

Universidade Estadual de Campinas

Faculdade de Engenharia Química

Área de Concentração

Desenvolvimento de Processos

Químicos

**EXTRAÇÃO EM SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS DE
XILANASE ALCALINA PRODUZIDA POR *Bacillus pumilus* E
APLICAÇÃO NO BRANQUEAMENTO DA POLPA KRAFT**

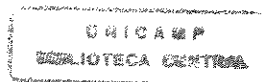
Mônica Andréa Bim

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Telma Teixeira Franco

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Química da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de
Mestre em Engenharia Química

Campinas-SP

Outubro, 1999



Este exemplar corresponde à redação final da Tese de
Mestrado em Engenharia Química.



Orientador (a)

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

B51e

Bim, Mônica Andréa

Extração em sistema de duas fases aquosas de
xilanase alcalina produzida por *Bacillus pumilus* e
aplicação no branqueamento da polpa kraft / Mônica
Andréa Bim. --Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientadora: Telma Teixeira Franco

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Xilanases. 2. Bacillus (Bactéria). 3.
Branqueamento. 4. Enzimas - Purificação. I. Franco,
Telma Teixeira. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

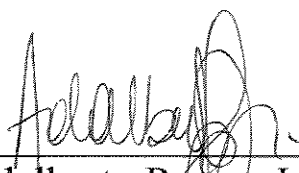
Dissertação de Mestrado defendida e aprovada no dia 4 de outubro de 1999 pela Banca Examinadora constituída pelos Professores Doutores:



Dr.^a. Telma Teixeira Franco –FEQ/UNICAMP
(Orientadora)



Dr. Elias Basile Tambourgi – FEQ/UNICAMP
(Titular)



Dr. Adalberto Pessoa Junior – FCF/USP
(Titular)

Campinas-SP

Outubro, 1999

DEDICATÓRIA

**Ao Gegê e a Mi,
meus queridos pais,
que me fizeram chegar até aqui**

AGRADECIMENTOS

Tenho muito a agradecer às pessoas que me acompanharam e me ajudaram durante esses anos. Espero não esquecer de ninguém.

Agradeço principalmente a Prof^a. Dr^a. Telma, que é uma excelente e exigente orientadora, nos mostrando que podíamos sempre fazer melhor superando nossos limites e além de tudo se mostrou uma ótima amiga. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi pela ajuda e pela gentileza em ceder o equipamento de extração contínua. Foi no laboratório do Prof. Elias que comecei a me interessar por biotecnologia quando fiz iniciação científica.

A Dr^a. Ana Paula B. Rabelo pela ajuda na parte de extração contínua e pela amizade.

Ao Eng. Flávio Tesser (Champion Papel e Celulose), ao Prof. Mangolini do IPT, que nos ajudaram na parte de branqueamento.

Aos meus queridos amigos de laboratório que sempre me ajudaram e tiveram a paciência de aturar o meu gênio e que carinhosamente me chamavam de Sargento. Vou sentir bastante saudade desse ambiente agradável do LEB.

- A Cris (minha irmãzinha loira);
- a Estelinha (eine schöne und spezielle Freunde von mir),
- o Chico (que sempre teve a maior paciência para me ajudar),
- a Popo (a agregada do nosso leb),
- o Érico (nosso mascotinho)
- a Zea, a Ana Paula, o Everaldo, a Lisanne, a Aninha, a Lucy, a Claudinha, a Angelita.

Aos funcionários da FEQ, Valmir, Eunir, Rosa, e aos meninos da oficina, principalmente o Alexandre e o Gustavo, sempre tão atenciosos conosco.

Ao Vanderlei que escaneava minhas figuras, imprimiu minha apresentação e sempre incentivou meu trabalho.

Ao Luís Fernando que me ajudou com a apresentação e ao Fabiano e a Montserrat que escaneavam meus géis.

Ao Eduardo que gentilmente fez o pI da minha amostra.

E a todos os outros amigos, que pela convivência agradável deixaram esses anos mais legais e alegres (Popo, Lu, Pops, Soraia, Richard, Ronald e os nossos vizinhos de laboratório).

SUMÁRIO

	página
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iv
NOMENCLATURA	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. <i>Degradação Enzimática de Xilanas</i>	3
2.2. <i>Purificação de Proteínas em Sistemas de Duas Fases Aquosas (SDFA)</i>	5
2.2.1. Tipos de SDFA e suas Aplicações	5
2.3. <i>Propriedade e Seletividade dos SDFA</i>	8
2.3.1 Efeito da Massa Molar do PEG	9
2.3.2. Efeito da Concentração do PEG	10
2.3.3. Efeito de Sais	11
2.4. <i>Coefficiente de Partição</i>	12
2.5. <i>Enzimas e Outras Proteínas Purificadas em SDFA</i>	13
2.6. <i>Processos de Purificação da Xilanase</i>	15
2.7. <i>Aplicações Industriais de Xilanases</i>	19
2.7.1. Aplicações na Polpa de Madeira	19
2.7.2. Outras Aplicações	28
2.8. <i>Processo de Produção e Branqueamento de Papel</i>	30
2.8.1. Processo de Branqueamento da Champion Papel e Celulose Ltda (Mogi Guaçu – SP).	32

3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1. <i>Caldo de Fermentação</i>	35
3.2. <i>Reagentes</i>	35
3.3. <i>Determinação da Atividade Xilanásica</i>	36
3.3.1. Preparação da solução de xilana	36
3.3.2. Preparação do reagente ADNS	36
3.3.3. Ensaio de atividade xilanásica	37
3.4. <i>Determinação de Proteínas</i>	37
3.4.1. Preparação da solução de Azul de Coomassie G250	38
3.4.2. Curva padrão	38
3.4.3. Quantificação de proteína nas amostras	38
3.5. <i>Eletroforese (SDS-PAGE)</i>	39
3.6. <i>Purificação da Xilanase em Sistemas de Duas Fases Aquosas (SDFA)</i>	39
3.6.1. Formação dos SDFA	39
3.6.2. Composição dos SDFA	40
3.6.3. Parâmetros de Avaliação da Purificação em SDFA	41
3.7. <i>Determinação das Linhas de Amarração</i>	44
3.7.1. Determinação da Concentração de Água	45
3.7.2. Determinação da Concentração de Fosfato	46
3.7.3. Determinação das Concentrações de PEG e NaCl	48
3.8. <i>Purificação da Xilanase em SDFA utilizando uma Coluna de Extração Contínua</i>	49
3.8.1. Alimentação da Coluna de Extração	50
3.8.2. Operação da Coluna	51
3.9. <i>Etapa Secundária de Purificação da Xilanase por Cromatografia de Troca Iônica (CTI)</i>	52
3.10. <i>Aplicação da Xilanase na Polpa Kraft</i>	54
3.10.1. Tratamento Enzimático da Polpa	54
3.10.2. Determinação do Número Kappa	56

3.10.3. Determinação da Viscosidade da Polpa	58
3.10.4. Determinação da Alvura	59
3.10.5. Cálculo da Eficiência de Deslignificação e Seletividade	59
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4.1. <i>Purificação em Sistemas de Duas Fases Aquosas (SDFA)</i>	60
4.2. <i>Extração em uma Coluna de Operação Contínua</i>	67
4.3. <i>Cromatografia de Troca Iônica (CTI)</i>	72
4.4. <i>Aplicação da Xilanase na Polpa Kraft</i>	77
5. CONCLUSÃO	81
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	82
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
ANEXOS	93

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1. Curva Binodal de um Sistema de Duas Fases Aquosas Composto de PEG6000-Dextrana. Linhas de Amarração A, B e C (“tie-lines”)	6
FIGURA 2.2. Comportamento das Proteínas em SDFA	13
FIGURA 2.3. Purificação de β -xilanases Obtidas por <i>Streptomyces sp.</i> (LUMBA e PENNINCKX, 1992)	15
FIGURA 2.4. Esquema de Purificação de Xilanase Produzida por <i>Streptomyces sp.</i> (ELEGIR et al., 1994)	16
FIGURA 2.5. Esquema de Purificação da Xilanase Produzida por <i>Bacillus sp.</i> (BLANCO et al, 1995)	17
FIGURA 2.6. Esquema de Purificação da Xilanase Obtida por <i>Bacillus sp.</i> (NAKAMURA et al, 1995)	17
FIGURA 2.7. Esquema de Purificação de Xilanases Produzidas pelo <i>Rhodotermus marinus</i> (DAHLBERG et al, 1996)	18
FIGURA 2.8. Mecanismos de Atuação da Xilanase A) Proposto por VIIKARI et al., 1991b e B) Proposto por Paice et al., 1992	28
FIGURA 2.9. Esquema Simplificado da Produção de Papel	31
FIGURA 3.1. Exemplo de uma Curva de Titulação da Fase Inferior de um SDFA Composto por 22% PEG6000, 10% K_2HPO_4 e 68% de água	47
FIGURA 3.2. Exemplo da Primeira Derivada da Curva de Titulação da Fase Inferior de um SDFA Composto por 22% PEG6000, 10% K_2HPO_4 e 68% de água	48
FIGURA 3.3. A) Esquema da Coluna de Extração Contínua com Campânulas Pulsantes e B) Foto da Coluna	50
FIGURA 3.4. Equipamento Utilizado para Cromatografia de Troca Iônica	52

FIGURA 3.5. Representação do Programa da Cromatografia de Troca Iônica: A) Q-Sepharose; B) SP-Sepharose	54
FIGURA 3.6. Esquema da Produção de Papel	55
FIGURA 3.7. Esquema do Viscosímetro	59
FIGURA 4.1. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida SDS. Coluna 1) Padrões de marcadores moleculares (Da): Fosforilase B: 94000, Albumina Bovina: 67000, Ovoalbumina: 43000, Anidrase Carbônica: 30000, Inibidor Tripsina de Soja: 20100 e α -Lactalbumina: 14400; 2) Caldo Bruto de Fermentação; 3) Fase Superior (ensaio 11) e 4) Fase Inferior (ensaio 11)	65
FIGURA 4.2. Comparação das Linhas de Amarração do SDFA composto por 22% PEG6000, 10% Fosfato e com 12% NaCl e sem NaCl	66
FIGURA 4.3. Atividade Xilanásica da Fase Superior e Inferior da Purificação da Xilanase em SDFA Utilizando Coluna de Extração Contínua. Frequência de Pulso: 1/1	69
FIGURA 4.4. Atividade Xilanásica da Fase Superior e Inferior da Purificação da Xilanase em SDFA Utilizando Coluna de Extração Contínua. Frequência de Pulso: 1/5	69
FIGURA 4.5. Coeficiente de Partição da Xilanase da Fase Superior e Inferior da Purificação da Xilanase em SDFA Utilizando Coluna de Extração Contínua. Frequência de Pulso: 1/1 e 1/5	70
FIGURA 4.6. Cromatograma Utilizando Resina Q-Sepharose e Gradiente de Sal. Solução A: Tampão Glicina-NaOH 50mM e pH 9,0. Solução B: Tampão Glicina-NaOH 50mM e pH 9,0 mais NaCl 1,5M	73
FIGURA 4.7. Cromatograma Utilizando Resina SP-Sepharose e Gradiente de Sal. Solução A: Tampão Glicina-NaOH 50mM e pH 9,0. Solução B: Tampão Glicina-NaOH 50mM e pH 9,0 mais NaCl 1,5M	74
FIGURA 4.8. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida SDS. Coluna 1) Padrões de marcadores moleculares (Da): Fosforilase B: 94000, Albumina Bovina: 67000, Ovoalbumina: 43000, Anidrase Carbônica: 30000, Inibidor Tripsina de Soja: 20100 e α -	

Lactoalbumina: 14400; 2) Fase Superior; 3) Amostra não Retida na Coluna e 4) Frações 19-20 Eluídas75

FIGURA 4.9. Ponto Isoelétrico Colunas 1 e 2) Padrões de marcadores moleculares: Amiloglucosidase pI 3,5; Inibidor de Tripsina de soja pI 4,55; β -Lactoalbumina pI 5,20; Anidrase bovina pI 5,85; Anidrase humana pI 6,55; Mioglobina ácida pI 6,85, Mioglobina básica pI 7,35; Lecitina ácida pI 8,15; Lecitina média pI 8,45; Lecitina básica pI 8,65 e Tripsinogênio pI 9,30; Colunas 3 e 4) Fase Superior.....76

FIGURA 4.10. Comparação do Tratamento Enzimático Feito com a Enzima Comercial e com a Xilanase Produzida no Laboratório79

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1. Sistemas Líquidos de Duas Fases Aquosas (ALBERTSSON, 1986)	7
TABELA 2.2. Biomoléculas purificadas em Sistemas de Duas Fases Aquosas	14
TABELA 2.3. Fornecedores Industriais de Xilanases (BAJPAL, 1999)	23
TABELA 2.4. Condições de Operação para Branqueamento com Xilanase	24
TABELA 2.5. Resultados das Seqüências de Branqueamento Obtidas por MILAGRES (1994)	25
TABELA 2.6. Resultados das Seqüências de Branqueamento Obtidas por BOCCHINI (1997)	26
TABELA 3.1. Valores Reais dos Níveis Codificados dos Fatores do SDFA Estudados no Planejamento Fatorial Fracionário	40
TABELA 3.2. Matriz do Planejamento Fatorial 2^4 Fracionado em $\frac{1}{2}$ para Determinar o Melhor Sistema de Purificação para a Xilanase	41
TABELA 3.3. Programa da Cromatografia de Troca Iônica para Q-Sepharose e SP-Sepharose	53
TABELA 3.4. Condições para branqueamento da polpa de celulose com a enzima comercial Pulpzyme	55
TABELA 3.5. Condições para branqueamento da polpa de celulose com enzima produzida por <i>Bacillus pumilus</i> no Laboratório de Engenharia Bioquímica	56
TABELA 3.6. Fator f para Corrigir Diferentes Porcentagens do Consumo de Permanganato (TAPPI Test Method, T 236 cm-85)	58
TABELA 4.1. Coeficientes de Partição (K_{enzima} e $K_{proteína}$), Fatores de Purificação (FP) e Rendimento (R) Obtidos nos SDFA	62

TABELA 4.2. Coeficientes de Partição (K_{enzima} e $K_{proteina}$), Fatores de Purificação (FP) e Rendimento (R) Obtidos no SDFA (II)	67
TABELA 4.3. Composição das Linhas de Amarração do SDFA Composto por 22% PEG6000, 10% K_2HPO_4 e 12% NaCl	68
TABELA 4.4. Aplicação da Xilanase em Polpa Kraft	77

NOMENCLATURA

C_D	Aplicação de cloro e dióxido de cloro
CTI	Cromatografia de Troca Iônica
D	Aplicação de dióxido de cloro
Da	Dalton
E_{OP}	Extração alcalina com hidróxido de sódio e peróxido
FP	Fator de Purificação
K	Coefficiente de Partição
K_{enzima}	Coefficiente de Partição da Enzima
$K_{proteina}$	Coefficiente de Partição das Proteínas Contaminantes
MM	Massa Molar
O	Oxidação com oxigênio
P	Aplicação de peróxido
R	Rendimento (%)
R_V	Razão de Volume do SDFA
S	Seletividade
SDFA	Sistema de Duas Fases Aquosas
U	Unidade de atividade enzimática
X	Aplicação de xilanase

RESUMO

A xilana, a qual é hidrolisada pela xilanase, é um abundante biopolímero encontrado no tecido de vegetais como constituinte principal da parede celular. Muitas das xilanases comercialmente disponíveis são produzidas por fungos com atividade ótima a pHs ácidos ou neutros e a temperaturas abaixo de 45°C. Existem várias aplicações para a xilanase, mas o seu maior potencial de uso é na indústria de papel e celulose nos processos de branqueamento da polpa. Deste modo, xilanases ativas em condições alcalinas são potencialmente úteis nos processos de branqueamento de polpa de papel sem necessidade de mudanças no pH do processo e com a vantagem de diminuir a quantidade de componentes organoclorados nos efluentes das indústrias de papel.

As duas motivações principais deste trabalho foram: primeiro, utilizar sistema de duas fases aquosas (SDFA) para extrair e purificar a xilanase do caldo de fermentação, produzido por *Bacillus pumilus*, pois o uso de SDFA pode ser uma alternativa mais econômica e de fácil operação, para purificação de bioprodutos, visto que as etapas de extração e purificação representam até 80% do custo destes bioprodutos. Segundo, aplicar a xilanase no branqueamento da polpa kraft de eucalipto visando a redução de organoclorados no efluente das indústrias de papel e celulose.

A purificação primária da xilanase foi desenvolvida por partição em SDFA. O efeito da MM do PEG e das concentrações de PEG e sais (K_2HPO_4 e NaCl) foram investigadas sobre o fator de purificação e rendimento da xilanase, utilizando um planejamento estatístico. O melhor sistema estudado foi o composto por 22% de PEG6000, 10% de K_2HPO_4 e 12% de NaCl com um fator de purificação de 40 e 98% de rendimento. A purificação secundária foi desenvolvida por cromatografia de troca iônica (CTI) em resina SP-Sepharose (resina catiônica).

A aplicação da xilanase no branqueamento da polpa kraft de eucalipto resultou em redução de 5 unidades no número Kappa (índice que mede teor de deslignificação da polpa), sendo este resultado superior aos resultados apresentados na literatura e indicando o alto potencial da xilanase no branqueamento de polpas de papel.

ABSTRACT

Xylan, a group of heteropolysaccharides, is an abundant biopolymer found in plant tissues as major component of cell wall, which is hydrolysed by xylanase. Several of the xylanases commercially available produced by fungi are active at neutral or acidic pH and their optimum temperature is below 45°C. Various applications for xylanases in bioconversion and food industries have been suggested and one of the major potential applications of xylanases involves the pulp and paper industry. This way, enzymes which are active at alkaline conditions have great potential in bleaching process without any need for changes in pH and with the advantage in lowering the release of polluting organic chlorine compounds.

The two main motivations of this work was: first, to extract and to purify the enzyme from the crude fermentation broth, produced by *Bacillus pumilus*, using aqueous two phase systems (ATPS). Second, application of xylanase from crude fermentation broth at hardwood kraft pulp bleaching.

The enzyme from crude fermentation broth was extracted by partitioning in ATPS composed of phosphate and polyethyleneglycol (PEG). The effect of tie-line length, PEG molecular weight and NaCl and phosphate concentrations upon the purification factors and yields of xylanase were investigated by statistical design. The best system studied was that one containing 22% PEG6000, 10% K₂HPO₄ and 12% NaCl with a purification factor of 40 and 97% yield of enzyme activity. Cation exchange chromatography was used as a second step purification.

The effect of xylanase treatment on hardwood pulp was so significant. It was achieved 5 units decrease in kappa number (index of delignification) indicating that xylanase has a high potential use in kraft pulp bleaching.

1. INTRODUÇÃO

Enzimas brutas vêm sendo produzidas em larga escala industrial por várias décadas. A tecnologia básica para o seu desenvolvimento consiste de processos sofisticados que incluem: seleção ("screening") de microrganismos da natureza, desenvolvimento da espécie por mutação para obter altos rendimentos e pureza, cultivo do organismo selecionado no meio de cultura e sob condições que induzem a formação da enzima, e finalmente clarificação, concentração e estabilização do caldo fermentado, a fim de obter a preparação enzimática (FALCH, 1991).

Com o avanço nas técnicas de engenharia genética, foi possível produzir proteínas de interesse e em quantidade elevada. Contudo, a tecnologia para a extração e purificação de proteínas não tem acompanhado estes avanços. O alto custo associado com a necessidade de atingir um produto com alta pureza, dificultam as aplicações destes produtos na medicina, agricultura e na indústria. Assim análises econômicas mostram que o custo destas etapas de purificação podem atingir até 80% do custo total da biomolécula. É necessário desenvolver processos de purificação seguros, simples e que atinjam elevada pureza a custos baixos.

O principal processo de purificação usado para purificação de enzimas é a cromatografia (de troca iônica, interação hidrofóbica e de bioafinidade), o qual pode alcançar altos graus de pureza e é relativamente simples (COONEY, 1984). Contudo, ela apresenta problemas no escalonamento, não podendo ser utilizada de maneira totalmente contínua e apresentando alguns problemas de transferência de massa (CARLSON, 1988).

Uma alternativa para esses problemas vem sendo estudada através da substituição das etapas cromatográficas por extração em sistemas líquidos de duas fases aquosas (SDFA). O uso de SDFA pode proporcionar significativo aumento do fator de purificação e rendimento em uma única etapa. Escalas pequenas podem ser linearmente ampliadas até 10.000 vezes sem perda significativa da eficiência (CARLSON, 1988).

Até o final da década de 80, o uso de enzimas era ausente na indústria de celulose e papel. Mas com o aumento das exigências a fim de se minimizar os impactos ambientais, vem sendo cada vez mais freqüente o estudo do uso de xilanases nos processos de branqueamento da polpa kraft, reduzindo o consumo de produtos químicos, principalmente o cloro, e consequentemente de efluentes nocivos ao meio ambiente como, por exemplo, organoclorados e dioxinas (DURAN *et al.*, 1995).

Apesar de não ser necessário o uso da xilanase pura para aplicação na polpa kraft, a purificação é importante para se conhecer o tipo de xilanase que está sendo produzida pela fermentação do *Bacillus pumilus*, e melhor caracterizada, por exemplo, quanto a massa molar e condições de pH e temperaturas nas quais a enzima é ativa.

Este trabalho investigou a purificação da xilanase em sistemas de duas fases aquosas (SDFA) e numa segunda etapa foi utilizado cromatografia de troca iônica (CTI). Também foram realizados ensaios de aplicação da xilanase na polpa kraft.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Degradação Enzimática de Xilanas

Os materiais lignocelulósicos, primariamente compostos de celulose, hemicelulose e lignina, constituem a principal fonte de biomassa do planeta, a partir dos quais muitos alimentos ou produtos químicos podem se derivar. A hemicelulose representa 20-35% do total de carboidratos desses materiais, sendo formada de diferentes resíduos de açúcares como xilose, manose, galactose, glicose ou arabinose.

A hemicelulose apresenta como constituinte principal a xilana, um heteropolímero composto de ligações β -1,4 de resíduos de D-xilanopirosil (DETROY, 1981). Esta cadeia pode estar substituída com grupos glucuronosil, arabinosil ou acetil, dependendo do vegetal ao qual constitui. No caso de madeiras duras, tais como de eucalipto e bétula (birch), o grupo substituinte é o O-acetil-4-O-metilglucuranoxilana, e em madeiras moles como de pinus e de vários resíduos da agricultura, é o arabino-4-O-metilglucuranoxilana.

A degradação enzimática da hemicelulose se dá pela ação sinérgica de endo e exo-xilanases (1,4- β -D-xilana hidrolase), que hidrolisam a cadeia principal de xilana, e β -xilosidases (β -D-xilosideo xilohidrolase) que hidrolisam xilooligômeros. Ainda, para a hidrólise completa de heteroxilo-oligossacarídeos, são necessárias enzimas que hidrolisem os grupos substituintes (BIELY, 1985).

A matéria prima de várias indústrias de alimentos, rações e de papel e celulose, tem como componente integral o polissacarídeo hemicelulolítico xilana. Para implementar os processos de produção ou gerar novos produtos, xilanases são indispensáveis uma vez que têm a habilidade para modificar esses polissacarídeos.

Pressões de mercado, ambientais e legislativas têm forçado as indústrias de papel a modificarem seus processos de polpação e branqueamento, para reduzir o impacto

ambiental de seus efluentes. Desta forma, xilanases têm sido empregadas durante o processo de pré-branqueamento da polpa de madeira, com intuito de diminuir a carga de cloro utilizada na etapa subsequente de branqueamento da polpa kraft (SENIOR *et al.*, 1989). A remoção seletiva da xilana da polpa pelo uso de xilanases microbianas, além de apresentar uma maior especificidade no branqueamento do material, diminui a poluição ambiental, uma vez que os processos químicos de branqueamento são as principais fontes de poluição da indústria de papel. Deste modo o uso de xilanases no branqueamento do papel representa uma nova tecnologia para redução do uso de cloro. Entretanto, o aprofundamento das pesquisas é necessário para um melhor entendimento do mecanismo de ação da xilanase no branqueamento de polpas, visando a otimização do tratamento com xilanase e com combinações dos outros estágios de branqueamento. Contudo parece improvável que o cloro seja totalmente substituído pelo tratamento com xilanase, para isso seria necessário desenvolver enzimas capazes de também degradar a lignina residual da polpa (DANEALT *et al.*, 1994).

