma, em relação a atividade inicial.

Tabela 1: Balanço de atividade no processo de extração contínua realizada em uma microcoluna com campânulas pulsadas:

| Tempo (min) | Atividade recuperada em WP <sub>I</sub> (%) | Atividade recuperada em WP <sub>II</sub> (%) | Atividade Total (%) |
|-------------|---|--|---------------------|
| 10          | 90,60                                       | 0  | 90,60               |
| 20          | 74,79                                       | 0  | 74,79               |
| 30          | 80,24                                       | 2,49   | 82,73               |
| 40          | 86,98                                       | 3,13   | 90,11               |
| 50          | 32,41                                       | 4,41   | 36,82               |
| 55          | 25,53                                       | 6,36   | 31,89               |
| 60          | 42,25                                       | 2,58   | 44,83               |
| 70          | 40,13                                       | 5,75   | 45,88               |

Condições de extração: Fase aquosa: pH 7,4, 0,01M de tampão fosfato de sódio; Fase orgânica: 0,33M de BDBAC, 7,6% de hexanol; Temperatura ambiente. Condição de reextração: pH 5,5, 1M de tampão acetato de sódio, adicionado de NaCl 0,5M. Agitação 1 pulso a cada 3 segundos.

Tabela 2: Valores de atividade no processo de extração contínua realizada em uma microcoluna com campânulas pulsadas:

| Tempo (min) | Atividade em WP <sub>I</sub> (U/mL) | Atividade em WP <sub>II</sub> (U/mL) | Atividade Total (U/mL) |
|-------------|-------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|
| 10          | 13,58                               | 0                                    | 13,58                  |
| 20          | 13,41                               | 0                                    | 13,41                  |
| 30          | 12,23                               | 3,37                                 | 15,60                  |
| 40          | 12,37                               | 3,07                                 | 15,44                  |
| 50          | 10,93                               | 3,40                                 | 14,33                  |
| 55          | 11,48                               | 3,43                                 | 14,91                  |
| 60          | 11,40                               | 2,78                                 | 14,18                  |
| 70          | 12,03                               | 3,45                                 | 15,48                  |

Atividade Inicial: 15,87 U/mL. Condições de extração: Fase aquosa: pH 7,4, 0,01M de tampão fosfato de sódio; Fase orgânica: 0,33M de BDBAC, 7,6% de hexanol; Temperatura ambiente. Condição de reextração: pH 5,5, 1M de tampão acetato de sódio, adicionado de NaCl 0,5M. Agitação 1 pulso a cada 3 segundos.

Em virtude destes resultados foram escolhidas outras condições, optou-se por utilizar aquelas que não formassem três fases; estas também foram obtidas por Rodrigues (1997). As condições utilizadas nestes ensaios foram: fase aquosa tampão fosfato de sódio 0,1M e pH 7,0 e fase orgânica 0,2M de BDBAC, 7,5% de hexanol, à temperatura ambiente.

Os resultados obtidos nestes ensaios são apresentados na Fig. 1, onde observamos a influência da velocidade de pulsação das campânulas sobre a recuperação da xilanase em WP<sub>II</sub>, que corresponde a enzima que foi reextraída da solução micelar.

Antes de analisarmos a influência da agitação sobre a recuperação de xilanase em WP<sub>II</sub>, ressaltamos que segundo Rodrigues (1997), nestas mesmas condições a recuperação em WP<sub>II</sub> utilizando a extração em batelada foi em média de 5,8% e que em processo contínuo este valor quase dobrou, alcançando um valor de aproximadamente 11%.