Atualmente, várias xilanases têm sido isoladas a partir de fungos filamentosos, leveduras, bactérias e actinomicetos (WONG *et al.*, 1988). Em vistas do crescente interesse comercial dessas enzimas, trabalhos que visem selecionar microrganismos produtores de xilanases bem como a caracterização e otimização da produção destas enzimas são de grande importância, visto que a aplicação da xilanase em grande escala depende do preço e da disponibilidade da enzima no mercado.

DUARTE *et al.* (1999) investigaram mais de 500 colônias de microrganismos com atividade xilanolítica e selecionaram 3 dos melhores microrganismos capazes de produzir xilanase a pH 10, isentos de celulase. Três desses microrganismos capazes de produzir xilanase alcalina utilizando xilana como única fonte de carbono foram identificados como *Bacillus pumilus*.

2.2. Purificação de Proteínas em Sistemas de Duas Fases Aquosas (SDFA)

A tendência de uma mistura de dois polímeros (como a gelatina e o ágar ou a gelatina e o amido solúvel) de se separarem em duas fases distintas é conhecida desde o século passado. Tem sido observado que outros polímeros hidrossolúveis comportam-se da mesma maneira. Soluções de dextranas e polietilenoglicóis em água apresentam-se turvas e acima de determinadas concentrações produzem duas fases em equilíbrio: a inferior (mais densa) enriquecida em dextrana e a fase superior (menos densa) enriquecida em polietilenoglicol (PEG). Os dois polímeros são totalmente hidrossolúveis mas incompatíveis e, portanto, separam-se em duas fases sendo que esta separação de fases no sistema é resultante da mistura do solvente aquoso com os dois polímeros (ou um polímero e um sal) em razão das interações energéticas desfavoráveis entre as moléculas (ALBERTSSON, 1986). O mesmo autor (1971) desenvolveu também a aplicabilidade do sistema em duas fases aquosas (SDFA) em biologia, isolando pigmentos, organelas celulares e purificando inúmeros componentes biológicos nestas duas décadas. O SDFA tem sido muito empregado por fornecer um meio adequado e não agressivo a materiais biológicos visto a maior parte do sistema ser constituída de água. Além disso os SDFA possuem baixa tensão interfacial entre as fases o que torna a partição das enzimas entre as fases não “agressiva” (ALBERTSSON, 1986; ASENJO *et al.*, 1990).

2.2.1. Tipos de SDFA e suas Aplicações

Sistemas líquidos em duas fases aquosas podem ser inúmeros e se classificam em diferentes grupos de acordo com suas composições (TABELA 2.1). Os SDFA podem ser representados por diagramas (FIGURA 2.1), a região acima da curva binodal é a região

onde há duas fases e as linhas de amarração representam a composição de equilíbrio entre as fases.

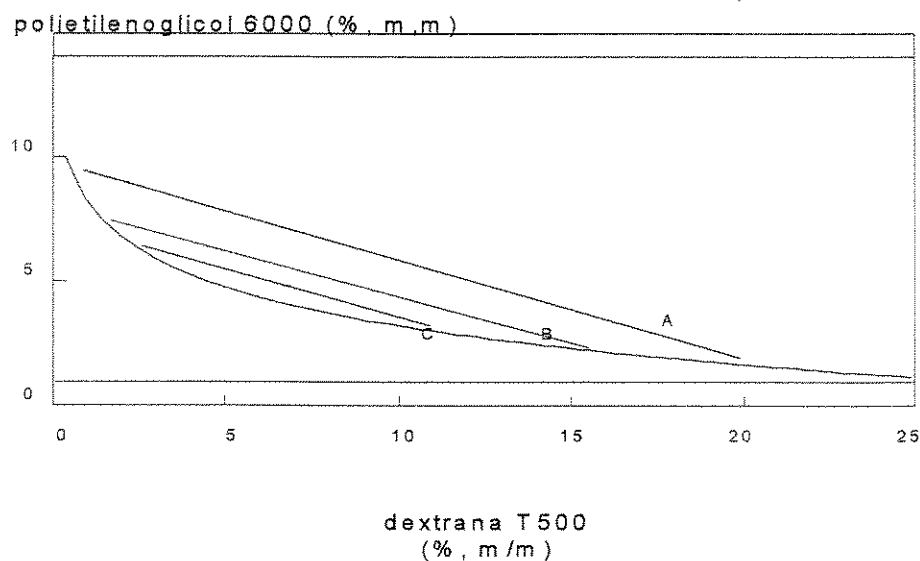


FIGURA 2.1. Curva Binodal de um Sistema de Duas Fases Aquosas Composto de PEG 6000-Dextrana. Linhas de amarração A, B e C ("tie-lines").

O comprimento das linhas de amarração é responsável por muitos efeitos envolvidos na partição dos componentes. A teoria de Flory-Huggins prevê que o coeficiente de partição aumenta exponencialmente com o aumento da diferença da composição entre as fases. De maneira geral o aumento das linhas de amarração promovem alteração da partição de proteínas (CARLSON, 1988).

Os sistemas tipo "polímero/sal" apesar de não rigorosamente estudados têm sido largamente utilizados na purificação de proteínas em larga escala ao contrário dos sistemas PEG/dextrana. Os sistemas PEG/sal foram introduzidos na indústria por razões práticas: maior tamanho relativo das gotas, maior diferença de densidade entre as fases, menor viscosidade e menor custo do que sistemas constituídos por dois polímeros, em relação aos

sistemas PEG/Dextrana, promovendo separação de fases muito mais rapidamente. A sua utilização foi também facilitada pela disponibilidade de separadores comerciais que permitiram rápida e contínua separação de proteínas (KRONER *et al.*, 1978; KULA *et al.*, 1982). Alguns autores têm investigado a transferência de massa de enzimas em sistemas de extração contínuos: BHAWSAR *et al.* (1994) estudaram a extração de enzimas em colunas de pratos perfurados, PATIL *et al.* (1991) em colunas empacotadas, PAWAR *et al.* (1997) em uma coluna “spray” modificada. Coluna de discos rotativos perfurados foi utilizada para extração, utilizando SDFA e micelas reversas, de citocromo b5 de *Escherichia coli* e cutinase recombinante de *E. coli* (PORTO *et al.*, 1997; CARNEIRO DA CUNHA *et al.*, 1996). COIMBRA *et al.* (1998) estudaram as características hidrodinâmicas de uma coluna de discos perfurados utilizando SDFA.

Com o objetivo de minimizar a poluição ambiental diferentes maneiras de reutilizar os sais de fosfato foram desenvolvidas como por exemplo sua reciclagem com utilização de álcool. O PEG proveniente da fase superior também pode ser sucessivamente reciclado (KRONER *et al.* 1978). Mais tarde, sistemas compostos de PEG/sulfato foram estudados. VERNAU e KULA (1990) desenvolveram um SDFA utilizando citratos na tentativa de diminuir a poluição ambiental. Citrato é considerado biodegradável, menos tóxico e pode ser despejado em plantas de tratamento de resíduos.

TABELA 2.1. Sistemas Líquidos de Duas fases Aquosas (ALBERTSSON, 1986)

CLASSE I: POLÍMERO NÃO IÔNICO - POLÍMERO NÃO IÔNICO - ÁGUA	
Polipropilenoglicol	Metoxipolietilenoglicol
	Álcool polivinílico
	Hidroxipropil-dextrana
	Dextrana
Polietilenoglicol (PEG)	Álcool polivinílico
	Dextrana
Álcool polivinílico	Metilcelulose
Metilcelulose	Hidroxipropil-dextrana
	Hidroxipropil-dextrana
	Dextrana
Etilhidroxietilcelulose	Dextrana

CLASSE II: POLIELETRÓLITO - POLÍMERO NÃO IÔNICO - ÁGUA

Sulfato de dextrana de sódio	Polipropilenoglicol Metoxi - PEG - NaCl PEG - NaCl Álcool polivinílico-NaCl
Carboximetilcelulose de polipropilenoglicol	Dextrana - NaCl NaCl
DEAE-dextrana-HCl	PEG - NaCl Álcool polivinílico-NaCl Metilcelulose-NaCl Etilhidroetilcelulose-NaCl Hidroxipropil-dextrana-NaCl Polipropilenoglicol + NaCl PEG + LiSO ₄ Metilcelulose Álcool polivinílico

CLASSE III: POLIELETRÓLITO - POLIELETRÓLITO - ÁGUA

Sulfato de dextrana de sódio Sulfato de dextrana de sódio Carboximetildextrana de sódio Sulfato de dextrana de sódio	Carboximetildextrana de Na Carboximetilcelulose de Na Carboximetilcelulose DEAE dextrana - HCl NaCl
---	--

CLASSE IV: POLÍMERO-COMPOSTO BAIXA MASSA MOLAR - ÁGUA

Polipropilenoglicol Metoxipropilenoglicol Polietilenoglicol	Fosfato de potássio Fosfato de potássio Fosfato de potássio
---	---

2.3. Propriedade e Seletividade dos SDFA

As propriedades dos sistemas líquidos de duas fases aquosas podem ser moduladas através da manipulação das seguintes variáveis: massa molar e concentração dos polímeros (ou sais), alterações de pH e força iônica, adição de outras moléculas ou pela introdução de ligantes específicos de afinidade nos componentes de uma das fases (KULA *et al.* 1982). Os efeitos de massa molar (MM), concentração, densidade de fases, presença de outros sais

foram também detalhadamente investigados em sistemas formados por PEG/dextrana. A partição das proteínas também depende muito de suas propriedades como tamanho, hidrofobicidade, carga e bioespecificidade, dentre as quais a hidrofobicidade e a carga parecem ser as de maior importância em SDFA. As propriedades superficiais das proteínas e as propriedades do sistema determinarão como se dará a partição dessas proteínas no sistema (ALBERTSSON, 1971, 1986; ASENJO *et al.*, 1990; FRANCO *et al.*, 1990, 1996 a, b).

FRANCO *et al.* (1996 a, b) estudaram a hidrofobicidade intrínseca e a capacidade de resolução de diversos SDFA para proteínas com valores diferentes de hidrofobicidade superficial. Proteínas hidrofóbicas são preferencialmente particionadas na fase superior (fase rica em PEG) dos SDFA, a adição de NaCl melhora ainda mais essa partição pois aumenta a hidrofobicidade da fase rica em PEG.

A seletividade dos SDFA pode ser significativamente aumentada com o uso de ligantes bioespecíficos ligados ou não a uma das fases. A maioria dos contaminantes será coletada na fase mais polar enquanto que a proteína alvo será enriquecida na fase menos polar contendo o ligante. Os ligantes utilizados podem ser específicos para uma determinada proteína (substrato, inibidores, anticorpos, proteína A) ou específicos para um grupo de proteínas (cofatores, corantes de triazina). Ao fim do processo os ligantes podem ser retirados por ultrafiltração, permeação em gel ou mesmo por partição nos sistemas de duas fases aquosas (ANDREWS e ASENJO, 1989).

2.3.1 Efeito da Massa Molar do PEG

A massa molar do PEG influencia a partição das proteínas de modo que as proteínas são mais atraídas por polímeros de menor massa molar e repelidas por polímeros de maior massa molar (ALBERTSSON *et al.*, 1987). Mas esse efeito também depende da massa molar e da hidrofobicidade da proteína a ser separada. Proteínas com massas molares

maiores são mais influenciadas pelas mudanças na massa molar dos polímeros do que as proteínas com menor massa molar (ASENJO *et al.*, 1990; HUDDLESTON *et al.*, 1991). Segundo KULA *et al.* (1982) a diminuição da massa molar do PEG diminui a hidrofobicidade da fase rica em PEG.

As diferentes massas molares dos polímeros podem ser usadas para facilitar as separações de moléculas de proteínas de diferentes tamanhos. Como exemplo temos o trabalho de SCHMIDT *et al.* (1994) que utilizou um sistema PEG/Fosfato para recuperação da α -amilase. Eles observaram que os maiores valores dos coeficientes de partição da α -amilase foram obtidos para as menores massas molares do PEG. Também foi observado que o aumento da massa molar do PEG de 600 para 6000 não alterou significativamente a proporção de volume das fases formadas.

2.3.2. Efeito da Concentração do PEG

Próximo do ponto crítico de um sistema de fases, as moléculas, tais como proteínas, migram igualmente entre as fases. Se a concentração dos polímeros (PEG, por exemplo) for aumentada, o valor de K poderá aumentar ou diminuir de acordo com o deslocamento do sistema. Em geral, o coeficiente de partição pode aumentar quando for feita a adição de um polímero, atingindo um valor máximo, e em seguida diminuir quando houver adição de uma nova carga de polímero (DIAMOND e HSU, 1992). Isto também pode ser explicado pelo aumento do comprimento das linhas de amarração com o aumento da concentração de polímero e segundo CARLSON (1988) e HUDDLESTON e LYDDIATT (1990) o aumento das linhas de amarração provoca o aumento da partição.

Estudos feitos por SCHMIDT *et al.* (1994) mostraram que o aumento da concentração do PEG num sistema PEG/Fosfato causou o decréscimo de 3,2 vezes no coeficiente de partição da α -amilase (K de 45 para 14). Também observaram que para

outro sistema, PEG4000/Fosfato, houve o aumento de 5 vezes no valor de K (K de 1,6 para 7,8) com o aumento da concentração do PEG de 14% para 20%.

2.3.3. Efeito de Sais

A adição de sais nos SDFA pode afetar a partição das proteínas de diferentes maneiras. Uma é alterando propriedades físicas do sistema, como comprimento das linhas de amarração (HUDDLESTON e LYDDIATT, 1990) e também a diferença de hidrofobicidade entre as fases (ZASLAVSKY *et al.*, 1982) que afeta a partição das proteínas de acordo com sua carga.

Segundo FRANCO *et al.* (1996 a, b) a adição de NaCl aumenta a hidrofobicidade da fase rica em PEG aumentando assim o coeficiente de partição de proteínas mais hidrofóbicas. CHIANG e WANG (1988) observaram uma dramática diminuição no coeficiente de partição da L-aspartase com adição de NaCl devido a mudança de hidrofobicidade entre as fases. LEE e SANDLER (1990) encontraram um aumento exponencial do coeficiente de partição da vancomicina com o aumento da adição de NaCl. CASONE *et al.* (1991) obtiveram um aumento de 62 vezes no coeficiente de partição da taumatina (K=0,53 para K=33) num sistema PEG6000/Fosfato com a adição de 8,8% de NaCl. DUARTE *et al.* (1999) observaram o aumento de 360 vezes no coeficiente de partição de proteínas (K=0,3 para K=108) com a adição de 12% de NaCl num sistema PEG6000/Fosfato.

2.4. Coeficiente de Partição

Para substâncias solúveis (ex: enzimas e proteínas) o coeficiente de partição, K , representa a distribuição de suas moléculas entre as duas fases líquidas do SDFA. Ele é expresso pela relação entre a concentração de moléculas P na fase superior sobre a concentração da mesma na fase inferior do SDFA:

$$K = \frac{[P]_{\text{Fase Superior}}}{[P]_{\text{Fase Inferior}}}$$

Para a enzimas o K é calculado pela relação entre a atividade da enzima na fase superior pela atividade da mesma na fase inferior:

$$K_{enzima} = \frac{\text{Atividade da enzima}_{\text{Fase Superior}}}{\text{Atividade da enzima}_{\text{Fase Inferior}}}$$

O coeficiente de partição é calculado tanto para enzima alvo (K_{enzima}) como para as proteínas contaminantes ($K_{proteínas}$). Para separar dois ou mais componentes em uma única, ou poucas, etapas precisa-se manipular os coeficientes de partição de modo que o componente alvo fique em uma das fases e os contaminantes na outra fase ou na interface, assim para atingir uma purificação efetiva, o K_{enzima} e o $K_{proteínas}$ têm que ser inversamente proporcionais. É interessante que o material particulado, tal como resíduos celulares ou células inteiras, se direcionem para a fase inversa onde a proteína alvo será coletada

A FIGURA 2.2 ilustra um comportamento ideal das proteínas para que se ocorra uma purificação efetiva.

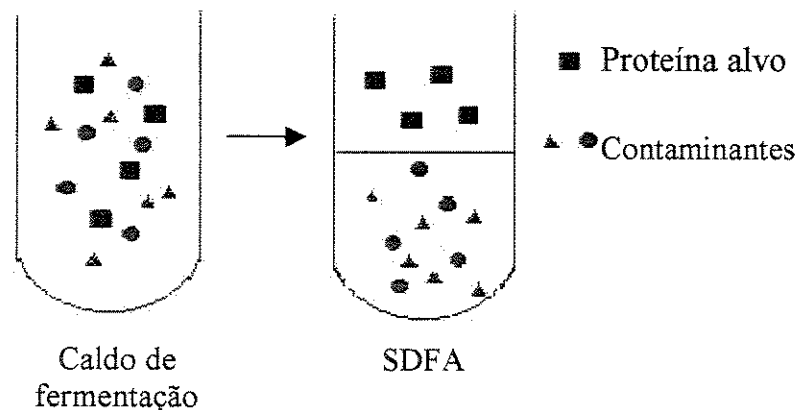


FIGURA 2.2 Comportamento das Proteínas em SDFA.

2.5. Enzimas e Outras Proteínas Purificadas em SDFA

A literatura relata a utilização e as principais vantagens dos sistemas líquido-líquido de duas fases aquosas na extração e purificação de proteínas: possibilidade de integração ao processo, operação contínua, controle de processo facilitado, menor custo (KULA, 1990; KULA *et al.*, 1982; KRONNER *et al.*, 1978; ASENJO *et al.*, 1990; ALBERTSSON, 1986).

Estes sistemas são utilizados principalmente para o enriquecimento da proteína alvo em uma das fases ou para concentração dos resíduos celulares nas primeiras etapas do processo. Os contaminantes mais comuns (pigmentos, ácidos nucleicos, outras proteínas, polissacarídeos) podem ser removidos por partição na fase oposta à fase enriquecida na proteína alvo (KULA, 1990; ANDREWS e ASENJO, 1989).

Para tornar o sistema mais econômico a massa celular processada deve ser máxima possível, cuidando-se para evitar o deslocamento do equilíbrio entre as fases e a diminuição da eficiência da separação. Algumas vezes poderá ser necessária mais do que uma etapa de

separação envolvendo SDFA, como no caso da proteína alvo ser coletada (enriquecida) na fase superior e a maior parte dos contaminantes na inferior numa primeira etapa. A seguir, numa segunda etapa, adiciona-se uma diferente fase à fase anterior (enriquecida na proteína alvo), produzindo um SDFA completamente diferente, onde a proteína alvo poderá ser coletada, desta vez na fase inferior já com muito menos contaminantes, este exemplo pode ser ilustrado pela purificação da xilanase obtida por GAIKAIWARI *et al* (1996). Outras etapas podem ser necessárias para melhor purificação; no entanto, em geral, não mais que três etapas são necessárias. Ao fim do processo extrativo o polímero poderá ser recuperado através de ultrafiltração e a fase salina poderá ser reciclada.

A TABELA 2.2. mostra algumas biomoléculas purificadas em SDFA, descritas pela literatura.

TABELA 2.2. Biomoléculas Purificadas em Sistemas de Duas Fases Aquosas.

Biomolécula	Numero de Etapas	Recup. (%)	Fator Purific.	Referência
Xilanase	1	41	57	DUARTE <i>et al.</i> (1999)
Lisozima	1	68	NR	SILVA e FRANCO (1999)
Lactato dehidrogenase	1	80	8	FRANCO <i>et al.</i> (1997)
Quitosanase	1	91	5,2	PIZA <i>et al.</i> (1999)
β -glucosidase	NR	85 - 95	2-3	JOHANSSON & RECZEY (1998)
β -galactosidase	NR	90	NR	CHANG & KOO (1998)
Xilanase	NR	98	2,3	GAIKAIWARI (1996)
Fumarato hidratase <i>E. coli</i>	NR	93	3,4	BOLAND <i>et al.</i> (1989)
Penicilina amidase <i>E. coli</i>	NR	90	8,2	
β -galactosidase <i>E. coli</i>	NR	87	9,3	

NR: Não relatado

2.6. Processos de Purificação da Xilanase

A purificação de xilanases tem sido feita geralmente por técnicas convencionais de cromatografia em coluna, principalmente por troca iônica e filtração em gel e de interação hidrofóbica (WONG *et al.*, 1986). O baixo valor da massa molar de algumas xilanases tem dificultado sua separação de outras proteínas quando se emprega ultrafiltração. Entretanto, interações adsorptivas de xilanases de baixa massa molar (~20 kDa) com o gel de matrizes de resina, tornam possível a eluição de enzimas menores do que 12 kDa. Até agora a literatura tem mostrado a necessidade de várias etapas para se atingir uma purificação adequada.

Em 1992, LUMBA e PENNINCKX purificaram β -xilanases obtidas por *Streptomyces sp.* usando três etapas: precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e filtração em gel. Na cromatografia de troca iônica foram separadas duas frações com atividade xilanásica, denominadas I e II. Na filtração em gel a fração I foi separada em IA e IB. As xilanases IA, IB e II têm respectivamente as seguintes massas molares: 32, 22 e 21 kDa e ponto isoeletrico de: 6,8, 8,9 e 5,2, respectivamente. A FIGURA 2.3 representa o esquema da purificação.

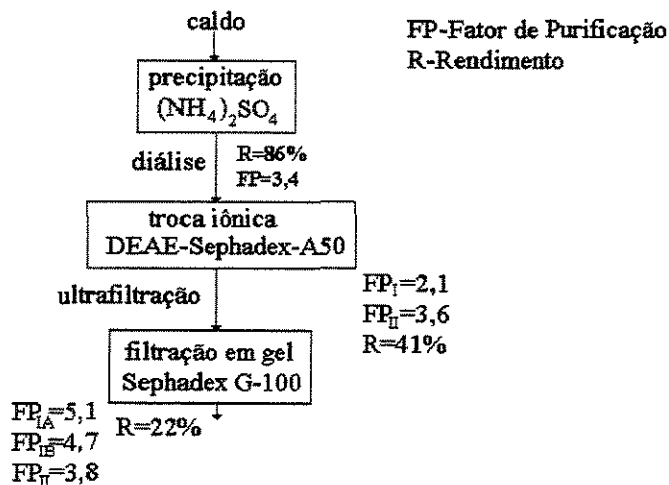


FIGURA 2.3 Purificação de β -xilanases Obtida por *Streptomyces sp.* (LUMBA e PENNINCKX, 1992).

ELEGIR *et al*, (1994) purificaram 5 xilanasas produzidas pelo *Streptomyces sp.* em meio contendo aveia como substrato. O esquema de purificação é exemplificado na FIGURA 2.4:

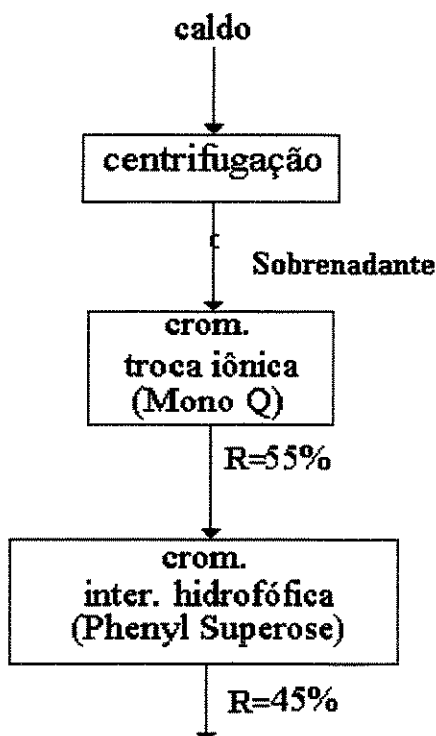


FIGURA 2.4 Esquema de Purificação de Xilanase Produzida por *Streptomyces sp.* (ELEGIR *et al*, 1994)

BLANCO *et al*, (1995) purificaram xilanase produzida por *Bacillus sp.* de massa molar 32kDa e ponto isoeletrico 9,3. O esquema de purificação utilizado está representado abaixo:

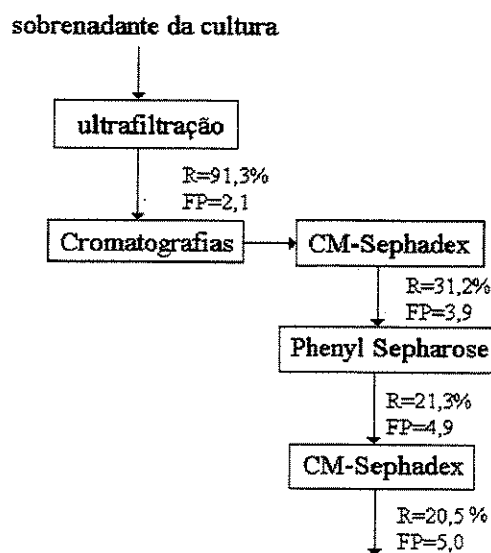


FIGURA 2.5 Esquema de Purificação da Xilanase Produzida por *Bacillus* sp. (BLANCO *et al*, 1995).

Xilanase alcalina produzida por *Bacillus* sp. foi purificada por NAKAMURA *et al.* (1995) usando 3 passos básicos: centrifugação, precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica, a xilanase apresentou massa molar de 40 kDa e ponto isoeletrico de 4,1. O esquema de purificação é mostrado na FIGURA 2.6.

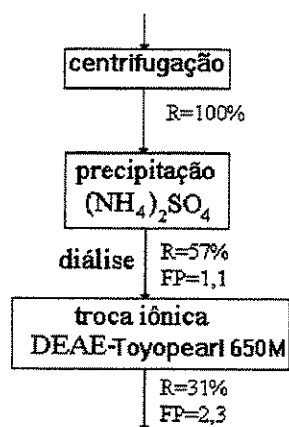


FIGURA 2.6 Esquema de Purificação da Xilanase Obtida por *Bacillus* sp. (NAKAMURA *et al*, 1995).

Xilanase produzida por *Rhodotermus marinus* foi separada e caracterizada por DAHLBERG *et al.*, (1996).

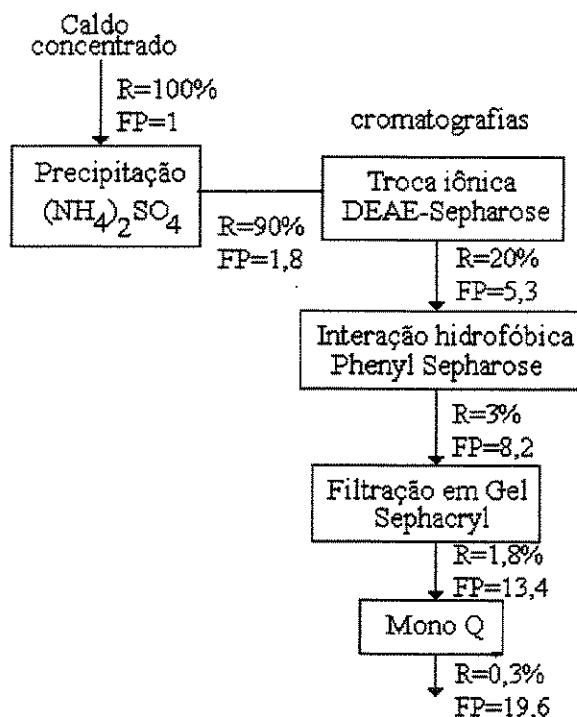


FIGURA 2.7 Esquema de Purificação de Xilanases Produzidas pelo *Rhodotermus marinus* (DAHLBERG *et al.*, 1996).

GAIKAIWARI *et al.* (1996), separaram xilanase resistente a temperaturas e pHs elevados produzida por *Bacillus*, usando sistemas de duas fases aquosas (PEG8000/K₂HPO₄). Foram testados 8 sistemas de duas fases aquosas (SDFA) com concentrações de PEG e fosfato diferentes com recuperação de mais de 85% da xilanase. Observaram que a enzima foi recuperada na fase superior do sistema contendo 8% de sal e 16% de PEG sendo que as células bacterianas ficaram na fase inferior. Obtiveram um rendimento de 98% e um enriquecimento de 2,3. A enzima recuperada na fase PEG foi

reextraída em outro SDFA com 12% de sal e 8% de PEG, a enzima foi recuperada na fase salina e o material pigmentado na fase PEG.

COSTA *et al.* (1998) purificou xilanase obtida da fermentação de *Penicillium janthinellum* em sistemas de duas fases aquosas compostos por 8,8% PEG4000, 10% de fosfato de potássio e 6,0% de NaCl, obtendo um fator de purificação de 1,34 com 80% de recuperação da xilanase na fase superior do sistema. Os trabalhos de GAIKAIWARI *et al.* (1996) e COSTA (1998) foram uns dos poucos trabalhos de purificação de xilanase em SDFA encontrados na literatura.

2.7. Aplicações Industriais de Xilanases

2.7.1. Aplicações na Polpa de Madeira

A aplicação biotecnológica potencial de xilanases na polpa de madeira e na indústria do papel foi revisada por vários autores, dentre eles BOURBONNAIS *et al.* (1991), DANEULT *et al.* (1994), DURAN *et al.* (1995), ERIKSSON (1991) e VIIKARI *et al.* (1991, 1994). A aplicação mais promissora para xilanases é no pré-branqueamento da polpa kraft, que consiste em descolorir e remover os resíduos de lignina da polpa lavada. Face às pressões legislativas ambientais, as indústrias de papel e celulose estão modificando o processo de branqueamento da polpa, bem como as tecnologias do tratamento de seus efluentes, para reduzir os impactos ambientais (WONG e SADDLER, 1992).

A incorporação de xilanases ao pré-branqueamento tem sido considerada importante, uma vez que permite o uso de cargas menores de cloro durante o

branqueamento da polpa kraft e menor quantidade de resíduos organoclorados gerados (VIAKARI *et al.*, 1991). Em um trabalho do início desta década, para o National Biotechnology Advisory Committee of Canada, BOURBONNAIS *et al.* (1991) identificaram o pré-branqueamento da polpa com xilanase como um dos processos biotecnológicos mais promissores a serem aplicados na indústria do papel num futuro próximo.

É bom salientar que não é necessária a purificação da xilanase para aplicação no branqueamento de polpas kraft. A purificação é necessária para se conhecer as propriedades da enzima visto que para que seja viável a aplicação industrial de xilanases em branqueamento de polpa de papel alguns critérios devem ser observados (SAMAIN *et al.*, 1997):

- O caldo enzimático não deve apresentar atividade celulásica para evitar a hidrólise das fibras de celulose.
- A massa molar da enzima deve ser baixa para facilitar sua difusão nas fibras da polpa.
- A enzima deve ser estável e ativa a alta temperatura e pH alcalino.
- A enzima deve ser obtida com alta produtividade e baixo custo.

VIAKARI *et al.* (1986) sugeriram a utilização da enzima para deslignificação de polpas de papel. Xilanases mostraram ser agentes úteis no pré-branqueamento de polpas kraft derivadas tanto de madeiras duras como moles. Um rápido desenvolvimento no uso de xilanases para este fim foi devido, em partes, às considerações econômicas favoráveis, tais como a disponibilidade das enzimas comerciais a preços razoáveis, ao baixo capital de investimento necessário para implementação, e a redução dos custos do tratamento dos efluentes (WONG e SADDLER, 1992).

Preparações de xilanases de *Trichoderma* spp têm sido usadas para estudos de branqueamento. Em experimentos de laboratório realizados pela Novo Laboratórios Ltda., a redução do cloro necessário durante estágios de cloração de madeira dura foi na faixa de 35 a 41% e de madeira mole, na faixa de 10 a 26% (WONG e SADDLER, 1992). Tais pré-tratamentos, foram realizados utilizando-se 1 a 5 Kg de enzima comercial para cada tonelada de polpa seca, com tempos de incubação de 0,5 a 3 horas. A comparação de duas xilanases de *T. reesei* Rut C30, sugeriu que a enzima que solubilizou relativamente mais xilana a partir de polpa de Pinus, também forneceu um melhor efeito no aumento do branqueamento (TENKANEN *et al.*, 1992).

Xilanases produzidas por *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* foram usadas em testes de pré-branqueamento em polpas de madeira mole e madeira dura (TREMBLAY e ARCHIBALD, 1993). O pré-branqueamento teve maiores efeitos na madeira dura, diminuindo em 22% o consumo de Cl_2 e reduzindo em mais de 50% os resíduos organoclorados no efluente.

Entretanto, as condições alcalinas dos estágios de pré-branqueamento, têm direcionado as pesquisas para o desenvolvimento de xilanases tolerantes a álcali. Termotolerância é também uma característica desejável, uma vez que a temperatura dos estágios de pré-branqueamento atinge a faixa de 50 a 100°C.

As modificações das propriedades do papel pelo pré-tratamento da polpa com xilanase do actinomiceto termofílico, *Saccharomonospora viridis*, foram estudadas por ROBERTS *et al.* (1990). Este microrganismo produz xilanase extracelular, sem apresentar atividade celulásica. Esta propriedade foi explorada pela aplicação das preparações da enzima bruta, em polpa de bétula e resultou na remoção seletiva de aproximadamente 20% do total de xilana presente. Papel preparado a partir da polpa tratada por este método, apresentou modificações em suas propriedades físicas, das quais um decréscimo na ruptura e um aumento na resistência tênil foram os mais significantes. SENIOR *et al.* (1992) e YANG *et al.* (1993) relataram uma melhora na alvura e viscosidade da polpa após o tratamento enzimático.

PAICE *et al.* (1992) observaram que os efeitos de xilanases no branqueamento da polpa estão associados com uma marcante redução no grau de polimerização da xilana. Essas observações foram consistentes com a hipótese de que os efeitos do pré-branqueamento resultam primariamente da despolimerização, mas não necessariamente na solubilização das hemiceluloses derivadas da xilana.

A habilidade de uma preparação bruta de xilanase de *Aureobasidium pullulans*, para hidrolisar xilana de polpa sulfite, foi examinada por CHRISTOV e PRIOR (1993). O principal produto da degradação foi xilose. Foi observado que o grau de remoção de pentosanas foi de 31% e que dependeu do tempo e quantidade de enzima usada no tratamento.

A produção de xilanase por uma linhagem de *Escherichia coli* e de *Bacillus cereus*, clonadas com um gene de *B. subtilis*, foi acompanhada por TREMBAY e ARCHIBALD (1993). Ambas as xilanases melhoraram a deslignificação de polpas kraft de madeira dura e de madeira mole, reduzindo assim o cloro necessário para o branqueamento do material, sem alterar as propriedades das fibras.

SILVA *et al.* (1994) desenvolveram pesquisa no sentido de isolar linhagens de microrganismos produtores de xilanases altamente termoestáveis, bem como de purificar e caracterizar suas enzimas. O termofílico *Humicola* sp secretou xilanases termoestáveis quando cresceu sobre meio de farelo de trigo a 50°C. Três frações de xilanases foram identificadas. Um esforço foi feito para melhorar as propriedades da polpa kraft de eucalipto da Champion Papel e Celulose Ltda. (Mogi-Guaçu - BR), pelo uso destas enzimas, tendo sido observado uma redução da quantidade de cloro necessário para o branqueamento da polpa. Mais recentemente BOCCHINI *et al.* (1997) isolaram uma linhagem bacteriana alcalofílica e termofílica, denominada *Bacillus sp-1*, capaz de produzir xilanase. Esta xilanase foi aplicada à pasta kraft de eucalipto proporcionando a redução de uma unidade no número Kappa e com o aumento de aproximadamente 4 unidades na alvura com relação a pasta que não sofreu tratamento enzimático.

DUARTE *et al.* (1999) investigaram mais de 500 colônias de microrganismos com atividade xilanólítica e selecionaram 3 dos melhores microrganismos capazes de produzir xilanase a pH 10, isentos de celulase. Três desses microrganismos capazes de produzir xilanase alcalina utilizando xilana como única fonte de carbono foram identificados como *Bacillus pumilus*. A produção de xilanase pelo *Bacillus pumilus* vêm sendo otimizada para aplicação no branqueamento de polpas kraft.

Enzimas ativas em pH alcalino e temperatura ótimas foram isoladas e testadas no branqueamento de polpas (HÖGMAN *et al.*, 1992; JÄGER *et al.*, 1992; SENIOR *et al.*, 1992). Algumas linhagens de *Bacillus sp.* tolerantes a álcalis produziram xilanases com pH ótimo em torno de 9,0 (BAJPAI, 1997). O pH ótimo das preparações comerciais de xilanase varia entre 8-9 e com temperatura ótima em torno de 60°C.

Dentre as preparações comerciais de xilanases indicadas para tratamento da polpa de madeira, três são produzidas a partir de *Trichoderma spp* que foi modificado a partir de engenharia genética: Pulpzyme HA (Novo Laboratórios Ltda.) de *T. reesei*; Albazyme (Cultor Ltda.) e Ecopulp (Alko Ltda.) de *T. longibrachiatum* (WONG e SADDLER, 1992). A TABELA 2.3. mostra uma lista dos fornecedores comerciais de xilanases usadas no branqueamento de polpas.

TABELA 2.3. Fornecedores Industriais de Xilanases (BAJPAI, 1999)

FORNECEDOR	PRODUTO
Clariant, UK	Catarzyme HS10, HT, SR 10, OS 10, NS 10 e MP
Genencor, Finlândia	Irgazyme 40-4X
Voest Alpine, Austria	VAI Xylanase
Novo Nordisk, Dinamarca	Pulpzyme HA, HB e HC
Biocon India, Bangalore	Bleachzyme F
Rohn Enzyme OU, Finlândia	Ecopulp X-100, X-200, X-200/4, TX-100, TX-200 e XM
Solvay Interlox, EUA	Optipulp L-8000
Thomas Swan Co., UK	Ecozyme
Iogen Corp., Canada	GS-35 e HS-70

Os fatores que influenciam o tratamento da polpa com xilanase são: pH, temperatura, dosagem da enzima e dispersão na polpa, consistência e tempo de reação. O pH e temperaturas ótimas para tratamento variam de acordo com a enzima utilizada. A TABELA 2.4 mostra algumas condições de aplicação da xilanase encontradas na literatura. Geralmente, xilanases de origem bacteriana são mais efetivas em pHs entre 6 e 9, enquanto que as derivadas de fungos trabalham melhor em pHs ácidos entre 4 e 6. A temperatura ótima varia entre 35 e 60°C. Em geral, a dosagem ótima de xilanase aplicada a polpa está entre 2-5 U por grama de polpa seca. Os efeitos do tratamento enzimático podem ser observados em apenas 1 ou 2 horas de tratamento (BAJPAI, 1999; SKERKER *et al.*, 1992).

TABELA 2.4. Condições de Operação para Branqueamento com Xilanase

REFERÊNCIA	CARGA (U/g polpa seca)	CONSISTÊNCIA (%)	pH	TEMPO (h)	T (°C)
VIKARI <i>et al.</i> , 1986	nd.*	2,5	5,0	24,0	45
SENIOR e HAMILTON, 1992	5	6	5,5-6,0	2,0	50
SKERKER <i>et al.</i> , 1992	nd.*	2,5-12	4,0-8,0	0,5-3,0	40-65
TOLAN e CANOVAS, 1992	1-5	10	4,8	16,0	50
YANG <i>et al.</i> , 1993	2	10	5,0	1,5	50
SENIOR e HAMILTON, 1992	5	12	5,5-6,5	2,0	50
MILAGRES, 1994	10	10	5,5	3,0	40
BOCCHINI <i>et al.</i> , 1997	13,5	10	5,6	4,0	60
Condições de operação recomendadas para tratamento com xilanase	Madeira Dura 1-3	Maior que 3	Enz. Fúngicas 4,0-6,0	Menor que 3	40-60
	Madeira Mole 5-8	Ótimo 5-10	Enz. Bacterianas 6,0-9,0	Ótimo 1,0-2,0	

* não determinado

MILAGRES (1994) utilizou xilanase obtida pela fermentação do *Penicillium janthinellum* para aplicação na polpa de papel. O teste foi realizado com 1U/g de polpa com 10% de consistência na temperatura de 40°C por 180 min. O número Kappa inicial (o número Kappa mede a eficiência da deslignificação) era de 15,2 e viscosidade de 31,1. A TABELA 2.5 mostra os resultados obtidos com 5 seqüências diferentes de branqueamento.

TABELA 2.5. Resultados das Seqüências de Branqueamento Obtidas por MILAGRES (1994)

SEQÜÊNCIA	N ^o KAPPA	VISCOSIDADE
XOPE _{OP} DP	10,2	18,3
OXPE _{OP}	9,6	19,6
O	11,7	25,0
OX	10,9	25,5
XO	10,0	22,7

Onde:

- X aplicação da xilanase
- O oxidação com O₂
- P peroxidação
- E extração
- E_{OP} extração oxidativa (com O₂ e peróxido)
- D aplicação de dióxido de cloro

BOCCHINI *et al.* (1997) utilizaram xilanase isenta de celulase obtida pela fermentação do *Bacillus sp-1* para aplicação na pasta kraft de eucalipto. O teste foi realizado com 13,5U/g de polpa seca com 10% de consistência na temperatura de 60°C, pH 5,6 por 240min. O valor do número Kappa inicial era de 13,8 e a alvura inicial de 37,0. A TABELA 2.6 mostra os resultados obtidos com 3 seqüências de branqueamento. Observa-se que com o tratamento enzimático houve a redução de 1 unidade do nº Kappa e aumento da alvura se comparada com a polpa sem tratamento enzimático. A redução do nº Kappa acontece devido a ação da xilanase na polpa permitindo uma melhor ação dos químicos e um conseqüente aumento do grau de deslignificação da polpa indicado pela redução do Kappa.

TABELA 2.6. Resultados das Seqüências de Branqueamento Obtidas por BOCCHINI (1997)

SEQÜÊNCIA	Nº KAPPA	ALVURA
X DE (com 23% a menos de ClO ₂)	1,70	60,0
DE (sem tratamento enzimático)	2,70	56,5

Onde:

- X aplicação da xilanase
- E extração
- D aplicação de dióxido de cloro

Uma indústria de papel e celulose canadense (Weyerhaeuser Pulp and Paper Mill) vem utilizando o tratamento enzimático com xilanase nas etapas de branqueamento da polpa. Desde maio de 1997 eles estão utilizando na planta uma xilanase

(BioBrite™HB60C) de *Trichoderma* modificado por engenharia genética. O uso dessa enzima possibilitou a redução de 8,2% no consumo de ClO_2 e 21% no consumo de NaOH significando uma economia de 7,8% no custo total dos reagentes químicos do branqueamento.

2.7.1.1. Mecanismo de Atuação da Xilanase

Os mecanismos pelos quais as xilanases atuam sobre a polpa de madeira não estão bem esclarecidos. Existem algumas teorias que tentam explicar a redução do uso de cloro usados no branqueamento através da hidrólise da xilana. Uma delas diz que a hidrólise da xilana pela xilanase forma microporos que aumentam a área específica da polpa facilitando a ação dos produtos químicos (NOE *et al.*, 1986). Sabe-se que a xilana inicialmente dissolvida pode reprecipitar na superfície da polpa devido a redução da alcalinidade durante o cozimento, e segundo outra teoria a xilanase hidrolisaria parte dessa xilana facilitando o acesso dos reagentes químicos na remoção da lignina (VIAKARI *et al.*, 1991 e DANEULT *et al.*, 1994) (FIGURA 2.8-A). A terceira teoria sugere que a lignina está ligada a polissacarídeos através dos complexos lignina-carboidratos e que algumas dessas ligações são resistentes a álcalis não se hidrolisando durante o cozimento da polpa, a xilanase hidrolisaria a xilana ligada a lignina a pequenos fragmentos facilitando sua remoção nas extrações subsequentes (PAICE *et al.*, 1992) (FIGURA 2.8-B).

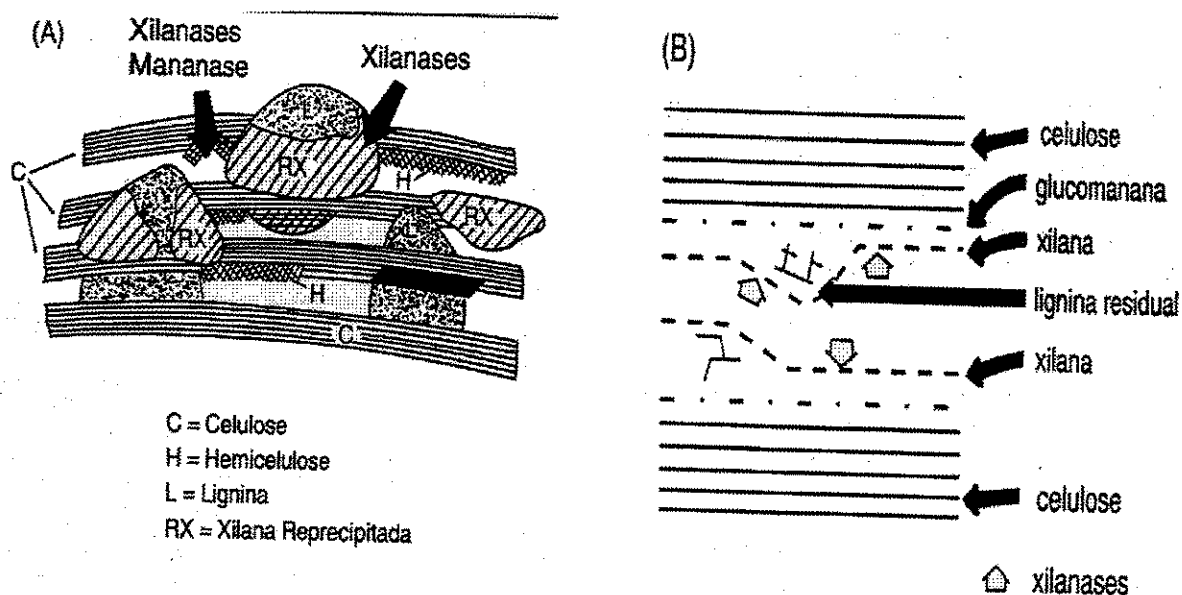


FIGURA 2.8. Mecanismos de Atuação da Xilanase A) Proposto por VIHKARI *et al.*, 1991b e B) Proposto por Paice *et al.*, 1992

2.7.2. Outras Aplicações

O uso de xilanases foi proposto para clarificação de sucos e vinhos (BECK e SCOTT, 1974; BIELY, 1985, 1991), para extração de café, óleos vegetais e amido (BIELY, 1991), para melhorar as propriedades nutricionais de grãos armazenados (LINKO *et al.*, 1989), para maceração da parede celular de vegetais (BECK e SCOTT, 1974), e para fornecer diferentes texturas a produtos de panificação (McCLEARY, 1986). Muitas dessas aplicações não requerem xilanases purificadas, e a presença de celulasas e/ou pectinases são freqüentemente desejáveis. Algumas delas já estão em uso (WONG e SADDLER, 1992).

Existe também interesse na produção de xilose, xilobiose e xilooligômeros. Muitos trabalhos mostram que tais açúcares podem ser preparados por hidrólise enzimática da xilana (PELLERIN *et al.*, 1991), enquanto outros açúcares podem ser adicionados usando a atividade de enzimas de transglicosilação, tais como β -xilosidase. Esses açúcares contendo xilose podem ser úteis para pesquisas bem como por suas propriedades reológicas.

De acordo com WONG e SADDLER (1992), com exceção da conversão de xilose a xilitol, a bioconversão de material lignocelulósico a açúcares fermentescíveis parece não ser economicamente viável devido a outras fontes mais competitivas tais como amido e sacarose. Entretanto, a acumulação massiva de resíduos da agricultura está criando um grande volume de estoque de alimentos de baixo valor. Uma alternativa que tem sido considerada é a bioconversão para produzir etanol, proteína celular, enzimas, e outros materiais químicos ricos em xilana.

Um isolado do fungo *Penicillium janthinellum*, que produz grandes quantidades de xilanase sem apresentar atividade de celulase, foi usado como um sistema modelo para estudar a produção e indução da enzima, e para ilustrar o uso de tais preparações na recuperação de fibras celulósicas têxteis (MILAGRES, 1994). Para produção de xilanase em larga escala, a fração hemicelulósica obtida de bagaço de cana-de-açúcar foi investigada como um abundante e eficiente indutor. Um sistema de cultivo em dois estágios, no qual o micélio foi primeiro produzido dentro de condições não indutíveis, e depois transferido para o meio indutível, demonstrou que a produção de xilanase depende das fontes de carbono não indutoras. Foi observado ainda que a síntese de xilanase começou somente depois que as reservas intracelulares se esgotaram. Os resultados sugeriram que vegetais utilizados na produção de fibras têxteis são alvos potenciais para o tratamento enzimático com microrganismos produtores de xilanases.

A empresa Novo Nordisk produziu uma xilanase com atividade específica para uso na separação das frações do trigo. Esta enzima foi denominada comercialmente de ShearzymeTM. Ela age nos arabinoxilanos solúveis que são indesejáveis porque formam complexos moleculares com o amido solúvel e a proteína, que aprisionam o amido valioso (chamado amido "A" de alto grau) e a proteína. Esta enzima foi testada em unidades piloto

da Novo Nordisk na Dinamarca mostrando uma melhora no rendimento do glúten e do amido “A”. Além do aumento do rendimento, a adição de Shearzyme aumentou em 11% a capacidade do equipamento de processamento além de haver uma diminuição no consumo de água usada para extração do amido (<http://www.novo.dk/index.html>).