Em relação à Fig. 1, podemos observar que a princípio parece não haver nenhuma relação entre o aumento da velocidade de pulsação das campânulas e a recuperação de xilanase, pois não há uma relação para se confirmar que aumentando ou diminuindo a agitação a recuperação possa ou não melhorar. O que pode ser observado é que, quando temos

uma velocidade intermediária (1:5) a recuperação fica aproximadamente em torno de 5% durante todo o processo. Já quando temos um aumento na pulsação para 1:3 o resultado é melhor, alcançando um máximo de aproximadamente 11% quando temos 25 minutos de processo e depois mantém constante durante o decorrer do ensaio em 7%. Agora, quando diminuimos a velocidade de pulsação para 1:8 percebe-se que houve um aumento quase constante de atividade recuperada, que foi maior do que com uma velocidade mais rápida, ficando em torno de 8%. Podendo dizer com isso que com uma pulsação de 1:8 ou de 1:3, a recuperação é a mesma.

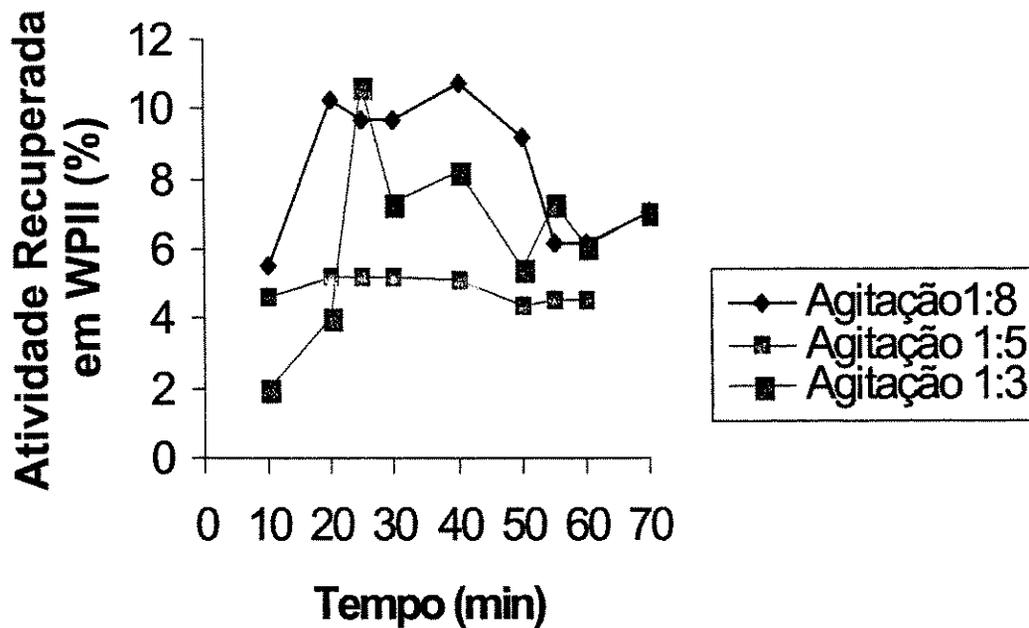


Figura 1: Efeito da agitação na recuperação da atividade em  $WP_{II}$  (Condições de extração: Fase aquosa: pH 7,0, 0,1M de tampão fosfato de sódio; Fase orgânica: 0,20M de BDBAC, 7,5% de hexanol; Temperatura ambiente. Condição de reextração: pH 5,5, 1M de tampão acetato de sódio, adicionado de NaCl 0,5M).

Observando isoladamente os resultados obtidos nos três ensaios em função do balanço de atividade, apresentados nas Tabelas 3, 4 e 5, constata-se que o balanço de atividade foi de aproximadamente 100%, quando trabalhamos com a pulsação de 1:3 e 1:5, Tabelas 3 e 4, respectivamente. Entretanto, quando trabalhamos com uma pulsação de 1:8, notamos que o balanço fica em torno de 80%. O erro obtido em função do balanço de massa realizado para estes ensaios ficou em torno de 10%, valor este estabelecido como limite de erro. Com isso, percebe-se que houve realmente uma perda de atividade quando se trabalhou com uma agitação de 1:8. Isto pode ser devido ao maior tempo de contato da fase orgânica com a fase aquosa, em função da baixa velocidade de pulsação, pois a campânula retém o solvente e com isso aumenta o tempo de contato entre as fases.