2.8. Processo de Produção e Branqueamento de Papel

O processo de fabricação de papel mais usado é o Kraft que utiliza sulfito, bissulfito e íons OH^- para degradar a lignina da madeira deixando-a solúvel no licor de cozimento.

Sob condições de alta temperatura e pressão, 90 a 95% da lignina é modificada ou solubilizada. A xilana também fica dissolvida no licor devido à alta temperatura e pH. Mas a medida que o processo ocorre a alcalinidade diminui e a xilana se precipita sobre as fibras de celulose.

A FIGURA 2.9 mostra um esquema simplificado da produção e branqueamento de papel

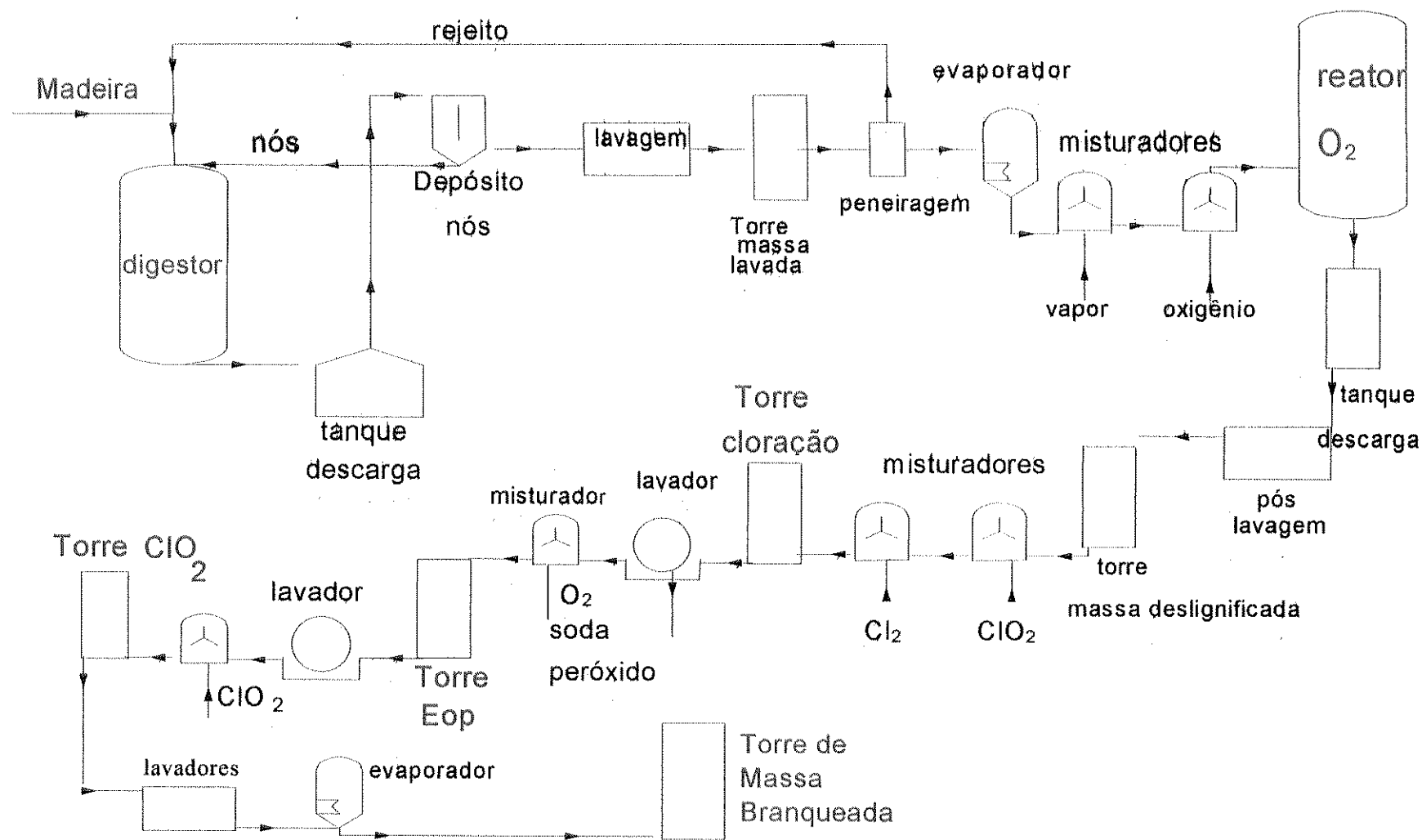


FIGURA 2.9. Esquema Simplificado da Produção de Papel

2.8.1. Processo de Branqueamento da Champion Papel e Celulose Ltda (Mogi Guaçu – SP).

O branqueamento pode ser definido como um tratamento físico-químico que tem por objetivo melhorar as propriedades da pasta celulósica, obtendo um elevado grau de alvura, com custo mínimo dos reagentes e equipamentos utilizados, sem comprometer as características físicas do produto.

A celulose e a hemicelulose (por exemplo, a xilana) são brancas e não contribuem para a cor da pasta. Os principais responsáveis pela cor são os grupos cromóforos da lignina aliados à presença de íons metálicos, como ferro e cobre, que formam complexos coloridos com os grupos fenólicos da lignina.

O branqueamento compreende em geral duas etapas: remoção da lignina residual (oxidação e cloração) e modificação das substâncias coloridas da pasta (hipocloração, peroxidação). Deve-se atingir um ponto de equilíbrio entre a alvura desejada e os valores especificados das propriedades físicas. Os parâmetros usuais que medem a eficiência do branqueamento são as propriedades ópticas da pasta (alvura, reversão e opacidade) relacionadas com a absorção e reflexão da luz, o número Kappa avalia a eficiência da deslignificação e a viscosidade da pasta avalia a degradação sofrida pelos carboidratos durante o processo.

O processo de produção da celulose segue a sequência abaixo:

Matéria-prima fibrosa: *Eucalyptus grandis* (8 anos de idade)

- densidade básica da madeira 470-520 kg seco/m³

- $\left\{ \begin{array}{l} \text{celulose} - 70\% \left\{ \begin{array}{l} \alpha - \text{celulose } 83\% \\ \beta \text{ e } \gamma - \text{celulose } 18 - 20\% \end{array} \right. \\ \text{lignina} - 25\% \\ \text{extrativos} - 4\% \\ \text{cinzas} - 1\% \end{array} \right.$

Cozimento: cozinhador contínuo “ESCO”

- tempo de retenção : 70 minutos
- temperatura: 173°C
- carga de álcali: 17% álcali ativo como Na₂O/madeira seca
- relação licor/madeira: 3,0L/kg madeira seca
- viscosidade polpa marrom: > 45cp (45-70)
- álcali ativo residual: 5-7g/L
- teor de rejeitos: < 3%
- Kappa após cozimento: 15

Deslignificação:

- temperatura: 93-96°C
- tempo: 90 minutos
- oxigênio aplicado: 15-20 kg/ton
- soda: 1:1 c/ O₂
- Kappa após a deslignificação: 10
- consistência: 10%
- pH após lavagem: 10

Branqueamento:

- sequência: C_DE_{OP}D
- alvura final: 89°GE

- viscosidade final: 18-24cp

C_D

- consistência: 5%
- pH: 2,0
- temperatura: 50-55°C
- tempo: 30 minutos
- cloro aplicado: 17kg/ton celulose A.D. branqueado (celulose com umidade do ar)
- dióxido aplicado: 3,3 kg/ton.

E_{OP}

- consistência: 10%
- pH: 10,5
- temperatura: 70°C
- tempo: 60 minutos
- consumo de soda: 13-14kg/ton
- consumo peróxido: 1-3 kg/ton.
- consumo de oxigênio: mínimo
- Kappa: 1,0
- Alvura: 72-75°GE

D

- consistência: 10%
- pH: 3,5-4,0
- temperatura: 75-80°C
- tempo: 150-180 minutos
- ClO₂ aplicado: 4,0kg/ton
- alvura: 89°GE

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Caldo de Fermentação

O caldo de fermentação foi obtido por fermentação do *Bacillus pumilus* e gentilmente fornecido por Cristiane Vanessa Tagliari. O microrganismo foi previamente isolado por DUARTE *et al.* (1999) e identificado como *Bacillus pumilus* na “Fundação Tropical André Tosello” (Campinas – SP).

O microrganismo foi mantido em meio sólido contendo xilana de milho. A composição do meio de cultura foi de: 1% de xilana de bétula; 0,1% de peptona; 0,1% de Tween80; 1,4 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2,0 g/L de KH_2PO_4 ; 0,3 g/L de uréia; 0,3 g/L de CaCl_2 ; 0,3 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5 mg/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,6 mg/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 1,4 mg/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 2,0 mg/L de CoCl_2 (MANDELS e STENBERG, 1976).

A xilanase foi produzida a 40°C em reator de 2,0 litros (Bioflow III - New Brunswick Scientific, New York, USA) com volume inicial de meio de cultura de 1,5 litros. O pH foi inicialmente ajustado em 9,5. A concentração de oxigênio dissolvido foi monitorada e mantida a 50% de saturação por controle automático do fluxo de ar e da agitação.

3.2. Reagentes

Todos os reagentes utilizados são de grau analítico.

3.3. Determinação da Atividade Xilanásica

A determinação de xilanase foi feita pela quantificação de açúcares redutores totais liberados a partir da xilana, de acordo com o método de BAILEY *et al.* (1992) modificado para pH 10. Os açúcares redutores foram dosados pelo método do DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico) (MILLER, 1959) usando D-xilose como padrão. O resultado final foi calculado pela diferença entre os açúcares redutores totais após a hidrólise enzimática da xilana e os açúcares presentes no caldo de fermentação.

3.3.1. Preparação da solução de xilana

Uma solução de xilana a 1% foi preparada dissolvendo-se 1g de xilana de bétula (birchwood - SIGMA) em 80 mL de tampão glicina-NaOH 1M, pH 10,0. A solução foi aquecida até ebulição, e após retornar à temperatura ambiente o volume foi completado para 100 ml com o referido tampão.

3.3.2. Preparação do reagente ADNS

O reagente foi preparado dissolvendo-se 1,06 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico, 1,98 g de hidróxido de sódio, 30,60 g de tartarato de sódio e potássio e 0,83 g de bissulfito de sódio em 100 mL de água destilada. A mistura foi agitada até total dissolução dos reagentes, sendo a seguir adicionados 0,76 mL de fenol e o volume completado para 140 mL com água destilada.

3.3.3. Ensaio de atividade xilanásica

Uma alíquota de 0,9 mL de xilana (1%) foi colocada em tubos de ensaio e incubada a 45°C em banho termostatizado, durante 5 minutos. Após incubação, foi adicionado 100 µL da enzima (se necessário pode-se diluí-la apropriadamente em tampão pH 10), foram aguardados 5 minutos no banho a 45°C e a seguir adicionados 1,5 mL do reagente DNS e deixados em água em ebulição por 5 minutos. O teste foi realizado a pH 10.

A interrupção da reação foi feita por resfriamento dos tubos em banho de gelo, e a absorbância a 540 nm em espectrofotômetro UV/VIS 911-A da GBC. A calibração do aparelho foi feita com um branco, onde a enzima foi substituída por tampão glicina-NaOH 1M, pH 10.

A curva padrão foi construída com solução de D-xilose (MERCK), nas concentrações entre 2 e 10 µmol/mL.

Uma unidade de atividade enzimática corresponde à quantidade desta capaz de catalisar a liberação de 1 µmol de açúcar redutor expresso por xilose/min nas condições citadas.

3.4. Determinação de Proteínas

A concentração de proteínas em ambas as fases do SDFA foi determinada de acordo com o método de SEDMAK e GROSSBERG (1977). Este método se fundamenta na reação colorimétrica entre os grupos aromáticos da proteína e o corante azul brilhante de Coomassie em meio ácido.

3.4.1. Preparação da solução de Azul de Coomassie G250

O corante azul de Coomassie G250 foi preparado a 0,06% (m/v) em solução 2,2% de HCl (m/v, 0,6 N) e filtrado em papel Whatman nº 1 para remoção de material insolúvel. Alguns lotes do corante possuem uma coloração mais intensa que outras, assim a solução preparada acima, se necessário, pode ser diluída com HCl 2,2% até atingir uma absorbância entre 1,3-1,5 a 465nm (SEDMAK e GROSSBERG, 1977).

3.4.2. Curva padrão

A curva padrão foi construída a partir de uma solução estoque de proteína albumina bovina (BSA) - 0,2 mg/mL.

A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro (UV/VIS 911-A da GBC) à 595nm. A curva foi construída considerando a concentração de proteínas em mg/tubo, na ordenada e a absorbância na abscissa.

3.4.3. Quantificação de proteína nas amostras

À temperatura ambiente, 500 µL da amostra a ser analisada foram colocados em tubos de ensaio, e o volume completado para 1000 µL com água destilada. Foi adicionado 1500 µL do corante Blue Coomassie e a leitura de absorbância foi feita em espectrofotômetro à 595 nm. As absorbâncias foram comparadas com as da curva padrão de BSA.

3.5. Eletroforese (SDS-PAGE)

Eletroforese em condições desnaturantes foi utilizada na caracterização das massas molares das enzimas de acordo com ANDREWS (1986) para avaliação do perfil das proteínas após cada etapa de purificação. Esta determinação foi utilizada na caracterização da enzima purificada e seus principais contaminantes.

Géis de poliacrilamida foram preparados com 12% T. A eletroforese foi desenvolvida por 40 minutos a voltagem constante de 200 V no equipamento Mini-Protean da Bio-Rad de acordo com as instruções do fornecedor.

A coloração dos géis foi realizada com o “kit” de prata da Bio-Rad (Bio-Rad Silver Stain). Esse “kit” é composto de uma solução oxidante (dicromato de potássio e ácido nítrico), uma solução de nitrato de prata, a solução reveladora (carbonato de sódio e paraformaldeído) e o gel é fixado com uma solução de ácido acético e metanol.

3.6. Purificação da Xilanase em Sistemas de Duas Fases Aquosas (SDFA)

3.6.1. Formação dos SDFA

Os SDFA foram preparados, de acordo com FRANCO *et al.* (1996 b) em tubos de ensaio graduados de 10 mL contendo aproximadamente 10 g de sistema. Composições diferentes de SDFA foram utilizadas para comparação da melhor eficiência da recuperação da enzima, de acordo com o planejamento experimental descrito no item 3.6.2. Cada

composição foi realizada em duplicata. Os tubos foram centrifugados à 6000g durante 5 minutos e as fases superiores e inferiores separadas com o auxílio de pipetas Pasteur.

3.6.2. Composição dos SDFA

A composição dos SDFA foi feita visando obter melhor eficiência na recuperação da enzima, sem afetar suas propriedades bioquímicas.

A otimização foi baseada na técnica de planejamento experimental que vem sendo cada vez mais utilizada (BARROS NETO *et al.*, 1995).

A otimização foi feita baseada num planejamento fatorial fracionário misto de 2 e 3 níveis com 4 fatores, MM do PEG, concentração de PEG, concentração de fosfato e concentração de NaCl. Esse tipo de modelo é similar ao planejamento fatorial fracionário de 2 níveis, mas permite que um dos fatores possa ser analisado a 3 níveis, sendo particularmente útil quando se trabalha com variáveis descontínuas, como é o caso da MM (massa molar) do PEG (HAALAND *et al.* 1989).

As TABELAS 3.1 e 3.2 abaixo mostram os níveis codificados dos fatores e a matriz do planejamento fatorial, respectivamente.

TABELA 3.1. Valores Reais dos Níveis Codificados dos Fatores do SDFA Estudados no Planejamento Fatorial Fracionário

VARIÁVEL	SÍMBOLO	VALORES REAIS DOS NÍVEIS		
		-1	0	+1
MM do PEG	X ₁	1500	4000	6000
Concentração do PEG %	X ₂	16	19	22
Concentração do fosfato %	X ₃	10	11,5	13
Concentração do NaCl %	X ₄	0	6	12

OBS: O caldo de fermentação centrifugado (ausência de células) foi adicionado para que a soma das concentrações de PEG, fosfato, NaCl e caldo seja 100 %.

TABELA 3.2. Matriz do Planejamento Fatorial 2^4 Fracionado em $\frac{1}{2}$ para Determinar o Melhor Sistema de Purificação para a Xilanase

Nº DO ENSAIO	NÍVEIS CODIFICADOS DAS VARIÁVEIS				VALORES REAIS DAS VARIÁVEIS			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	MM PEG	% PEG	% fosfato	% NaCl
1	-1	-1	-1	-1	1500	16	10	0
2	-1	-1	+1	+1	1500	16	13	12
3	-1	+1	-1	+1	1500	22	10	12
4	-1	+1	+1	-1	1500	22	13	0
5	0	-1	-1	+1	4000	16	10	12
6	0	-1	+1	-1	4000	16	13	0
7	0	+1	-1	-1	4000	22	10	0
8	0	+1	+1	+1	4000	22	13	12
9	+1	-1	-1	-1	6000	16	10	0
10	+1	-1	+1	+1	6000	16	13	12
11	+1	+1	-1	+1	6000	22	10	12
12	+1	+1	+1	-1	6000	22	13	0

3.6.3. Parâmetros de Avaliação da Purificação em SDFA

Para se avaliar a purificação é necessário a avaliação de alguns parâmetros dentre eles:

Coefficiente de partição da xilanase (K_{enzima})

$$K_{enzima} = \frac{\text{Atividade xilanásica}_{Fase Superior}}{\text{Atividade xilanásica}_{Fase Inferior}}$$

O valor de K_{enzima} representa a distribuição da enzima entre a fase superior e a fase inferior do SDFA, assim um K_{enzima} maior que um indica que a enzima foi particionada preferencialmente na fase superior e vice-versa.

Coefficiente de partição das proteínas contaminantes ($K_{proteína}$)

$$K_{proteína} = \frac{[proteínas\ totais]_{Fase Superior}}{[proteínas\ totais]_{Fase Inferior}}$$

O valor de $K_{proteína}$ representa a distribuição das proteínas totais entre a fase superior e a fase inferior do SDFA, assim um $K_{proteína}$ maior que um indica que as proteínas foram particionadas preferencialmente na fase superior e vice-versa.

Para ter uma purificação efetiva é desejável que a enzima alvo se particione em uma fase e as proteínas totais em outra. Assim se a enzima se particiona na fase superior, representado por um K_{enzima} maior que um, as proteínas totais devem se particionar na fase inferior, $K_{proteína}$ menor que um. Ou se obtiver um K_{enzima} menor que um procurar um $K_{proteína}$ maior que um.

Razão de Volume (R_V)

$$R_v = \frac{V_{Fase\ Superior}}{V_{Fase\ Inferior}}$$

Rendimento (GAIKAIWARI *et al.* 1996 e HUDDLESTON e LYDDIAT, 1990)

$$R_{Fase\ Superior} = \frac{100}{1 + \frac{1}{R_v \cdot K}}$$

$$R_{Fase\ Inferior} = \frac{100}{R_v \cdot K + 1}$$

O rendimento é calculado através da atividade enzimática a cada etapa de purificação.

Atividade Específica

$$Ativ.espec. = \frac{atividade\ enzimática}{proteínas\ totais} (U / mg)$$

Fator de Purificação (FP)

$$FP = \frac{\text{Atividade específica}}{\text{Atividade específica inicial}}$$

O FP está relacionado ao aumento da atividade específica a cada etapa de purificação.

Seletividade (S) ou (S*)

$$S = \frac{K_{\text{enzima}}}{K_{\text{proteína}}} \quad \text{ou} \quad S^* = \frac{K_{\text{proteína}}}{K_{\text{enzima}}}$$

3.7. Determinação das Linhas de Amarração

Geralmente em sistemas aquosos bifásicos determina-se a concentração de apenas dois componentes, sendo que a concentração do terceiro componente é obtida por diferença.

Especificamente neste caso, o sistema bifásico é composto por quatro componentes, PEG, K_2HPO_4 , NaCl e água. Assim para determinar a composição da linha de amarração, foi determinada a concentração de K_2HPO_4 , a concentração de água (SILVA, 1994) e as

concentrações de NaCl e PEG foram obtidas indiretamente pelo método descrito por SNYDER *et al.* (1992).

3.7.1. Determinação da Concentração de Água

O método utilizado para determinação de água no SDFA é baseado em métodos quantitativos sugeridos para determinação de umidade em geléias e alimentos viscosos.

Foram utilizadas placas de Petri e pérolas de vidro (ϕ 3 mm), que foram previamente secas em estufa a 62°C por 24 horas e colocadas em dessecador por 45 minutos. Após esse tempo anotou-se a massa das placas com as esferas, a massa desse conjunto foi chamada de M_{vidraria} .

Foram colocadas 1-1,5 g de amostra sobre as esferas de vidro e a massa da vidraria mais amostra foi chamada de $M_{\text{úmida}}$.

Essas amostras foram deixadas em estufa à 62°C por 24 horas. Após esse tempo as amostras foram colocadas em dessecador por 45 min, e então mediu-se a M_{seca} . As amostras retornaram a estufa por aproximadamente 2 horas, deixadas em dessecador por 45 min. e novamente a M_{seca} foi determinada, esse procedimento foi repetido até que M_{seca} fosse constante.

Com esses dados pode-se calcular a concentração de água, em fração mássica, pela seguinte equação:

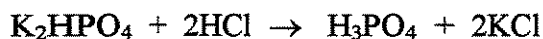
$$M_{\text{amostra}} = M_{\text{úmida}} - M_{\text{vidraria}}$$

$$C_{\text{água}} = \frac{M_{\text{úmida}} - M_{\text{seca}}}{M_{\text{amostra}}} \cdot 100\%$$

3.7.2. Determinação da Concentração de Fosfato

A concentração de fosfato foi determinada de acordo com SILVA (1994).

Pesou-se 1-1,5g da amostra a ser analisada em um becker 50mL e completou-se para 20g com água destilada. A essa solução foi adicionado 1 a 5ml de HCl 10% (dependendo da fase do SDFA) até pH próximo de 2, para garantir que todos os fosfatos fossem transformados em ácido fosfórico.



Titulou-se a solução com KOH 0,1M ou 0,01M (dependendo da fase) por titulação potenciométrica. O ácido fosfórico possui só 2 hidrogênios ionizáveis, o primeiro a pH próximo de 4 e o segundo a pH próximo de 9. Com os dados da titulação, uma curva pH vs Vol._{KOH} (FIGURA 3.1) foi construída. Fez-se a derivada da curva (FIGURA 3.2) e determinou-se o volume equivalente pela diferença dos dois pontos de inflexão (ou pelos dois pontos de máximo) da derivada.

$$\begin{aligned} V_{\text{KOH}} \cdot N_{\text{KOH}} &= n\text{PO}_4^{-3} \\ n\text{PO}_4^{-3} &= \frac{m_{\text{fosfato}}}{174,18} \\ m_{\text{fosfato}} &= V_{\text{KOH}} \cdot N_{\text{KOH}} \cdot 174,18 \end{aligned}$$

onde V_{KOH} é o volume equivalente da titulação, isto é, o volume correspondente entre os dois picos da derivada da curva pH vs. Vol._{KOH} .

$$V_{\text{KOH}} = V_2 - V_1$$

Assim a concentração de fosfato é dada por:

$$C_{\text{sal}} = \frac{m_{\text{fosfato}}}{M_{\text{amostra}}} \cdot 100\%$$

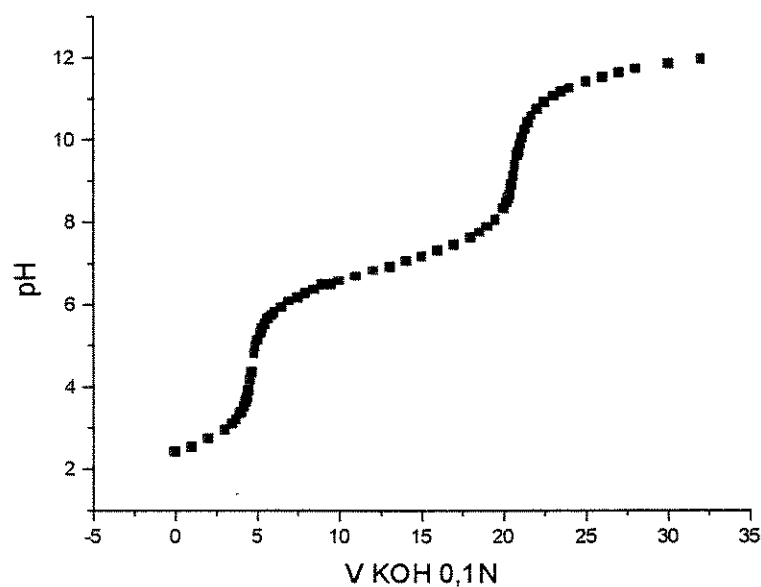


FIGURA 3.1. Exemplo de uma Curva de Titulação da Fase Inferior de um SDFA Composto por 22% PEG6000, 10% K_2HPO_4 e 68% de água

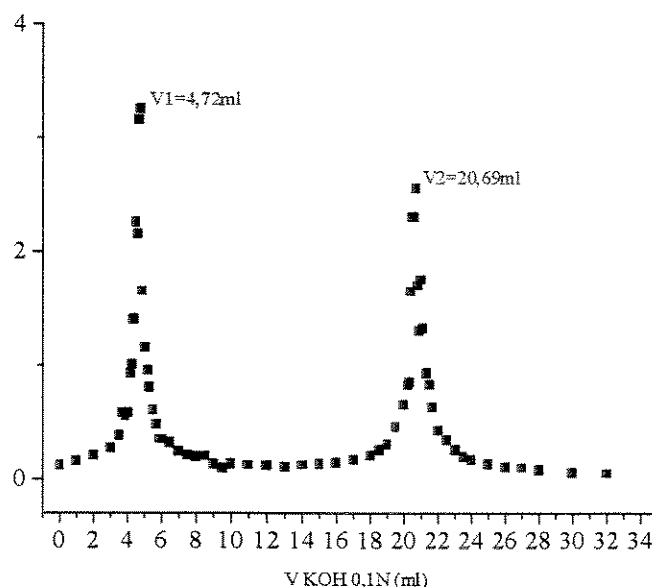


FIGURA 3.2. Exemplo da Primeira Derivada da Curva de Titulação da Fase Inferior de um SDFA Composto por 22% PEG6000, 10% K_2HPO_4 e 68% de água

3.7.3. Determinação das Concentrações de PEG e NaCl

A concentração de PEG e NaCl foi determinada indiretamente segundo SNYDER (1992).

Foram pesados em cadinhos de porcelana previamente pesados aproximadamente 0,5 g de amostras das fases superiores e inferiores do SDFA ($M_{\text{cadinho}} + \text{amostra}$). Essas amostras foram levadas a mufla à 450°C por 5 dias. Esse procedimento provoca a evaporação da água e o PEG é oxidado e volatilizado, assim o que resta nos cadinhos são os sais K_2HPO_4 e NaCl.

Pelas equações abaixo determinamos as massas de PEG mais água e K_2HPO_4 e NaCl.

$$M_{\text{PEG} + \text{água}} = M_{\text{cadinho} + \text{amostra anidra}} - M_{\text{cadinho} + \text{amostra seca}}$$

$$M_{K_2HPO_4 + NaCl} = M_{\text{cadinho} + \text{amostra seca}} - M_{\text{cadinho}}$$

$$M_{NaCl} = M_{K_2HPO_4 + NaCl} - m_{\text{fosfato}} \quad (m_{\text{fosfato}} \text{ determinado no item 3.7.2})$$

$$M_{\text{PEG}} = M_{\text{PEG} + \text{água}} - m_{\text{água}} \quad (m_{\text{água}} \text{ determinada no item 3.7.1})$$

Tendo-se a massa de água, determinada de acordo com item 3.7.1, e com a massa de K_2HPO_4 , determinada de acordo com item 3.7.2, determinou-se as massas de PEG e NaCl utilizando-se a primeira e a segunda equação, respectivamente.

3.8. Purificação da Xilanase em SDFA utilizando uma Coluna de Extração Contínua

Um sistema composto com a melhor composição para purificação da xilanase foi aplicado à uma coluna de extração contínua, representada na FIGURA 3.3, a fim de comparar a purificação da xilanase em batelada e em sistema contínuo com fluxo contra corrente.

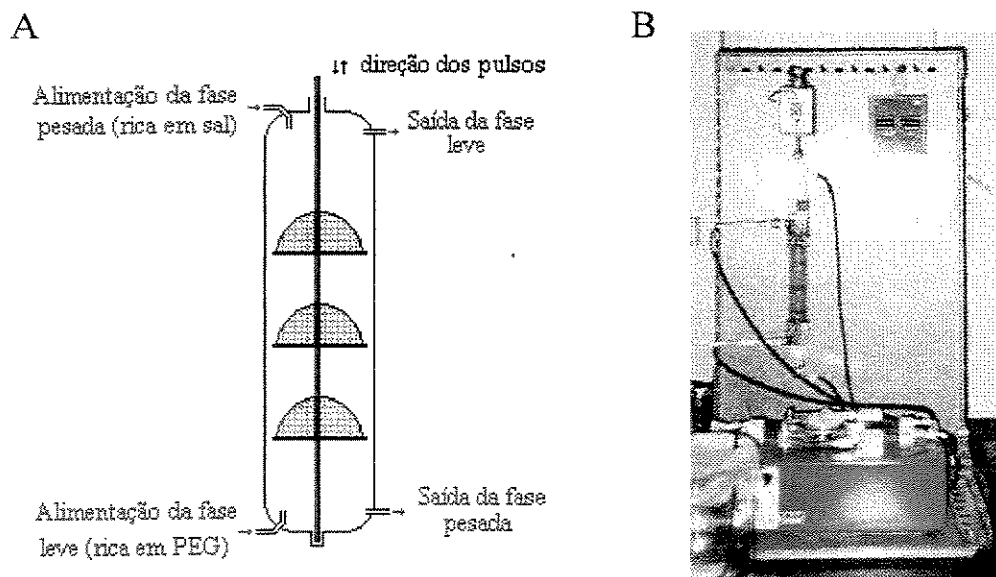


FIGURA 3.3. A) Esquema da Coluna de Extração Contínua com Campânulas Pulsantes e B) Foto da Coluna

A coluna é constituída por um tubo de vidro medindo 19 cm de altura, 2,84 cm de diâmetro externo e 2,54 cm de diâmetro interno. No centro da coluna há uma haste de aço inox com 3 campânulas de aço inox, diâmetro da base de 2,49 cm, distanciada 3 cm uma da outra. A peneira da qual a campânula é constituída possui uma área livre de aproximadamente 38%. Os bocais de alimentação e saída das fases são de aço inox e possuem diâmetro interno e externo de 3,65 e 6,85 mm respectivamente.

A alimentação de ambas as fases é realizada por meio de uma bomba peristáltica, sendo que a fase rica em sal (maior densidade) é alimentada pelo topo da coluna e a fase rica em PEG (menor densidade) pelo fundo da coluna.

3.8.1. Alimentação da Coluna de Extração

As fases superiores e inferiores foram preparadas separadamente de acordo com as concentrações obtidas para as linhas de amarração do SDFA, descrito no item 3.7.

A fase superior (rica em PEG) foi preparada sem adição de enzima pesando-se as quantidades necessárias de PEG6000, K_2HPO_4 , NaCl e água destilada. A fase inferior (rica em sal) foi preparada pesando-se as quantidades necessárias dos reagentes e a massa de água foi substituída por massa equivalente de caldo de fermentação.

3.8.2. Operação da Coluna

A coluna foi operada com as seguintes características de acordo com RABELO *et al.* (1999):

- Vazão da fase inferior (rica em sal): 2,6 mL/min
- Vazão da fase superior (rica em PEG): 2,8 mL/min
- Frequência de pulso: 1/1 e 1/5
- Tempo de Operação: 70 minutos

Inicialmente a coluna foi preenchida com a fase contínua (fase rica em sal), em seguida ajustou-se sua vazão de saída e iniciou-se a agitação. Depois desse procedimento a alimentação da fase dispersa (fase rica em PEG) foi iniciada. Quando a fase dispersa chegou ao topo da coluna iniciou-se a marcação de tempo.

Amostras de saída da fase dispersa e da fase contínua foram retiradas da coluna nos seguintes intervalos de tempo: 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 minutos de operação da coluna.

Após esse procedimento foram determinadas a atividade xilanásica e a concentração de proteínas totais para cada tempo em ambas as fases.

3.9. Etapa Secundária de Purificação da Xilanase por Cromatografia de Troca Iônica (CTI)

Cromatografia de troca iônica com gel Q-Sepharose Fast Flow (resina aniônica carregada positivamente, Pharmacia - Biotech), e com gel SP-Sepharose Fast Flow (resina catiônica, Pharmacia) foram utilizadas como etapa secundária após a purificação primária da xilanase em SDFA.

Foi utilizado o sistema Gradifrac acoplado a uma bomba P50, coluna (XK 26, Pharmacia Biotech) de 26mm de diâmetro interno com 9,5 cm de leito (50 cm³ de leito), detector de ultravioleta com filtro à 280nm, válvula IV7 e registrador (Pharmacia - Biotech) representados na FIGURA 3.4. Os solventes utilizados foram A: solução tampão glicina-NaOH 50 mM, pH 9,0 e B: solução tampão glicina-NaOH 50mM, pH 9,0 + NaCl 1,5 M.

As frações, coletadas nos tubos de ensaio, com os maiores picos de absorbância a 280nm foram concentradas por ultrafiltração em célula da Amicon com uma membrana de corte de 1000 (YM 1000 da Amicon) e analisadas quanto a atividade xilanásica.

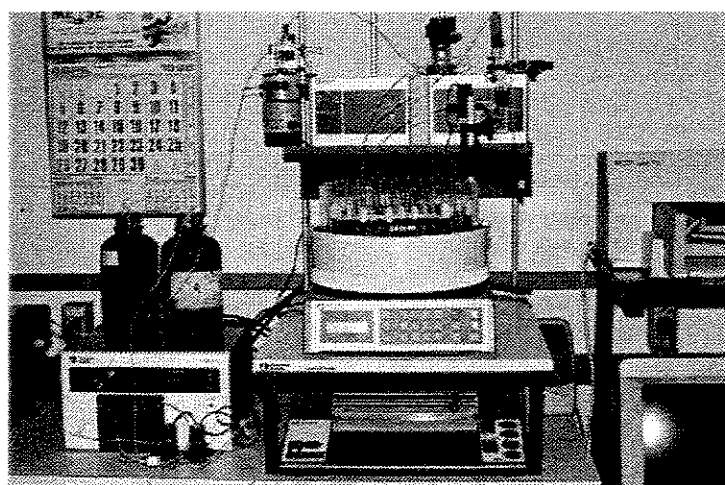


FIGURA 3.4. Equipamento Utilizado para Cromatografia de Troca Iônica

O programa utilizado para cromatografia de troca iônica está descrito na TABELA 3.3 e representado na FIGURA 3.5.

TABELA 3.3. Programa da Cromatografia de Troca Iônica para Q-Sepharose e SP-Sepharose

Q-SEPHAROSE			
MÉTODO	FLUXO (mL/minuto)	VOLUME (mL)	TAMPÃO
Aplicação da amostra	10	0 – 1600	100% A
Cromatografia	20	0 – 320	100% A
		320 – 760	0-100% B
		760 – 1140	100% B
		1140 – 1145	100-0% B
		1145 – 1390	0% B
SP-SEPHAROSE			
MÉTODO	FLUXO (mL/minuto)	VOLUME (mL)	TAMPÃO
Aplicação da amostra	10	0 – 1200	100% A
Cromatografia	20	0 - 260	100% A
		260 - 660	0-100% B
		660 - 959	100% B
		959 - 960	100-0% B
		960 - 1200	0% B

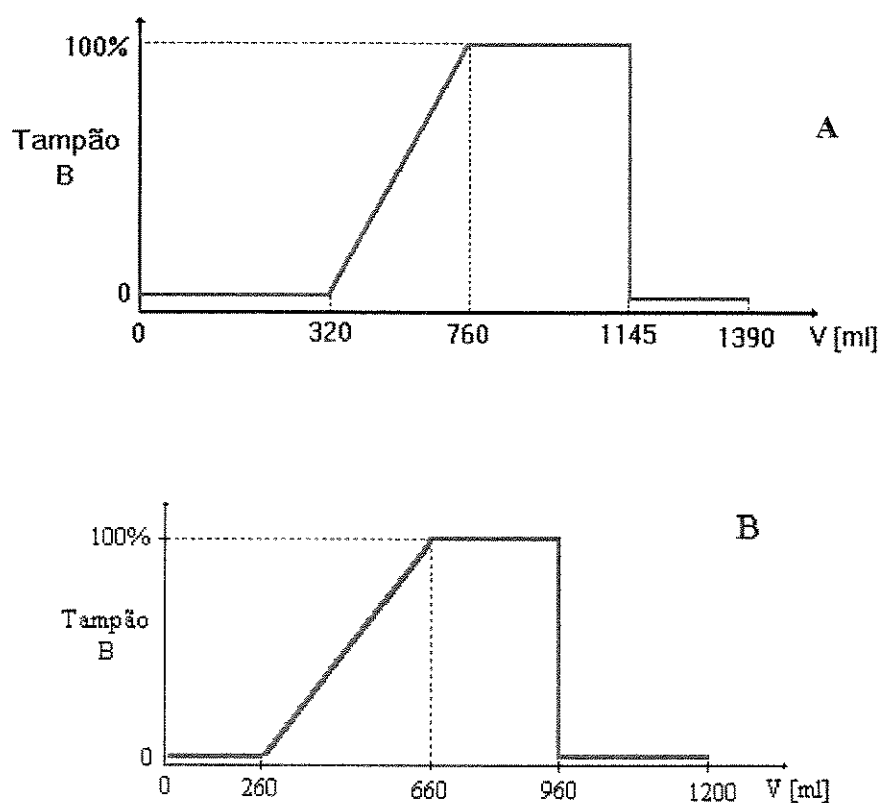


FIGURA 3.5. Representação do Programa da Cromatografia de Troca Iônica: A) Q-Sepharose; B) SP-Sepharose

3.10. Aplicação da Xilanase na Polpa Kraft

3.10.1. Tratamento Enzimático da Polpa

A polpa Kraft de eucalipto utilizada nos estudos de branqueamento foi cedida pela Champion Papel e Celulose (Mogi-Guaçu – SP) após o estágio de oxidação (FIGURA 3.6).

Essa polpa foi inicialmente caracterizada apresentando as seguintes propriedades: número Kappa de 10,5, alvura de 49,2 e consistência de 17,9%.

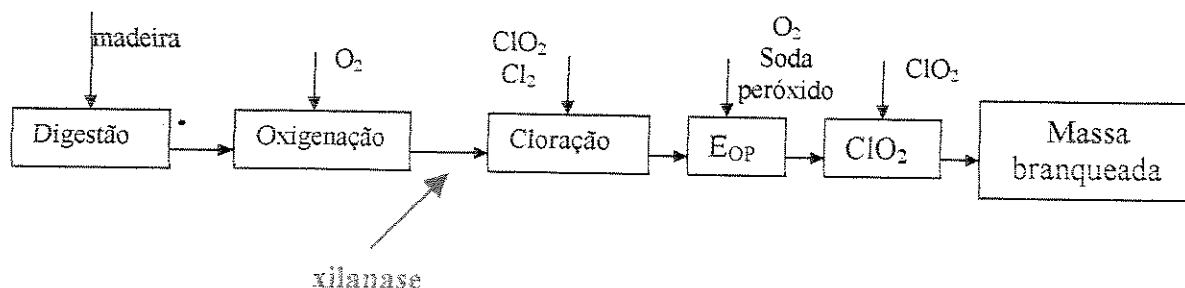


FIGURA 3.6 Esquema da Produção de Papel

Os testes de aplicação da xilanase foram feitos com a enzima comercial Pulpzyme (NovoNordisk) e com a xilanase produzida no Laboratório de Engenharia Bioquímica da FEQ a partir da fermentação com *Bacillus pumilus*.

Foram usadas 10 g de polpa seca para cada teste, aplicando a xilanase (E) e fazendo o controle sem xilanase (C). Os testes foram feitos em duplicata.

A consistência da polpa foi ajustada a 10% com a adição de tampão glicina-NaOH 0,1M pH 9,0. A enzima foi adicionada nas concentrações desejadas na polpa. A mistura foi colocada em sacos de polietileno, bem homogeneizada, e incubada em banho a temperatura controlada. Essa mistura foi submetida a agitação manual a cada 15 minutos.

As condições do teste foram as seguintes:

TABELA 3.4. Condições para branqueamento da polpa de celulose com a enzima comercial Pulpzyme

Temperatura	Tempo de tratamento	pH	Consistência da polpa	Enzima	Dosagem
60°C	3 horas	8,0	10%	Enzima comercial (Pulpzyme)	50 e 250 U/10g de polpa seca

TABELA 3.5. Condições para branqueamento da polpa de celulose com enzima produzida por *Bacillus pumilus* no Laboratório de Engenharia Bioquímica

Temperatura	Tempo de tratamento	pH	Consistência da polpa	Enzima	Dosagem
50°C	2 horas	9,0	10%	xilanase	50, 200, 250 e 500 U/10g de polpa seca

3.10.2. Determinação do Número Kappa

O número Kappa representa a medida do teor de lignina residual da polpa, avaliando a eficiência da deslignificação. Assim a cada etapa de branqueamento há a diminuição do número Kappa.

Para avaliação do número Kappa foram utilizados aproximadamente 1,0 g de polpa seca (folha teste). A amostra foi desintegrada batendo-se no liquidificador com 700 mL de água destilada, até ficar livre dos grumos e dos feixes de fibras não dispersas. Após desintegrada, a polpa foi transferida para um Becker de 1000 mL contendo 50mL de solução de permanganato de potássio (KMnO_4) 0,1N e adicionou-se 50mL de ácido sulfúrico 4 N. Esta solução foi agitada por 10 minutos e anotou-se a temperatura.

Após 10 minutos a reação foi interrompida por adição de 15 mL de solução de iodeto de potássio 1M. Titulou-se o iodo livre na suspensão com tiossulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,1M até a solução ficar com a tonalidade amarelo claro. Adicionou-se duas gotas de solução de amido e continuou-se a titulação até viragem da cor azul para branca.

Uma determinação em branco foi feita usando o mesmo procedimento mas sem a polpa. Neste caso a mistura foi titulada com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ imediatamente.

Para calcular o número Kappa utilizou-se as seguintes equações:

$$c = \frac{a - b}{a} \cdot 100$$

onde:

a- volume de tiosulfato de sódio 0,1N da prova em branco (mL)

b- volume de tiosulfato de sódio 0,1N do teste com a polpa (mL)

Com o valor de c encontra-se o fator de correção f na TABELA 3.6.

Se a temperatura no becker não for 25°C multiplica-se o número Kappa por um fator de correção da temperatura (ft) obtido pela equação abaixo:

$$ft = [(25 - T) \cdot 0,01371] + 1 \quad \text{onde } T \text{ é a temperatura no becker (}^{\circ}\text{C)}$$

Assim,

$$Kappa = \frac{a - b}{w} \cdot f \cdot ft \quad [\text{mL/g}] \text{ onde } w \text{ é a massa da polpa seca}$$

TABELA 3.6. Fator f para Corrigir Diferentes Porcentagens do Consumo de Permanganato (TAPPI Test Method, T 236 cm-85)

f	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
30	0,958	0,960	0,961	0,964	0,966	0,968	0,970	0,973	0,975	0,977
40	0,979	0,981	0,983	0,985	0,987	0,989	0,991	0,994	0,996	0,998
50	1,000	1,002	1,004	1,006	1,009	1,011	1,013	1,015	1,017	1,019
60	1,022	1,024	1,026	1,028	1,030	1,033	1,035	1,037	1,039	1,042
70	1,044									

3.10.3. Determinação da Viscosidade da Polpa

A viscosidade da polpa dá uma indicação do grau de polimerização da celulose, portanto esse teste indica se houve degradação da celulose no processo de branqueamento. A diminuição na viscosidade da polpa pode indicar um possível decréscimo na massa molar da celulose

Pesou-se aproximadamente 0,27g de polpa seca (folha teste) e colocou-se em uma proveta adicionar 25mL de água destilada e agitar por 5 minutos. Em seguida foi adicionado 25 mL de etilenodiamina cúprica, solução 0,5 M em cobre e a mistura agitada por mais 15 minutos. Essa mistura foi transferida para um viscosímetro Fenske-Oswald (FIGURA 3.7), previamente aferido com óleo standard. O tempo de escoamento foi cronometrado.

O cálculo de viscosidade da celulose, em centipoises, foi determinado pela equação:

$$V = K.t$$

onde:

K = constante do viscosímetro

t = tempo de escoamento em segundos



FIGURA 3.7. Esquema do Viscosímetro

3.10.4. Determinação da Alvura

A determinação da alvura da polpa foi realizada diretamente em espectrofotômetro Brightness Tester Model S4-m (Technidyne Corporation USA), com a análise direta das folhas de celulose secas. Antes da leitura das folhas de celulose o equipamento foi calibrado com padrão (placa branca) de 89,5°GL.

3.10.5. Cálculo da Eficiência de Deslignificação e Seletividade

A eficiência de deslignificação e a seletividade são determinadas pelas relações:

$$\% \text{ Eficiência de deslignificação} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ Kappa inicial} - \text{N}^{\circ} \text{ Kappa final}}{\text{N}^{\circ} \text{ Kappa inicial}} \times 100$$

$$\text{Seletividade} = \frac{\text{Eficiência de deslignificação}}{\% \text{ de redução da viscosidade da polpa}}$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados são apresentados em quatro itens, os 3 primeiros referindo-se a purificação da xilanase e o último trata da aplicação da enzima no branqueamento da polpa kraft.

4.1. Purificação em Sistemas de Duas Fases Aquosas (SDFA)

A partição de materiais biológicos em SDFA é um método seletivo para purificação e para estudos de componentes celulares, incluindo proteínas, ácidos nucleicos, membranas e organelas celulares. Processos de extração e separação em SDFA podem substituir as primeiras etapas de purificação e de cromatografia preparativa de biomateriais e também podem facilmente ser escalonados sem perda significativa da eficiência e com uso de equipamentos simples (ALBERTSSON, 1986; ASENJO *et al.*, 1990; KULA, 1990).

Os SDFA foram preparados com caldo de fermentação do *Bacillus pumilus* substituindo a água do sistema. O caldo de fermentação foi obtido no projeto de mestrado de Cristiane Tagliari. O primeiro lote, utilizado no planejamento experimental, apresentou atividade enzimática inicial de 4,9 UI/mL e atividade específica inicial de 18,8 UI/mg proteínas.

É bom salientar que não é necessária a purificação da xilanase para aplicação no branqueamento de polpas kraft. A purificação é necessária para se conhecer as propriedades da enzima.

Um planejamento fatorial fracionário combinado de 2 e 3 níveis de acordo com HAALAND *et al.* (1989) foi empregado com o objetivo de maximizar o rendimento e o

fator de purificação da xilanase. Nesse tipo de planejamento, uma das variáveis pode ser escolhida para ter 3 níveis. Esse artifício é útil quando se trabalha com variáveis descontínuas, como é o caso da MM do PEG, por isso ele é o único fator do planejamento que foi estudado em 3 níveis (MM do PEG: 1500, 4000 e 6000). Nesse tipo de planejamento pode-se estimar todos os efeitos principais e as interações lineares entre dois fatores sem confundí-los.

A Tabela 4.1 mostra o resultado do planejamento experimental para purificação em SDFA, onde foram analisados 4 fatores, MM e % de PEG, % de Fosfato e % de NaCl e as respostas estudadas foram coeficientes de partição da xilanase (K_{enzima}) e das proteínas contaminantes ($K_{proteína}$), fator de purificação (FP), seletividade (S) e rendimento (R).