Tabela 3: Balanço de atividade no processo de extração contínua realizada em uma microcoluna com campânulas pulsadas, agitação de 1 pulso a cada 3 segundos:

| Tempo (min) | Atividade recuperada em WP <sub>I</sub> (%) | Atividade recuperada em WP <sub>II</sub> (%) | Atividade Total (%) |
|-------------|---|--|---------------------|
| 10          | 98,51                                       | 1,95   | 100,46              |
| 20          | 98,09                                       | 4,02   | 102,11              |
| 25          | 95,29                                       | 10,66  | 105,95              |
| 30          | 84,88                                       | 7,35   | 92,23               |
| 40          | 106,93                                      | 8,22   | 115,15              |
| 50          | 94,59                                       | 5,46   | 100,05              |
| 55          | 96,45                                       | 7,30   | 103,75              |
| 60          | 104,27                                      | 6,11   | 110,38              |
| 70          | 73,21                                       | 7,05   | 80,26               |

Condições de extração: Fase aquosa: pH 7,0, 0,1M de tampão fosfato de sódio; Fase orgânica: 0,20M de BDBAC, 7,5% de hexanol; Temperatura ambiente. Condição de reextração: pH 5,5, 1M de tampão acetato de sódio, adicionado de NaCl 0,5M.

Tabela 4: Balanço de atividade no processo de extração contínua realizada em uma microcoluna com campânulas pulsadas, agitação de 1 pulso a cada 5 segundos:

| Tempo (min) | Atividade recuperada em WP <sub>I</sub> (%) | Atividade recuperada em WP <sub>II</sub> (%) | Atividade Total (%) |
|-------------|---|--|---------------------|
| 10          | 107,84                                      | 4,64   | 112,48              |
| 20          | 93,29                                       | 3,35   | 96,64               |
| 30          | 97,59                                       | 5,14   | 102,73              |
| 40          | 89,00                                       | 5,11   | 94,11               |
| 50          | 96,75                                       | 4,36   | 101,11              |
| 60          | 84,37                                       | 4,56   | 88,93               |

Condições de extração: Fase aquosa: pH 7,0, 0,1M de tampão fosfato de sódio; Fase orgânica: 0,20M de BDBAC, 7,5% de hexanol; Temperatura ambiente. Condição de reextração: pH 5,5, 1M de tampão acetato de sódio, adicionado de NaCl 0,5M.

Tabela 5: Balanço de atividade no processo de extração contínua realizada em uma microcoluna com campânulas pulsadas, agitação de 1 pulso a cada 8 segundos:

| Tempo (min) | Atividade recuperada em WP <sub>I</sub> (%) | Atividade recuperada em WP <sub>II</sub> (%) | Atividade Total (%) |
|-------------|---|--|---------------------|
| 10          | 84,64                                       | 5,51   | 92,15               |
| 20          | 72,66                                       | 10,24  | 82,90               |
| 30          | 77,65                                       | 9,67   | 87,32               |
| 40          | 69,42                                       | 10,77  | 80,19               |
| 50          | 77,02                                       | 9,17   | 86,19               |
| 60          | 74,76                                       | 6,19   | 80,95               |
| 70          | 76,36                                       | 7,03   | 83,39               |

Condições de extração: Fase aquosa: pH 7,0, 0,1M de tampão fosfato de sódio; Fase orgânica: 0,20M de BDBAC, 7,5% de hexanol; Temperatura ambiente. Condição de reextração: pH 5,5, 1M de tampão acetato de sódio, adicionado de NaCl 0,5M.

#### 4. CONCLUSÕES

Ao se realizar a extração líquido-líquido da xilanase por micela reversa, utilizando uma microcoluna com campânulas pulsadas, observou-se que apesar da velocidade de pulsação não apresentar uma grande influência sobre a recuperação da xilanase no sistema de micela reversa, verificou-se que altas agitações podem levar a desnaturação da proteína.

Com base nestes resultados é recomendável a operação do extrator em baixas velocidades de pulsação, no caso 1 pulso a cada 3 segundos.