TABELA 4.1. Coeficientes de partição (K_{enzima} e $K_{proteina}$), fatores de purificação (FP) e rendimento (R) obtidos nos SDEA

Ensaio	Condições do Ensaio				Atividade (U/ml)					FP		Rendimento (na fase enriquecida em xilanase) % (R)
	MM PEG	% PEG	% fosfato	% NaCl	Fase Sup.	Fase Inf.	K_{enzima}	$K_{proteina}$	Seletividade (S)	Fase Sup.	Fase Inf.	
1	1500	16	10	0	5,79	0,24	24,1	1,9	12,9	1,7	0,13	96,9
2	1500	16	13	12	4,98	0,54	9,2	1,4	6,6	4,6	0,7	88,1
3	1500	22	10	12	1,53	1,50	1,1	2,6	0,4	1,9	4,8	59,2
4	1500	22	13	0	6,04	0,22	27,5	0,8	34,4	4,6	0,1	97,6
5	4000	16	10	12	2,26	0,06	37,6	0,3	125	4,5	0,04	97,1
6	4000	16	13	0	2,55	1,26	2,0	4,3	0,5	1,5	3,2	62,6
7	4000	22	10	0	1,39	0,64	2,2	2,6	0,8	1,6	1,9	35,2
8	4000	22	13	12	1,34	2,71	0,5	0,3	1,7	3,5	2,1	31,3
9	6000	16	10	0	2,00	0,39	5,1	0,3	19,6	1,8	0,09	84,4
10	6000	16	13	12	5,93	0,39	15,2	3,5	4,3	5,2	1,2	91,4
11	6000	22	10	12	6,10	0,13	46,9	0,1	390	32,9	0,08	98,2
12	6000	22	13	0	5,62	0,25	23,8	1,0	23,8	28,4	1,7	96,3

A purificação tem por objetivo separar a proteína alvo, no caso a xilanase, das proteínas contaminantes também presentes no caldo de fermentação. A xilanase foi particionada preferencialmente na fase superior ($K_{enzima} > 1$) em todos os experimentos de SDFA realizados. O SDFA que proporcionou uma purificação mais efetiva (maior valor da Seletividade) foi o com maior valor de K_{enzima} e valores de $K_{proteína}$ menores que 1, indicando que as proteínas contaminantes foram particionadas na fase oposta (fase inferior do sistema).

Pode-se observar que de maneira geral com o aumento da concentração de fosfato e de NaCl dos níveis inferiores para os superiores, houve uma diminuição no K_{enzima} (ensaio 1-2; 7-8). Já com o aumento da concentração de NaCl e diminuição da concentração de fosfato notou-se o efeito contrário, isto é, houve um aumento no K_{enzima} e no fator de purificação da fase superior (FP) e uma diminuição do $K_{proteína}$ (ensaio 5-6; 11-12).

Também observou-se que com o aumento da MM do PEG de 1500 para 6000, mantendo-se os outros fatores constantes, houve um aumento significativo do K_{enzima} de 1,1 para 47, do FP na fase superior, que variou de 1,9 para 33, e uma diminuição do $K_{proteína}$, que diminuiu de 2,5 para 0,1 (ensaio 3-11).

Deste modo, os fatores que influenciaram o aumento do K da enzima, também provocaram a diminuição do K da proteína, proporcionando assim altos fatores de purificação.

Foi observado que o melhor sistema para purificação da xilanase foi o composto por 22% de PEG6000, 10% de K_2HPO_4 e 12% de NaCl, onde se obteve um fator de purificação de 33 com 98% de recuperação da enzima na fase superior e seletividade de 390. Os valores dos coeficientes de partição da enzima e da proteína obtidos nesse sistema foram de 47 e 0,1 respectivamente.

GAIKAIWARI *et al.* (1996) utilizaram SDFA para purificação de xilanase, obtida por *Bacillus sp.*, conseguindo um fator de purificação de apenas 2,6 vezes com 98% de

recuperação da enzima. COSTA *et al.* (1998) estudaram a partição da xilanase produzida por *Penicillium janthinellum*. O melhor SDFA encontrado foi o composto por 8,8% de PEG4000, 10% fosfato, 6% de NaCl e pH 7,0 com coeficiente de partição da enzima de 2,21, fator de purificação de 1,34 vezes e 80% de rendimento.

Amostras coletadas do sistema 11 foram analisadas por eletroforese (SDS-PAGE) com o intuito de caracterizar as fases do sistema quanto a massa molar das enzimas purificadas e quanto ao grau de purificação. A FIGURA 4.1 representa o gel de eletroforese com as bandas principais das proteínas do caldo de fermentação e as proteínas do material purificado.

A maior parte da atividade xilanásica foi encontrada na fase superior do SDFA 11 (coluna 3 do gel) onde se encontram 3 bandas principais com massa molar de: 22600, 32600 e 74200 Da. LUMBA e PENNINCKX (1992) purificaram 3 xilanases provenientes da fermentação do *Streptomyces sp.* com massas molares de 21000, 22000 e 32000 Da. NAKAMURA *et al.* (1995) obtiveram uma xilanase de 40000 Da; BLANCO *et al.* (1995) uma xilanase de 32000 Da produzida por *Bacillus sp.* e PANBANGRED *et al.* (1983) identificaram uma xilanase de 24000 Da produzida pela fermentação de *B. pumilus*. As xilanases com baixa massa molar são as indicadas para o tratamento de polpas de papel, pois possibilitam uma melhor dispersão entre as fibras da polpa.

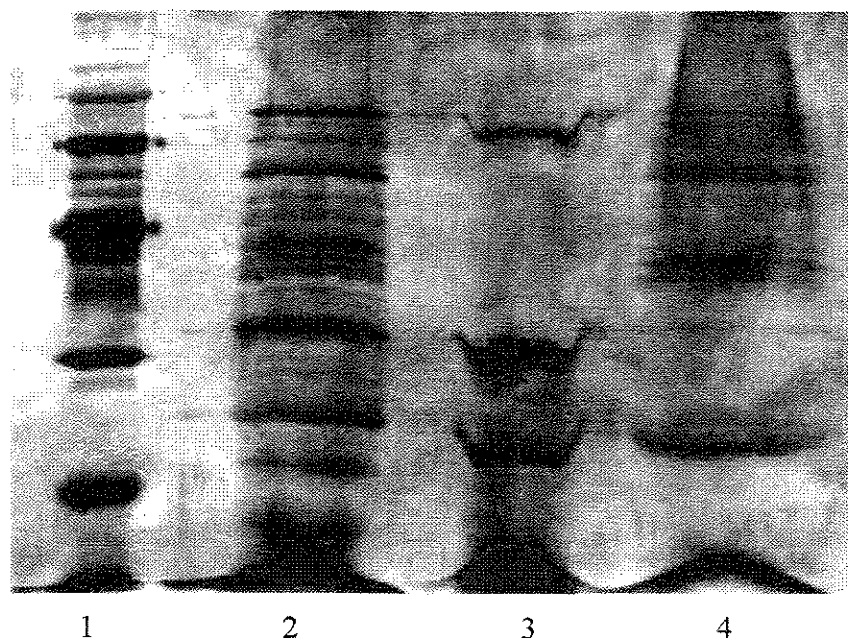


FIGURA 4.1. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida SDS. Coluna 1) Padrões de marcadores moleculares (Da): Fosforilase B: 94000, Albumina Bovina: 67000, Ovoalbumina: 43000, Anidrase Carbônica: 30000, Inibidor Tripsina de Soja: 20100 e α -Lactoalbumina: 14400; 2) Caldo Bruto de Fermentação; 3) Fase Superior (ensaio 11) e 4) Fase Inferior (ensaio 11)

Para determinar quais das 3 bandas correspondentes às proteínas encontradas na fase superior do SDFA (coluna 3) possuem atividade xilanásica, uma amostra coletada da fase superior do sistema 11 foi purificada por cromatografia de troca iônica (CTI) com o intuito de separá-las e analisá-las quanto a atividade enzimática. É possível que mais de uma apresente atividade xilanásica.

Segundo HUDDLESTON *et al.* (1990) a adição de cloreto provoca um potencial negativo na fase superior do SDFA em relação a fase inferior. Isso pode explicar o fato do K da enzima aumentar com a adição de NaCl, pois o pH do SDFA é 8, e a esse pH a enzima provavelmente estaria carregada positivamente (pelos resultados da CTI concluiu-se que o pI da enzima é maior que 9) sendo então atraída pela fase com maior potencial

negativo. Entretanto, há alguns autores que têm outra opinião a respeito. Segundo FRANCO *et al.*, (1996a) o aumento do coeficiente de partição da enzima seria resultado do aumento do potencial hidrofóbico da fase superior (rica em PEG) pela adição de NaCl, mostrando que a enzima com atividade xilanásica pode ser mais hidrofóbica do que as proteínas contaminantes, que foram preferencialmente particionadas na fase inferior, por isso se dá o aumento do K da enzima com a adição de NaCl.

A adição de NaCl também provoca um deslocamento da linha de amarração. Este deslocamento aumenta a linha de amarração o que, segundo CARLSON (1988) contribui para o aumento do coeficiente de partição das proteínas. A FIGURA 4.2 representa o deslocamento da linha de amarração do sistema composto por 22% PEG6000, 10% K_2HPO_4 e 12% NaCl comparado com o mesmo sistema sem a presença de NaCl, mostrando um aumento de 7% no comprimento da linha de amarração. Este fato provavelmente também justifica o aumento do coeficiente de partição da xilanase com a adição de sal no SDFA.

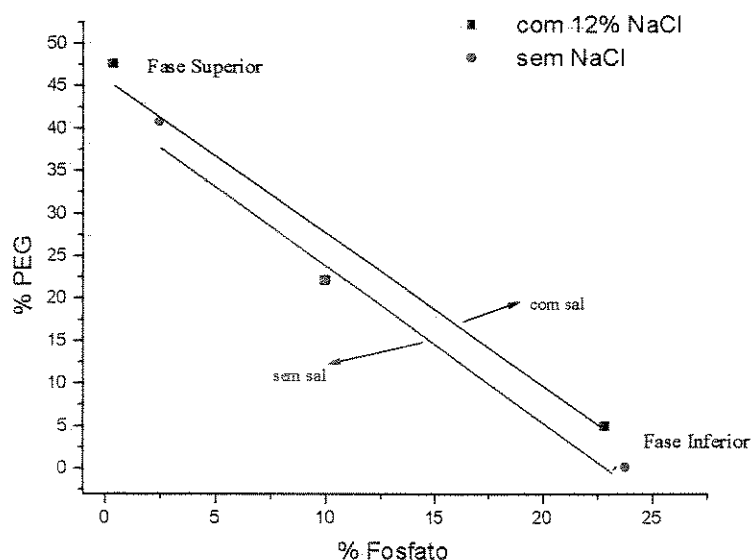


FIGURA 4.2. Comparação das Linhas de Amarração do SDFA composto por 22% PEG6000, 10% Fosfato e com 12% NaCl e sem NaCl

Um novo caldo de fermentação foi obtido após a otimização do meio de cultura e das condições de fermentação. Esse caldo foi utilizado na composição do melhor sistema para purificação da xilanase (22% PEG6000, 10% K_2HPO_4 e 12% NaCl). A atividade xilanásica inicial desse caldo foi de 164,1 U/mL com atividade específica inicial de 31,7 U/mg de proteínas, os resultados da purificação são mostrados na TABELA 4.2.

TABELA 4.2. Coeficientes de partição (K_{enzima} e $K_{proteína}$), fator de purificação (FP) e rendimento (R) obtidos no SDFA (II)

Atividade (U/ml)		K_{enzima}	$K_{proteína}$	Seletividade (S)	Fator de Purificação (FP)		Rendimento %	
Fase Superior	Fase Inferior				Fase Superior	Fase Superior	Fase Superior	Fase Superior
171,8	5,7	30,10	0,04	752	40,1	0,1	97	3

4.2. Extração em uma Coluna de Operação Contínua

A purificação e extração em SDFA também pode ser feita em operação contínua com fluxo contracorrente utilizando os equipamentos usuais de extração líquido-líquido que já são bem conhecidos na área de engenharia química. Esta técnica, dentre outras vantagens, reduz o tempo de operação (KULA, 1990).

O melhor sistema obtido para purificação da xilanase no item 4.1 (sistema 11) foi utilizado numa coluna de extração contínua com campânulas pulsantes (FIGURA 3.3).

Inicialmente foi determinada a linha de amarração do sistema composto por 22% PEG6000, 10% K_2HPO_4 e 12% de NaCl, de acordo com item 3.6. A composição da linha de amarração é mostrada na TABELA 4.3.

TABELA 4.3. Composição das linhas de amarração do SDFA composto por 22% PEG6000, 10% K_2HPO_4 e 12% NaCl

	Fase Superior	Fase Inferior
pH	8,5	8,5
% H_2O	42,6	66,7
% K_2HPO_4	0,4	22,8
% PEG6000	47,5	4,9
% NaCl	9,5	5,5

Após a identificação da composição das linhas de amarração, a fase superior e a fase inferior foram preparadas separadamente. A quantidade de água da fase inferior (rica em sal) foi substituída pelo caldo de fermentação e na fase superior (rica em PEG) não foi adicionado nenhum caldo, apenas água. O experimento foi realizado em 2 condições de frequência de pulsação: 1/1 e 1/5 e com tempo de operação de 70 minutos.

As Figuras 4.3, 4.4 e 4.5 mostram, respectivamente, a atividade xilanásica nas fases superiores e inferiores para a frequência de pulso 1/1 e 1/5 e o coeficiente de partição da enzima em função do tempo de operação.

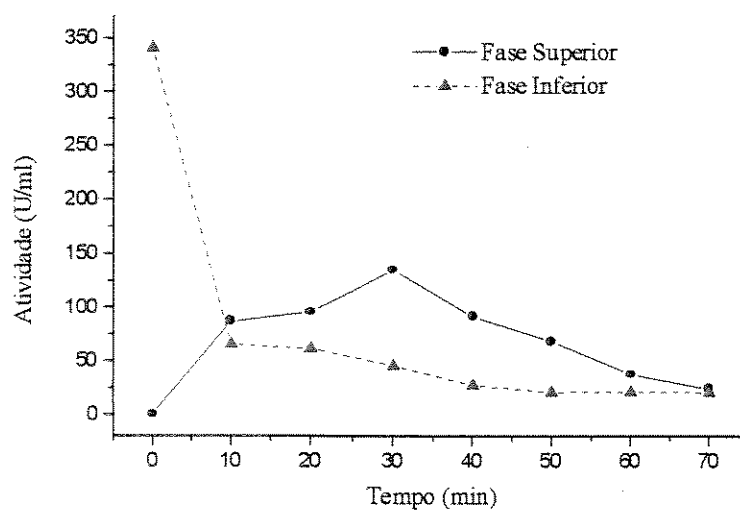


FIGURA 4.3 Atividade Xilanásica da Fase Superior e Inferior da Purificação da Xilanase em SDFA Utilizando Coluna de Extração Contínua. Frequência de Pulso: 1/1

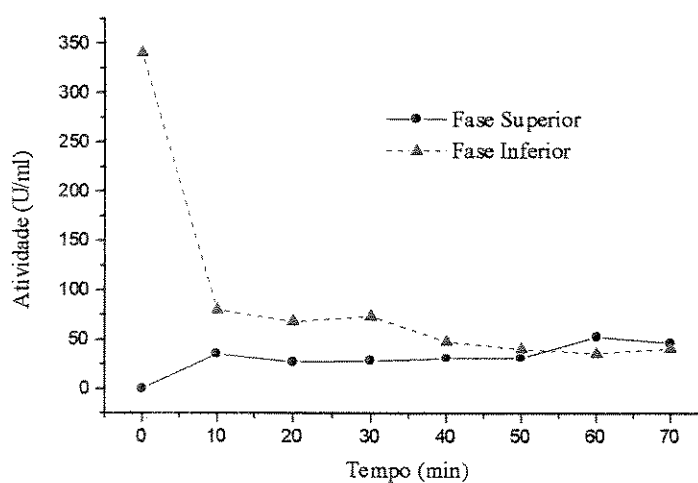


FIGURA 4.4 Atividade Xilanásica da Fase Superior e Inferior da Purificação da Xilanase em SDFA Utilizando Coluna de Extração Contínua. Frequência de Pulso: 1/5

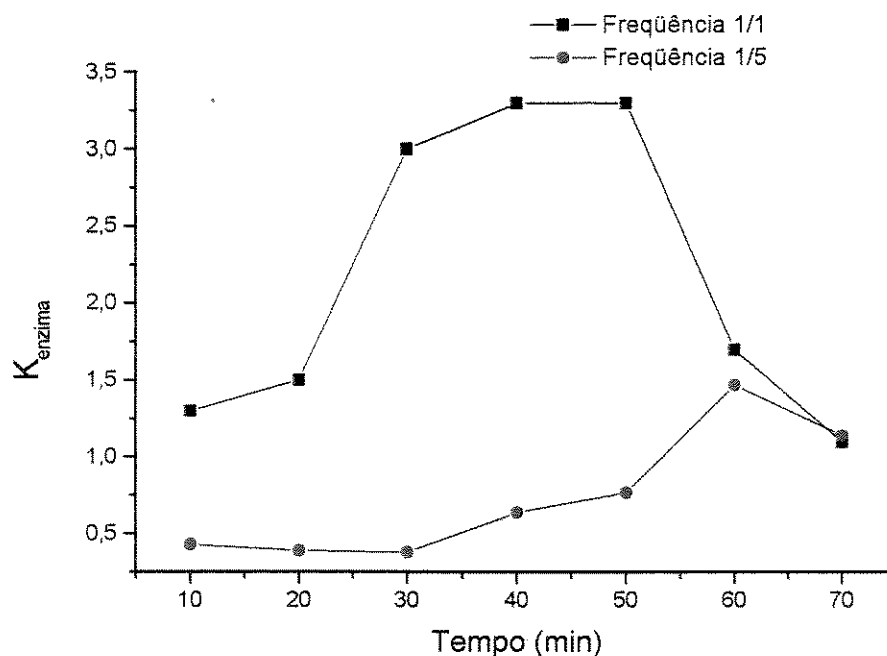


FIGURA 4.5 Coeficiente de Partição da Xilanase da Fase Superior e Inferior da Purificação da Xilanase em SDFA Utilizando Coluna de Extração Contínua. Freqüência de Pulso: 1/1 e 1/5

De acordo com as figuras 4.3, 4.4 e 4.5 os melhores resultados foram encontrados na freqüência de pulso 1/1. RABELO *et al.* (1999) trabalhou com a mesma coluna para extração de citocromo b5 obtido por fermentação de *Escherichia coli*, sendo que os melhores resultados também foram encontrados na freqüência de pulso 1/1. Observou-se que no intervalo de tempo de 30 até 50 minutos há um aumento do K_{enzima} até 3,5 e após esse tempo ele decresce até 1,0.

A razão do uso de agitação em sistemas de extração líquido-líquido é quebrar as gotas dentro da coluna, diminuindo seu tamanho e aumentando a mistura e a área de contato entre as fases (RABELO, 1995). Dessa maneira deveria acontecer um aumento da

transferência de massa entre as fases. Isso não foi observado no neste experimento, pois no final da operação, 70 minutos, a partição da xilanase se deu por igual em ambas as fases, isto é, a concentração de xilanase era a mesma nas fases superiores e inferiores, não apresentando vantagens sobre o experimento em batelada. Provavelmente, neste caso, houve a formação de uma emulsão estável desde o início do processo o que dificultou a transferência da xilanase da fase rica em sal para a fase rica em PEG. CAREIRO DA CUNHA *et al.* (1994) também observaram esse mesmo problema de transferência de massa nesse tipo de equipamento, quando trabalharam com extração de cutinase numa coluna de discos perfurados rotativos.

A transferência de massa também poderia ter sido prejudicada se estivéssemos trabalhando na zona de inversão de fases. A zona de inversão de fases é uma zona de transição onde a fase contínua, que geralmente é a fase salina, torna-se a fase dispersa, e vice-versa. Este fenômeno provoca o aumento do tempo de separação entre as fases e provavelmente a zona de separação da coluna de campânulas pulsantes não foi suficiente para uma eficiente separação entre as fases e conseqüente partição da enzima (MERCHUK *et al.* 1998).

Uma alternativa para impedir a formação de emulsão seria trabalhar com SDFA mais diluído ou em outras posições da linha de amarração.

Um outro fato é que a linha de amarração do sistema composto inicialmente por 22% de PEG6000, 10% de fosfato e 12% de NaCl foi determinada sem a presença do caldo de fermentação. De acordo com LEBRETON e LYDDIATT (1999) e WALKER *et al.* (1999) a adição de biomassa, extrato biológico ou caldo de fermentação no SDFA altera a posição da curva binodal, deslocando-a no sentido do eixo x-y e conseqüentemente altera a posição das linhas de amarração. Por isso pode-se ter utilizado no sistema contínuo uma composição da fase inferior e superior do SDFA ligeiramente diferentes da utilizada no sistema em batelada, pois o material biológico adicionado ao sistema foi centrifugado para evitar a presença de material particulado.

4.3. Cromatografia de Troca Iônica (CTI)

Uma amostra da fase superior do SDFA composto por 22% de PEG6000, 10% de K_2HPO_4 e 12% de NaCl, foi purificada por CTI em uma segunda etapa para determinar quais das proteínas mostradas na coluna 3 da FIGURA 4.1 têm atividade xilanásica.

Inicialmente foi utilizado uma resina aniônica (Q-Sepharose) onde foram aplicados 39 mL da fase superior do SDFA diluído para 1600 mL com solução tampão Glicina-NaOH 50mM, pH 9,0. A diluição da amostra coletada do sistema 11 era necessária para diminuir a concentração salina até níveis que permitissem a ocorrência de interação eletrostática entre a xilanase e as partículas de adsorvente.

A amostra foi aplicada continuamente no sistema Gradifrac (FIGURA 3.4) a um fluxo de 10mL/min e eluída com gradiente de sal de 0 a 1,5M de NaCl em tampão Glicina-NaOH 50mM, a um fluxo de 20mL/min onde foram coletadas frações de 15mL. Foram analisadas a absorbância a 280nm de cada fração, sendo que as frações que apresentaram maior absorbância a 280nm foram concentradas por ultrafiltração tangencial usando membrana de corte de 1000 Da e analisada quanto a atividade xilanásica. A FIGURA 4.6 ilustra os resultados obtidos.

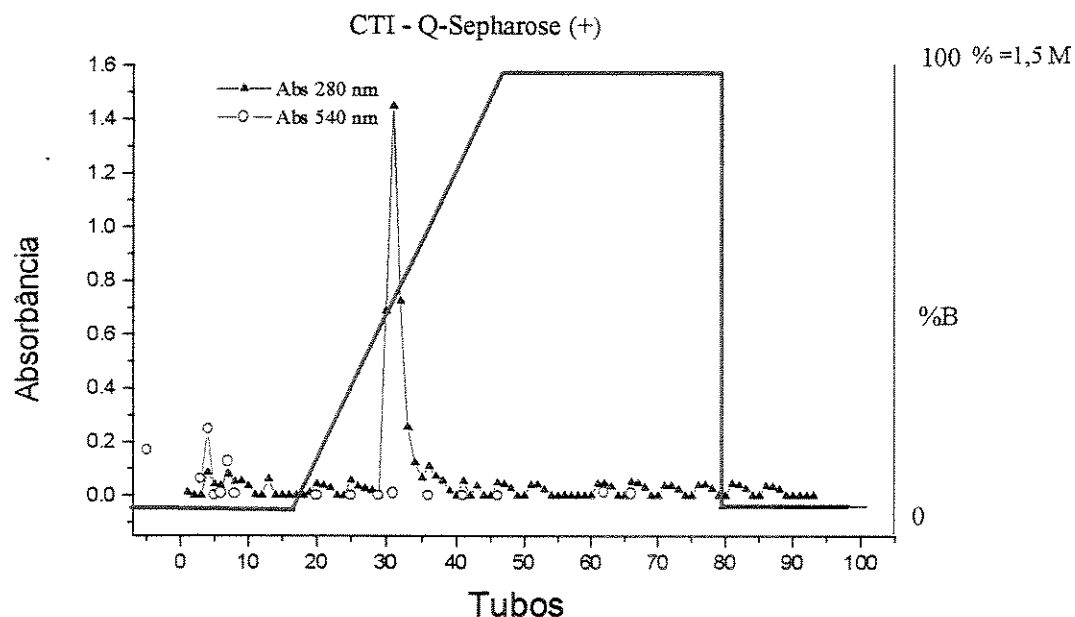


FIGURA 4.6 Cromatograma Utilizando Resina Q-Sepharose e Gradiente de Sal.
Solução A: Tampão Glicina-NaOH 50mM e pH 9,0. **Solução B:**
 Tampão Glicina-NaOH 50mM e pH 9,0 mais NaCl 1,5M

As frações que apresentaram atividade xilanásica (Abs 540nm) foram as que não foram retidas pela coluna e eluíram antes da aplicação do gradiente de sal. Provavelmente isso ocorreu porque estas enzimas estavam carregadas positivamente a pH 9,0 e não interagiram com a matriz de Q-Sepharose que é positiva.

Por isso, o mesmo ensaio foi realizado com a resina SP-Sepharose que é uma matriz catiônica (carregada negativamente). Foram utilizados 30 ml da fase superior (rica em PEG) do sistema composto por 22% de PEG6000, 10% de K_2HPO_4 e 12% NaCl. Os resultados são mostrados na FIGURA 4.7.

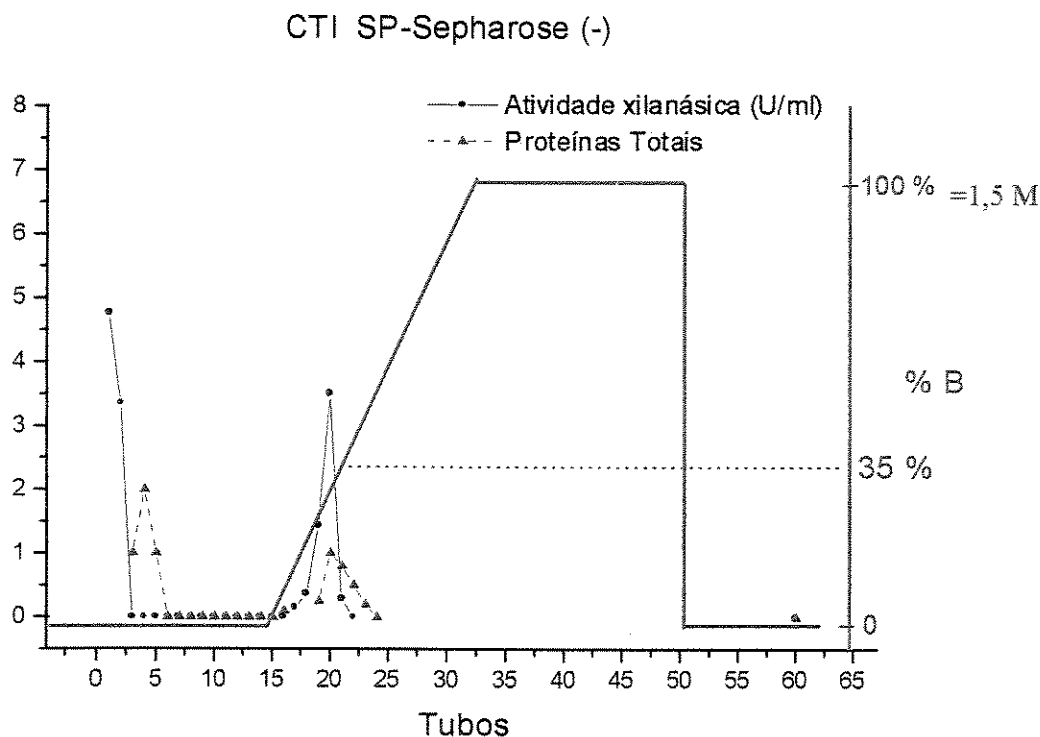


FIGURA 4.7. Cromatograma Utilizando Resina SP-Sepharose e Gradiente de Sal. Solução A: Tampão Glicina-NaOH 50mM e pH 9,0. Solução B: Tampão Glicina-NaOH 50mM e pH 9,0 mais NaCl 1,5M

Pelo cromatograma da FIGURA 4.7 concluiu-se que duas frações com atividade xilanásica foram identificadas: uma não foi adsorvida na matriz e a outra foi eluída no início do gradiente de sal, em aproximadamente 0,5M de NaCl, isto significa que elas não foram fortemente adsorvidas pela coluna. É provável que duas isoenzimas estejam presentes no caldo de fermentação, ambas com atividade xilanásica, uma deve ter um pI inferior a 9,0 e a outra deve ter um pI próximo e maior que 9,0, que foi o pH utilizado nesse ensaio. Alguns autores determinaram o pI de xilanases produzidas por bactérias: LUMBA e PENNINCKX (1992) purificaram β -xilanases produzidas por *Streptomyces sp.*, uma delas apresentou massa molar de 22Kda e pI de 8,9 e BLANCO *et al.* (1995) purificaram xilanase produzida por *Bacillus sp.* com massa molar de 32Kda e pI de 9,3; .

Foi feita eletroforese SDS-PAGE das amostras com maior atividade xilanásica, (frações 19 e 20) para verificar sua massa molar (FIGURA 4.8) e ponto isoelétrico de uma amostra da fase superior do sistema composto por 22% PEG6000, 10% fosfato e 12% NaCl (FIGURA 4.9).

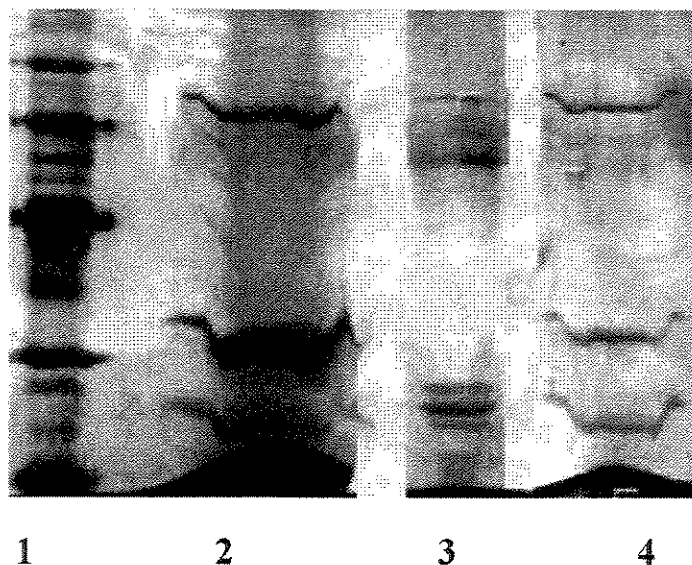


FIGURA 4.8 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida SDS: Coluna 1) Padrões de marcadores moleculares (Da): Fosforilase B: 94000, Albumina Bovina: 67000, Ovoalbumina: 43000, Anidrase Carbônica: 30000, Inibidor Tripsina de Soja: 20100 e α -Lactoalbumina: 14400; 2) Fase Superior; 3) Amostra não Retida na Coluna e 4) Frações 19-20 Eluídas

As frações das colunas 3 e 4 da eletroforese (FIGURA 4.8) apresentaram atividade xilanásica, como praticamente todas as 3 bandas da fase superior do SDFA (coluna 2) aparecem nas outras duas colunas fica inviável afirmar qual ou quais delas são as xilanases.

As principais proteínas presentes na fase superior do SDFA (FIGURA 4.9) apresentaram os seguintes pontos isoelétricos: 4,0; 4,6; 5,3; 8,7 e 9,25.

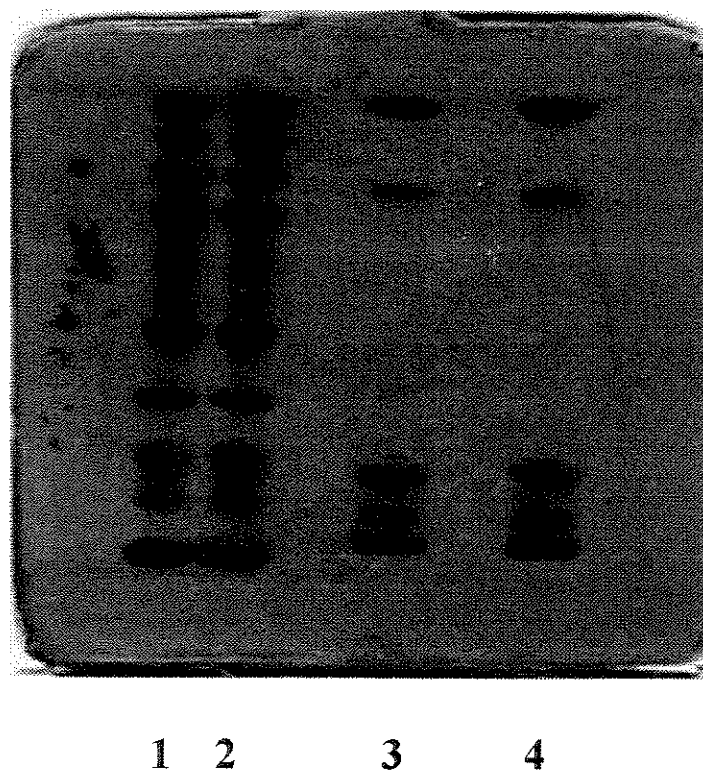


FIGURA 4.9 Ponto Isoelétrico Colunas 1 e 2) Padrões de marcadores moleculares: Amiloglucosidase pI 3,5; Inibidor de Tripsina de soja pI 4,55; β -Lactoalbumina pI 5,20; Anidrase bovina pI 5,85; Anidrase humana pI 6,55; Mioglobina ácida pI 6,85, Mioglobina básica pI 7,35; Lecitina ácida pI 8,15; Lecitina média pI 8,45; Lecitina básica pI 8,65 e Tripsinogênio pI 9,30; Colunas 3 e 4) Fase Superior.

A CTI deveria ter sido realizada novamente em outro pH, por exemplo pH 8,0, utilizando-se a resina catiônica (SP-Sepharose). Provavelmente a esse pH as enzimas com atividade xilanásica ficassem mais fortemente adsorvidas na matriz catiônica e eluissem em picos diferentes possibilitando a identificação da xilanase.

4.4. Aplicação da Xilanase na Polpa Kraft

Os testes de aplicação da xilanase foram realizados de acordo com o item 3.10.1, os parâmetros de avaliação foram o número Kappa, a alvura, a viscosidade e a absorbância a 280nm, sendo esta última indicadora do teor de lignina residual pois quanto maior a absorbância maior quantidade de lignina foi liberada em solução, evidenciando uma maior atuação da xilanase na polpa. Os resultados são mostrados na tabela 4.4.

TABELA 4.4. Aplicação da xilanase em polpa Kraft

Teste	Concentração (U/10g polpa)	Tempo (horas)	N.Kappa	Alvura	Viscosidade	Eficiência deslignificação %	Abs 280nm
E ₀	_____	_____	10,5	49,2	41,0	_____	_____
EC	50	3	8,6	52,1	42,0	18	0,711
EC	250	3	7,9	54,3	43,0	25	0,857
EX	50	2	9,0	50,9	42,8	14	0,566
EX	200	2	8,8	52,0	42,4	16	0,792
EX	500	2	7,8	52,6	42,0	26	0,846
C	_____	2	10,3	48,8	42,0	_____	0,408

E₀- polpa antes do tratamento enzimático

EC- enzima comercial

EX- xilanase

C- controle

O ideal seria utilizar a sequência de branqueamento usada industrialmente, por exemplo, a sequência utilizada pela Champion S.A. que é C_DE_{OP}D (C_D-aplicação de cloro e dióxido de cloro, E_{OP}-extração alcalina e D-aplicação de dióxido de cloro), verificando qual seria a redução de cloro com a utilização da xilanase para se atingir uma alvura de 89°GE. Infelizmente isso não foi possível devido a falta de equipamentos e condições de segurança,

pois o Cl_2 (cloro) e o ClO_2 (dióxido de cloro) são altamente tóxicos, além de que o dióxido de cloro deve ser produzido no local de consumo porque ele é explosivo e não deve ser transportado.

A melhor indicação do efeito da xilanase é a medida da absorbância a 280nm (da água residual) após o estágio enzimático. Este provavelmente é o método mais rápido de medir o teor de lignina residual na solução, quanto maior a absorbância maior a quantidade de lignina residual e consequentemente mais efetivo foi o tratamento. Pela TABELA 4.4 vemos que a absorbância a 280nm aumenta consideravelmente na polpa tratada com enzima em relação ao controle.

Também foi possível observar a redução de 2,5 unidades no número Kappa, de 10,3, polpa não tratada (C) para 7,8 na polpa tratada com 50U/g polpa seca (TABELA 4.4), neste caso a eficiência de deslignificação foi de 26%.

A FIGURA 4.10 mostra a comparação do tratamento feito com a enzima comercial Pulpzyme e com a xilanase de *Bacillus pumilus* produzida no laboratório. Observa-se que a enzima comercial reduz o número Kappa em aproximadamente 0,5 unidades a mais que a xilanase obtida pela fermentação de *Bacillus pumilus* usada nesse experimento. Entretanto, os valores de pH testados foram diferentes, para a enzima comercial foi utilizado pH 8,0 e para a enzima de *B. pumilus* pH 9,0, indicando elevada resistência a alcalinidade da segunda enzima.

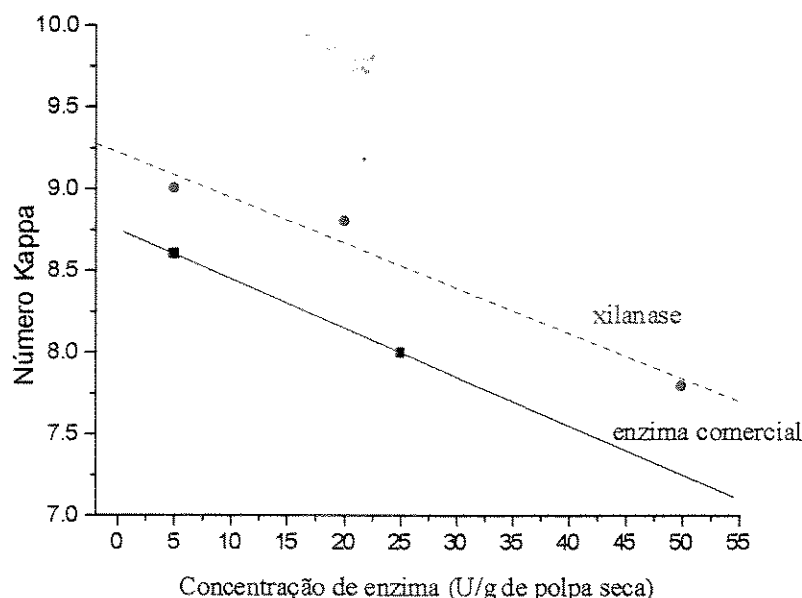


FIGURA 4.10 Comparação do tratamento enzimático feito com a enzima comercial e com a xilanase produzida no laboratório

BOCCHINI *et al.* (1997) conseguiram uma redução de apenas uma unidade no número Kappa com o tratamento enzimático. Continuaram o branqueamento com ClO_2 e extração alcalina (NaOH) obtendo uma redução de 23% e 37% de ClO_2 , respectivamente, para atingir os mesmos níveis de número Kappa e alvura do que os obtidos com o controle sem tratamento enzimático.

MUNK (1993), utilizaram a xilanase e um posterior branqueamento ECF (branqueamento sem adição de cloro elementar) com a seguinte sequência de branqueamento: XDEDED (X - enzima, D - ClO_2 , E - extração com NaOH). No estágio enzimático conseguiu uma redução de 1,4 unidades no número Kappa. No final do branqueamento chegou-se a alvura de 91% com a economia de 25% de cloro ativo e 16% de NaOH comparando-se com o controle sem tratamento enzimático.

De acordo com a literatura, o uso da xilanase no branqueamento da polpa kraft mostrou, em geral, uma redução no uso de cloro utilizado no branqueamento químico atingindo alta brancura sem alterar as propriedades da polpa. Resultados de laboratório e de plantas industriais mostraram uma redução de aproximadamente 20-25% de cloro ativo total para madeiras duras e uma redução de 10-15% para madeiras moles (VIKARI *et al.*, 1987; BUCHERT *et al.*, 1992; SHERKER *et al.*, 1992; YANG *et al.* 1993). Essa redução no uso de reagentes químicos pode implicar em altas reduções de custo quando se utiliza grandes quantidades de cloro e também há a redução da quantidade de organoclorados nos efluentes, o que significa um benefício para a área ambiental (BAJPAI, 1999).

5. CONCLUSÃO

O uso de planejamento experimental se mostrou bastante adequado para o estudo das variáveis que influenciaram a extração da xilanase nos SDFA estudados.

De acordo com os resultados apresentados o SDFA composto de 22% de PEG6000, 10% de K_2HPO_4 e 12% de NaCl mostrou ser um excelente sistema para concentração e purificação da xilanase, obtida pela fermentação do *Bacillus pumilus*, numa única etapa de purificação. O fator de purificação obtido foi de 40 com 97% de recuperação da enzima na fase superior desse sistema.

O tratamento enzimático na polpa kraft com adição da xilanase apresentou efeitos, iguais ou superiores, de redução do número kappa da polpa comparados com os resultados da literatura.

Isto indica que a xilanase de *Bacillus pumilus* produzida no Laboratório de Engenharia Bioquímica (FEQ-UNICAMP) apresenta alto potencial de uso industrial como coadjuvante no branqueamento de polpas com o intuito de diminuir o uso de químicos (cloro) no processo e consequentemente diminuir a quantidade de organoclorados nos efluentes de indústrias de papel e celulose.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Alguns pontos poderiam ser melhor estudados:

- Estudo da purificação utilizando o caldo de fermentação com células
- Otimização da extração da xilanase utilizando SDFA em operação contínua; e
- Estudo mais aprofundado da aplicação da xilanase no branqueamento de polpa kraft, visto que ela mostrou um grande potencial de uso industrial.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTSSON, P.-Å. Partition of Cell Particles and Macromolecules. Willey Interscience, New York, 1ª ed. 1971.
- ALBERTSSON, P.-Å. Partition of Cell Particles and Macromolecules. Willey Interscience, New York, 3ª ed. 1986.
- ALBERTSSON, P.-Å.; CAJARVAVILLE, A.; BROOKS, D.E.; TJERNELD, F. Partition of Proteins in Aqueous Two Phase Systems and the Effect of Molecular Mass of the Polymer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.926, p.87-93, 1987.
- ANDREWS, A. T. Electrophoresis. Oxford Press, Oxford, Inglaterra. 1986.
- ANDREWS, B. e ASENJO, J. A. Aqueous two-phase systems. In: Protein purification methods: a practical approach. ed. E.L.V. Harris & S. Angal. IRL Press, Oxford. p. 161-174, 1989.
- ASENJO, J.A; FRANCO, T.T; ANDREWS, A.T., ANDREWS, B. A. In Biological for Recombinant Microorganisms and Animal Cells - New Strategies in Production and Recovery. Eds. M. White, S. Veuveny and S. Shafferman. VCH Publisher, 1990.
- BAILEY, M.J; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory Testing of Methods for Assay of Xylanase Activity. **J. Biotechnology**, v.23, n.3, p.257-270, 1992.
- BAJPAI, P. e BAJPAI, P.K. In Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Eriksson, K. e., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, v.57, p.213-59, 1997.
- BAJPAI, P. Application of Enzymes in the Pulp and Paper Industry. **Biotechnology Progress**, v.15, n.2, p.147-157, 1999.
- BECK, C. I. e SCOTT, D. Enzymes in foods - for better or worse. **Adv. Chem. Ser.** v.136, n.1, 1974.
- BHAWSAR, P.C.M.; PANDIT, A.B.; SAWANT, S.B.; JOSHI, J.B. Enzyme Mass Transfer Coefficient in a Sieve Plate Extraction Column. **The Chemical Engineering Journal**, v.55, p.B1-B17, 1994.

- BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends in Biotechnology**, v.3, p.286-290, 1985.
- BIELY, P. Biotechnological potential and production of xylanolytic systems free of cellulases. **ACS Symp. Ser.**, v.460, p.408, 1991.
- BLANCO, A.; VIDAL, T.; COLOM, J.F.; PASTOR, F.I.J. Purification and properties of xylanase A from alkali-tolerant *Bacillus sp.* strain BP-23. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.4468-4470, 1995.
- BOCCHINI, D.A.; TAVARES, V.B. e SILVA, R. Produção e aplicação de xilanase de *Bacillus sp-1* no branqueamento da pasta kraft de eucalipto. In **30º Congresso Anual de Celulose e Papel da ABTCP**, 1997.
- BOLAND, M.J.; HUSTEDT, H.; HESSELINK, P.G.M. Use of Two-Phase Aqueous Systems in Protein Purification. In: **AUSTRALIAN BIOTECHNOLOGY CONFERENCE**, 8. Meet., p.230-231, 1989. Biochemical Processing Centre, Biotechnology Division, DSIR, Palmerston North, New Zealand.
- BOURBONNAIS, R.; JURASEK, L.; PAICE, M. G. Biotechnology in the pulp and paper industry. In **National Biotechnology Advisory Committee**, Ottawa, Canada, 1991.
- BRUNS, R.E.; BARROS NETO, B. e SCARMINIO, I.S. Planejamento e Otimização de Experimentos. Editora da Unicamp, Campinas-SP, 1995.
- BUCHERT, J.; SIIKA-AHO, M.; KANTELINEN, A.; RANUA, M.; VIIKARI, L. Presented at the 5th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, Kyoto, Japan, 27-30 Maio, 1992.
- CARLSON, A. Factors Influencing the Use of Aqueous Two-Phase Partition for Protein Purification. **Separation Science and Technology**, v.23, p.785-817, 1988.
- CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; AIRES-BARROS, M.R.; TAMBOURGI, E.B. e CABRAL, J.M.S. Continuous Extraction of a Recombinant Cutinase from *Escherichia coli* Disrupted Cells with Reversed Micelles Using a Perforated Rotating Disc Contactor. **Bioprocess Engineering**, v.15, n.5, p.253-256, 1996.

- CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; AIRES-BARROS, M.R.; TAMBOURGI, E.B. e CABRAL, J.M.S. Recovery of a Recombinant Cutinase with reversed micelles in a Continuous Perforated Rotating Disc Contactor. **Biotechnology Techniques**, v.8, n.6, p.413-418, 1994.
- CASCONE, O.; ANDREWS, B.A.; ASENJO, J.A. Partitioning and Purification of Thaumatin in Aqueous Two-Phase Systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v.13, n.8, p.629-635, 1991.
- CHANG, W.J. e KOO, Y.M. Recovery of β -galactosidase from *E. coli* Double Lysogen Using Aqueous Two Phase System. **Biotechnology Techniques**, v.12, n.6, p.455-457, 1998.
- CHIANG, H.L. e WANG, S.S. Extractive Partition of L-aspartase and fumarase from *E.coli* Using Aqueous Polyethyleneglycol Ammonium Sulphate Systems. **Biotechnology Techniques**, v.2, n.4, p.283-288, 1988.
- COIMBRA, J.S.R.; MOJOLA, F. e MEIRELLES, A.J.A. Dispersed Phase Hold-Up in a Perforated Rotating Disc Contactor (PRDC) Using Aqueous Two-Phase Systems. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v.31, n.2, p.277-280, 1998.
- COSTA, S.A.; PESSOA, A. e ROBERTO, IC. Xylanase recovery - Effect of Extraction Conditions on the Aqueous Two-Phase System Using Experimental Design **Applied Biochemistry and Biotechnology** v.70, n.2, p.629-639, 1998
- CHRISTOV, L. P. & PRIOR, B. A. Xylan removal from dissolving pulp using enzymes of *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnol. Lett.** v.15, n.12, p.1269-1274, 1993.
- DAHLBERG, L.; HOLST, O.; KRISTJANSSON, J. K. Thermostable xylanolytic enzymes from *Rhodothermus marinus* grown on xylan. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.40, p.63-68, 1996.
- DANEAULT, C.; LEDUC, C. e VALADE, J.L. The use of xylanses in kraft pulp bleaching: a review. **Tappi Journal**, v.77, n.6, 1994.

- DETROY, R. W. Bioconversion of agricultural biomass to organic chemicals. In I. S. Goldstein (ed.), *Organic chemicals from biomass*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., p.19-43, 1981.
- DIAMOND, A. D. e HSU, J.T. Aqueous two-phase systems for biomolecule separation **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.47, p.89-135, 1992.
- DUARTE, M. C. T.; PORTUGAL, E. P.; PONEZI, A. N.; BIM, M. A.; TAGLIARI, C. V. e FRANCO, T. T. Production and Purification of Alkaline Xylanases. **Bioresource Technology**, v.68, p.49-53, 1999.
- DURAN, N.; ESPOSITO, E. e ARAUJO, J.S.Neto. Enzimas de importância na indústria de polpa de celulose e papel. **O Papel**, dezembro, 1995.
- ELEGIR, G.; SZAKACS, G. e JEFFRIES, T.W. Purification, characterization, and substrate specificities of multiple xylanases from *Streptomyces sp.* strain B-12-2. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.2609-2615, 1994.
- ERIKSSON, K. E. L. Biotechnology: three approaches to reduce the environmental impact of the pulp and paper industry. **Sci. Progress**, v.75, p.175, 1991.
- FALCH, E.A. **Biotechnology Advance**, v.9, p.643-658, 1991.
- FRANCO, T.T.; ANDREWS, A.T.; CASCONI, O.; HODGSON, C. e ASENJO, J.A. Affinity separation of proteins in aqueous two-phase system. In: **Separations for Biotechnology**, vol. 2. Ed. E.D. Pyle. SCI, Elsevier Applied Science, London, 1990.
- FRANCO, T.T.; ANDREWS, A. T. e ASENJO, J. A. Use of chemically modified proteins to study the effects of a single protein characteristics in aqueous two-phase systems. Effect of surface hydrophobicity. **Biotechnology and Bioengineering**, v.49, p.300-308, 1996a.
- FRANCO, T.T.; ANDREWS, A. T. e ASENJO, J. A. Use of chemical modified proteins to study the effect of a single characteristics in aqueous two-phase systems. Effect of surface charge and Effect of surface Hydrophobicity. **Biotechnology and Bioengineering**, v.49, p.309-315, 1996b.