#### AGRADECIMENTOS

A FAPESP pelo apoio financeiro.

#### REFERÊNCIAS

- Bailey, M.J., Biely, P. e Poutanen, K. (1992), "Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity", *Journal of Biotechnology*, 23(3), 257-270.
- Coimbra, J. S. R. (1995), " Desempenho de um extrator tipo Graesser na separação de proteínas do soro de queijo usando sistemas aquosos bifásicos", Tese de Doutorado, FEA/UNICAMP, Campinas.
- Milagres, A.M.F. (1988), "Alguns aspectos da regulação de  $\beta$ -xilanases extracelulares de *Penicillium janthinellum*". Tese de Mestrado, UFV, Viçosa .
- Milagres, A.M.F. e Laciš, L.S. (1991), "Efficient screening of process variables in *Penicillium janthinellum* fermentation", *Biotechnology Letters*, 13(2), 113-118.
- Milagres, A.M.F. e Duran, N. (1992), "Xylanolytic enzymes from *Penicillium janthinellum* and its applications in bleaching of pulps", *Progress Biotechnology*, 7, 539-545.
- Miller, G.L. (1959), "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar", *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- Rodrigues, E.M.G. (1997), " Extração líquido-líquido de xilanase por micela reversa", Tese de Mestrado, FAENQUIL, Lorena.
- Vogel, H.J. (1956), "A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (Medium N)", *Microbial Genetics Bulletin*, 13, 42-43.

## APÊNDICE

## APÊNDICE 1

### **Análise estatística para determinação do modelo não linear utilizando o extrato enzimático bruto**

Para determinação dos níveis das variáveis, que serão utilizados no planejamento que será ajustado a um modelo de segunda ordem, inicialmente foram realizados 3 ensaios preliminares. As condições experimentais desses 3 ensaios foram determinadas estatisticamente, sendo os mesmos apresentados na TABELA 1A, juntamente com os resultados obtidos experimentalmente. Observa-se que não houve um aumento na recuperação, entretanto, não era possível trabalhar além destes limites em função de restrições físicas e operacionais.

Adotou-se a condição do ensaio 1 como sendo a região central dos ensaios representando o ponto central. A partir deste ensaio, foi realizado os demais. Para obter os valores reais das variáveis codificadas, basta substituir os valores codificados por:

$$A = (\text{Condutividade} - 12,5) / 2,5$$

$$B = (\text{Frequência de pulsação} - \frac{1}{2}) / 1$$

$$C = (\text{Razão entre as fases} - 1,5) / 0,5$$

**TABELA 1A:** Condições experimentais e resultados obtidos com os ensaios no ponto ascendente.

| Ensaio | Fatores |   |       | Rendimento em atividade(%) |
|--------|---------|---|-------|----------------------------|
|        | A       | B | C     |                            |
| 1      | -1,00   | 0 | -1,00 | 12,9                       |
| 2      | -0,75   | 0 | -0,75 | 12,3                       |
| 3      | -0,50   | 0 | -0,50 | 6,7                        |

A = Condutividade (mS/cm); B = Frequência de pulsação (pulso/seg.); C = Razão entre as fases Aquosa/Orgânica

Uma vez que as condições do ensaio 1 foram adotadas como as coordenadas para o ponto central do novo planejamento fatorial, que vai determinar o modelo não linear, sendo o mesmo apresentado pelo planejamento fatorial completo  $2^3$  com face centrada, os níveis dos fatores neste planejamento são mostrados na TABELA 1B.

**TABELA 1B:** Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial completo  $2^3$  com face centrada e pontos centrais.

| Fatores |                                      | Níveis |     |      |
|---------|--------------------------------------|--------|-----|------|
|         |                                      | -1     | 0   | +1   |
| A       | Condutividade (mS/cm)                | 7,5    | 10  | 12,5 |
| B       | Frequência de pulsação (pulso/seg)   | 1:1    | 1:2 | 1:3  |
| C       | Razão entre as fases Aquosa/Orgânica | 0,5    | 1   | 1,5  |