- FRANCO, T.T.; GALAEV, I.Y.; HATTI-KAUL, R.; HOLMBERG, N.; BÜLOW, L. e MATTIASSON, B. Aqueous Two-phase Systems formed by thermoreactive vinyl imidazole/vinyl caprolactam copolymer and dextran for partitioning of a protein with a polyhistidine tail. **Biothechnology Techniques**: January, 1997.
- GAIKAIWARI, R.; SHENDYE, A.; KULKARNI, N.; RAO, M. Two-phase separation of xylanases from alkalophilic thermophilic *Bacillus* using a poly(ethylene glycol)-K₂HPO₄ system. **Biotech. and Applied Biochem.**, v.23, p.237-241, 1996.
- HAALAND, P.D. Experimental Design in Biotechnology. New York: Ed. Marcel Dekker, 1989.
- HÖGMAN, S.; JÖVES, H.; ROSENBERG, E.; SHOHAM, Y. In Biotechnology in the Pulp and Paper Industry; UNI Publishers Co.: Tokyo, 1992, p. 107.
- HUDDLESTON, J.G.; LYDDIATT, A. Aqueous Two Phase Systems in Biochemical Recovery – Systematic Analysis, Design, and Implementation of Practical Process for the Recovery of Proteins. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.26, n.3, p.249-279, 1990.
- HUDDLESTON, J.; VEIDE, A. KOHLER, K.; FLANAGAN, J.; ENFORS, S.O.; LYDDIATT, A. The Molecular Basis of a Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems. **Trends in Biotechnology**, v.9, p.381-388, 1991b.
- JÄGER, A.; SINNER, M.; PURKARTHOFFER, H.; ESTERBAUER, H.; DITZELMULLER, G. In Biotechnology in the Pulp and Paper Industry; UNI Publishers Co.: Tokyo, 1992, p.112.
- JOHANSSON, G. e RECZEY, K. Concentration and Purification of β -glucosidase from *Aspergillus niger* by Using Aqueous Two-Phase Partitioning. **Journal of Chromatography B**, v.711, n.1/2, p.161-172, 1998.
- KRONER, K. H.; HUSTEDT, H.; GRANDA S. e KULA, M. R. Technical aspects of separation using aqueous two-phases systems in enzyme isolation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.20, n.12, p.1967-1988, 1978.

- KULA, M.-R.; KRONER, K.L.; HUSTEDT, H. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. **Advances in Biochemical Engineering**, v.24, p.73-118, Ed. A. Fiechter, Springer,. 1982.
- KULA, M.-R. Trends and future of aqueous two-phase extraction. **Bioseparation**, v.1, p.181-189, 1990.
- LEBRETON, B. e LYDDIATT, A. Novel Tie-Line Length Characterization of Aqueous Two-Phase Systems: Implications for Operations with Complex Particulate Bio-Feedstocks. In Proceedings of 11th International Conference on Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems, Alabama, USA, 27 Junho – 2 Julho, 1999.
- LEE, C-K e SANDLER, S.I. Vancomycin partitioning in Aqueous Two-Phase Systems: Effects of pH, Salts, and an Affinity Ligand. **Biotechnology and Bioengineering**, v.35, n.4, p.408-416, 1990.
- LINKO, M.; POUTANEN, K. e VIKARI, L. New developments in the application of enzymes for biomass processing. In Enzyme Systems for Lignocellulose Degradation. Coughlan, M. P., Ed., **Elsevier Applied Science**, London, 331p., 1989.
- LUMBA, F.L. e PENNINCKX, M.J. Characterization of the multiple forms of β -xylanase produced by a *Streptomyces* sp. growing on lignocellulose. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.36, p.733-738, 1992.
- MANDELS, N. e STENBERG, D. Recent Advances in Cellulase Technology. **J. Ferment. Technol.** v.54, p.267-286, 1976.
- MCCLEARY, B. V. Enzymatic modification of plant polyssacharides. **Int. J. Biol. Macromol.** v.8, p.349, 1986.
- MERCHUK, J.C.; ANDREWS, B.A. e ASENJO, J.A. Aqueous Two-Phase Systems for Protein Separation Studies on Phase Inversion. **Journal of Chromatography B**, v.711, p.285-293, (1998).
- MILAGRES, A. M. F. Produção de xilanases por *Penicillium janthinellum* e aplicação das enzimas no Branqueamento de Polpas Kraft. Campinas-SP, Universidade Estadual de Campinas, 1994, Tese (Doutorado).

- MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428, 1959
- MUNK, N. Pulpzyme HC: 6 Stage ECF Bleaching. Novo Nordisk, 1993.
- NAKAMURA, S., ISHIGURO, Y., NAKAI, R., WAKABAYASHI, K., AONO, R. e HORIKOSHI, K. Purification and characterization of a thermophilic alkaline xylanase from thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. strain TAR-1. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.1, p.7-15, 1995.
- NOE, P.; CHEVALIER, J.; MOURA, F. e COMTAT, J. Action of xylanase on chemical pulp fibers. Part-II- Enzymatic beating. **J.Wood Chem. Technol.** v.6, p.167, 1986.
- PAICE, M. G.; GURNAGUL, N.; PAGE, D. H.; JURASEK, L. Mechanism of hemicellulose-directed prebleaching of kraft pulps. **Enz. Microb. Technol.** v.14, p.272-276, 1992.
- PANBANGRED, W.; SHINMYO, A.; KINOSHITA, S. e OKADA, H. Purification and Properties of Endoxylanase Produced by *Bacillus pumilus*. **Agric. Biol. Chem.** v.47, n.5, p.957-963, 1983.
- PATIL, T.A. ; JAFARABAD, K.R.; SAWANT, S.B. e JOSHI, J.B. Enzyme Mass Transfer Coefficient in Aqueous Two Phase System Using a Packed Extraction Column. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v.69, p.548-556, 1991.
- PAWAR, P.A.; PARAS-VEERA, U.; SAWANT, S.B. e JOSHI, J.B. Enzyme Mass Transfer Coefficient in Aqueous Two-Phase Systems: Modified Spray Extraction Columns. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v.75, p.751-758, 1997.
- PELLERIN, P.; GOSSELIN, M.; LEPOUTRE, J. -P.; SAMAIN, E. e DEBEIRE, P. Enzymic production of oligosaccharides from corncob xylan. **Enzyme Microb. Technol.** v.13, p.617, 1991.
- PIZA, F.A. . T.; SILOTO, A .S., CARVALHO, C.V. e FRANCO, T.T. Production, characterization and purification of chitosanase from *Bacillus cereus*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering** v.16, n.2, p.185-192, 1999.

- PORTO, A.L.F.; LIMAFILHO, J.L.; AIRES BARROS, M.R.; CABRAL, J.M.S. e TAMBOURGI, E.B. Extraction of Recombinant Cytochrome b(5) from Disrupted *Escherichia coli* Cells with an Aqueous Two-Phase System in a Continuous Perforated Rotating Disc Contactor. **Biotechnology Techniques**, v.11, n.9, p.641-643, 1997.
- RABELO, A.P.B. Estudo da Eficiência de Separação numa Coluna de Extração Líquido-Líquido Mecanicamente Agitada por Palhetas Rotativas. Campinas-SP, Universidade Estadual de Campinas, 1995, Tese (Mestrado).
- RABELO, A.P.B.; PORTO, A.L.F. e TAMBOURGI, E.B. Comparison Between the Perforated Rotating Disc Contactor and Pulsed Caps Column Applied to Cytochrome b5 Extraction, **Process Industry**, no prelo.
- ROBERTS, J. C.; MCCARTHY, A. J.; FLYNN, N. J.; BRODA, P. Modification of paper properties by pretreatment of pulp with *Saccharomonospora viridis* xylanase. **Enz. Microbiol. Technol.** v.12, p.210-213, 1990.
- SAMAIN, E.; DEBEIRE, P.H., TOUZEL, J.P. High level production of a cellulase-free xylanase in glucose-limited fed batch cultures of a thermophilic *Bacillus* strain. **Journal of Biotechnology**, v.58, p.71-78, 1997.
- SCHMIDT, A.S.; VENTOM, A.M.; ASENJO, J.A. Partitioning and Purification of α -amilase in Aqueous Two-Phase Systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v.16, n.2, p.131-142, 1994.
- SEDMAK, J.J. e GROSSBERG, S.E. A Rapid, Sensitive and Versatile Assay for Protein Using Coomassie Brilliant Blue G250. **Analytical Biochemistry**, v.79, p.544-552, 1977
- SENIOR, D. J. e HAMILTON, J. Biobleaching with xylanases brings biotechnology to reality: economic and environmental advantages of using xylanases in bleach plants cataput from the lab to the mill. **Pulp and Paper** v.66, p.111-114, 1992.
- SENIOR, D.J.; HAMILTON, J. e BERNIER, R.L. **Tappi Journal**. v.75, n.11, p.125, 1992.

- SENIOR, D. J.; MAYERS, P. R.; MILLER, D.; SUTCLIFFE, R.; TAN, L.; SADDLER, J. N. Production and purification of xylanases. **ACS Symp. Ser.**, v.399, p.641, 1989.
- SILVA, R.; YIM, D. K.; PARK, Y. K. Application of thermostable xylanases from *Humicola sp* for pulp improvement. **J. Ferment. Bioeng.** v.77, n.1, p.109-111, 1994.
- SILVA, L.H.M. Equilíbrio de Fases em Sistemas Aquosos PEG/Fosfato de Potássio Campinas-SP, Universidade Estadual de Campinas, 1994, Tese (Mestrado).
- SILVA, M.E. e FRANCO, T.T. Uso de polietilenoglicol modificado para purificação de lizozima em sistema de duas fases aquosas (SDFA). "**Ciencia e Tecnologia**", 1999 (prelo).
- SKERKER, P.S.; LABBAUF, M.M.; FARELL, R.L.; BEERWAN, N.; MCCARTHY, P. Proceedings of the Tappi Pulping Conference, Boston, MA, 1-5 Novembro, Tappi Press: Atlanta, GA, 1992.
- TENKANEN, M.; BUCHERT, J.; PULS, J.; POUTANEN, K.; VIIKARI, L. Two main xylanases of *Trichoderma reesei* and their use in pulp processing. In **Xylans and Xylanases**, Visser, J., Beldman, G., Kusters-van Someren, M. A., e Voragen, a. G. J. eds., Elsevier Science, Amsterdam, 1992.
- TOLAN, J.S.; CANOVAS, R.V. The use of enzymes to decrease the Cl₂ requirements in pulp bleaching; Xylanase enzymes improve effectiveness of conventional chemical bleaching. **Pulp and Paper Canada**, v.93, n.5, p.39-42, 1992.
- TREMBLAY, L. & ARCHIBALD, F. Production of a cloned xylanase in *Bacillus cereus* and its performance in kraft pulp prebleaching. **Can. J. Microbiol.** v.39, p.853-860, 1993.
- VERNAU, J e KULA, M. R. Extraction of proteins from biological raw material using aqueous polyethylene glycol-citrate phase systems. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.12, n.4, p.397-404. 1990.
- VIIKARI, L.; KANTELINEN, A.; SUNDQUIST, J. e LINKO, M. Xylanases in bleaching: From an idea to the industry. **FEMS Microbiology Reviews**. v.13, p.335-350, 1994.

- VIIKARI, L.; RANUA, M.; KANTELINEN, A.; SUNDQUIST, J. e LINKO, M. In third Int. Conf. Biotechnol, Proceedings Pulp Paper Industry, Stockholm, p.67-69, 1986.
- VIIKARI, L.; RANUA, M.; KANTELINEN, A.; SUNDQUIST, J. e LINKO, M. In 4th International Symposium on Wood & Pulping Chemistry, Proceedings, Paris, 27-30 Abril, p. 151, 1987.
- VIIKARI, L.; SUNDQUIST, J.; KETTUNEN, J. Xylanase enzymes promote pulp bleaching. **Paperi ja Puu** v.73, p.384, 1991.
- WALKER, S.; LEBRETON, B.; LYDDIATT A. Quantification of the Effective Tie-Line Length of Working Aqueous Two-Phase Systems: Generic Application to the Optimization of Practical Protein Recoveries from Particulate Feedstocks. In 11th International Conference on Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems, Proceedings, Alabama, USA, 27 Junho – 2 Julho, 1999.
- WONG, K. K. Y.; TAN, L. U. L.; SADDLER, J. N.; YAGUCHI, M. Purification of a third distinct xylanase from the xylanolytic system of *Trichoderma harzianum*. **Can J. Microbiol.** v.32, p.570, 1986.
- WONG, K. K. Y.; SADDLER, J. N. *Trichoderma* xylanases, their properties and application. **Critical Reviews in Biotechnol.**, 1992.
- WONG, K. K. Y.; TAN, L. U. L.; SADDLER, J. N. Multiplicity of β - 1, 4- xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiol. Rev.**, v.52, p.305-317, 1988.
- YANG, J.L.; CATES, D.H.; SACON, V.M. Pulping Conference Proceedings, TAPPI PRESS, Atlanta, 1993.
- ZASLAVSKY, B.Y.; MIHEEVA, L.M.; ROGOZHIN, S.V. Possibility of Analytical Application of the Partition in Aqueous Biphasic Polymeric Systems Technique. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.510, p.160-167, 1982.

ANEXOS

EXTRACTION IN AQUEOUS TWO PHASE SYSTEMS OF ALKALINE XYLANASE
PRODUCED BY *BACILLUS PUMILUS* AND APPLICATION IN KRAFT PULP

Trabalho apresentado no 11th International Conference on Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems, Alabama, USA, 27 Junho – 2 Julho, 1999; e artigo submetido a publicação na revista JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY.

EXTRACTION IN AQUEOUS TWO PHASE SYSTEMS OF ALKALINE XYLANASE PRODUCED BY *Bacillus pumilus* AND APPLICATION IN KRAFT PULP

MÔNICA ANDRÉA BIM and TELMA TEIXEIRA FRANCO
Biochemical Engineering Laboratory, Chemical Engineering - UNICAMP PO.Box 6066,
Campinas-SP 13081-970 Brazil fax: 0055-019-7883965 e-mail: franco@feq.unicamp.br

Key words: alkaline xylanases; *Bacillus pumilus*; enzyme purification; aqueous two-phase systems, protein partitioning, downstream processing, kraft pulp bleaching.

ABSTRACT

Xylan, a group of heteropolysaccharides, is an abundant biopolymer found in plant tissues as major component of cell wall, which is hydrolysed by xylanase. Several of the xylanases commercially available produced by fungi are active at neutral or acidic pH and their optimum temperature is below 45°C. Various applications for xylanases in bioconversion and food industries have been suggested and one of the major potential applications of xylanases involves the pulp and paper industry. This way, enzymes which are active at alkaline conditions have great potential in bleaching process without any need for changes in pH and with the advantage in lowering the release of polluting organic chlorine compounds.

The aim of this work was to extract and to purify the enzyme from the crude fermentation broth, produced by *Bacillus pumilus*, using aqueous two phase systems (ATPS).

The enzyme from crude fermentation broth was extracted by partitioning in ATPS composed of phosphate and polyethyleneglycol (PEG). The effect of tie-line length, PEG molecular weight and NaCl concentrations upon the purification factors and yields of xylanase were investigated by statistical design. The best system studied was that one containing 22% PEG6000, 10% K₂HPO₄ and 12% NaCl with a purification factor of 33 and 98% yield of enzyme activity.

This system was also used to carry out a continuous extraction at a pulsed caps column.

Further xylanase from crude fermentation broth was tested at hardwood kraft pulp bleaching.

INTRODUCTION

The large number of potential applications of these enzymes in several fields is one of the main reasons for the investigation of fungal and bacterial xylanase production. Currently the most important application of xylanases is in the prebleaching of kraft pulp. Xylanase prebleaching technology is now in use at several mills, mainly in Scandinavia and Canada, the main driving factors for this technology are the economic and environmental advantages the xylanase brings to the bleach plant [1]. Enzymes active at high temperatures and alkaline pH have great potential as they can be introduced at different stages of the bleaching process without needing changes in pH or temperature [2]. We have isolated and investigated 500 microorganisms for xylanase and cellulase activity and three strains of *Bacillus pumilus* able to produce alkaline xylanase with insignificant levels of cellulases were selected with potentially useful in prebleaching processes [3].

Characteristics of biotechnological systems make purification the more expensive part of biomaterials process production. So, the development of new and economically advantageous purification methods are a challenging area [4]. Purification of target proteins requires their separation from the media or from the raw extract used for the maintenance of the biomolecules. Protein extraction in ATPS is a rapid procedure which avoids most of problems of denaturing fragile molecules providing a gentle environment for biologically active proteins and may be employed on a large scale [5].

The aim of this work was to extract the alkaline xylanase from crude fermentation broth in ATPS using batch and continuous process and to apply xylanase at hardwood kraft pulp bleaching.

EXPERIMENTAL

Materials: Polyethyleneglycol (PEG 1,500; 4,000 and 6,000), potassium phosphate dibasic and sodium chloride (Synth, São Paulo, SP, Brazil). Birchwood xylan (Sigma, Steinheim,

Germany) was used as the substrate. All other chemical and biochemical reagents used were of an analytical grade.

Fermentation broth: It was a kind gift of C.V.Tagliari. Xylanase was produced by *Bacillus pumilus* at 40°C in 2.0 l reactor (Bioflow III - New Brunswick Scientific, New York, USA) with a initial medium volume of 1.5 l. The pH was initially adjusted to 9.5 before sterilisation. Dissolved oxygen concentration was monitored and kept at 50% saturation by automatic control of air flow rate and of the stirring state.

Determination of xylanase activity: - Enzyme activities were determined according to Bailey et al. [6] with Birchwood xylan 1% solution in 100 mM glycine-NaOH buffer at pH 10.0 and 45°C. The amount of reducing sugars were determined according to Miller [7]. One unit of xylanase activity was defined as 1 µmol of xylose produced per minute under the given conditions.

Experimental design: Experimental design was applied to determine the best ATPS to extract the xylanase (Table 1) it was performed, according to Haaland [8].

Table 1. Factors studied in ATPS using a mixed fractionated experimental design

Factor	Real Values of Levels		
	-1	0	1
PEG MW	1500	4000	6000
PEG concentration (%)	16	19	22
Phosphate concentration (%)	10	11.5	13
NaCl concentration (%)	0	6	12

Aqueous two-phase systems preparation: Ten grams of the ATPS, which compositions are shown in Table 1, were prepared in test tubes in duplicate according to Franco et al. [9]. Phase separation was achieved by centrifugation for 5 min. at 3,000 x g. The pH of both phases were approximately 8.5.

Partitioning of total proteins: Five hundred µl of the top phase were transferred from each prepared system to a cuvette containing 1000µl of water and 1500µl of Coomassie blue solution, according to Sedmak and Grossberg [10]. It was mixed well and the A₅₉₅ was read with a spectrophotometer (UV/VIS 911A, GBC Scientific Equipment, Victoria, Australia) , against a blank which had 500 µl of a top phase of a system which had been equally prepared without any sample. The procedure was repeated for the bottom phase of

each system and a BSA standard curve was used to calculate protein concentration. The partition coefficient, K_{protein} , was calculated as the ratio of protein concentration in the top phase to that in the bottom phase at room temperature.

Xylanase partitioning: A known volume of each phase of the ATPS was transferred for the measurement of the enzyme activity. The ratio of the activity in the top phase to the enzyme activity in the bottom phase was calculated (K_{enzyme}).

Electrophoresis: SDS electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out in 12% homogeneous gel [11]. The gels were stained with Bio-Rad silver. The molecular mass markers consisted of phosphorilase b (94 KDa), bovine serum albumin (67 KDa), ovalbumin (43 KDa), carbonic anhydrase (30 KDa), soybean trypsin inhibitor (20 KDa) and α -lactalbumin (14.4 KDa) available as a standard kit (Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Sweden).

Continuous extraction: The continuous experiments of the best ATPS system was performed in a Pulsed Caps Column showed in Figure 1. The column was made of a glass tube (190 mm x 25,4 mm). Located at the centre of the column was a stainless steel shaft in which three stainless steel caps were soldered. Pulses were provided by a device and controlled by a dimmer. The feed of continuous (salt rich phase) and dispersed (PEG rich phase) phases were supplied by a peristaltic pump and fermentation broth was added only in salt rich phase. Samples of both phases were collected at 10, 15, 20, 10, 40, 50, 60 and 70 minutes. The extraction was performed at flow rates of 2,8 and 2,6 ml/min in PEG rich phase and salt rich phase, respectively, and two pulses frequencies 1/1 and 1/5 were used.

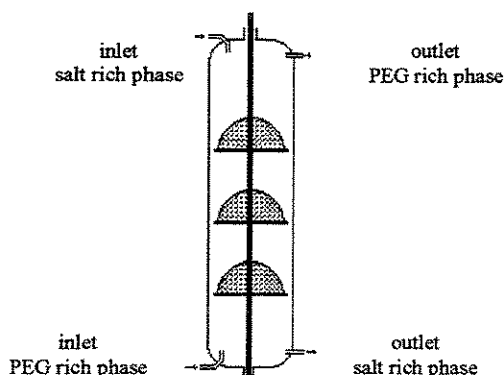


Figure 1: Pulsed Caps Column

Pulp bleaching: Commercial oxygen-bleached kraft pulps of hardwood (eucalyptus) were obtained from a pulp mill (Champion Papel & Celulose SA, Mogi-Guaçu, São Paulo, Brazil). The enzyme treatment was carried out at pulp consistency of 10% in pH 9.0 at 50°C for 120 min. The pulp was treated with crude fermentation broth with xylanase concentration ranging between 5 and 50 U/g dry pulp. The control had exactly the same treatment as those receiving enzyme treatment with the sole omission of enzyme. After the treatment, pulps were washed with water and chemical and physical properties of pulps were analyzed according to TAPPI Test Methods [12] and delignification efficiency which is determined according the following equation:

$$\text{Delig. efficiency} = \frac{\text{initial kappa number} - \text{final kappa number}}{\text{initial kappa number}} \times 100\%$$

RESULTS AND DISCUSSION

Aqueous Two Phase Systems

Partition of biomaterials in aqueous two-phase systems (ATPS) is a selective method for purification and for analytical studies of cellular components of several sizes, including proteins, nucleic acids, membranes and cellular organelles. ATPS is formed by addition of aqueous solutions of two polymers, such as PEG and dextran, or a polymer and a lyotropic salt, such as PEG and potassium phosphate. Extraction and separation process in ATPS can substitute the initial steps of the purification and of preparative chromatography of biomaterials and can be scaled-up, without significant loss of efficiency and is accomplished in the absence of sophisticated equipments [13].

The optimization of ATPS aims high enzyme recovery without affecting biochemical properties. Therefore the xylanase was partitioned in the 12 PEG/phosphate investigated systems (Table 2).

The experimental design showed that the increase of molecular weight of PEG (from 1500 to 6000) raised the partition coefficient of the xylanase. In the same way, the increase of the concentration of NaCl from 0 to 12% contributed for the increase of K_{enzyme} .

Table 2. Compositions of the investigated ATPS and partition coefficients of xylanase (K_{enzyme}) and of contaminant proteins (K_{protein})

Assay	ATPS composition				K_{enzyme}	K_{protein}
	PEG MW	% PEG	% Phosphate	% NaCl		
1	1500	16	10	0	24.1	1.9
2	1500	16	13	12	9.2	1.4
3	1500	22	10	12	1.1	2.6
4	1500	22	13	0	27.5	0.8
5	4000	16	10	12	36.6	0.3
6	4000	16	13	0	2.0	4.3
7	4000	22	10	0	2.2	2.6
8	4000	22	13	12	0.5	0.3
9	6000	16	10	0	5.1	0.3
10	6000	16	13	12	15.2	3.5
11	6000	22	10	12	46.9	0.1
12	6000	22	13	0	23.8	1.0

Another important point to be observed in order to have an effective purification factor is that the contaminant proteins should be extracted in the opposite phase to the target enzyme. Therefore, for a high value of K_{enzyme} it is necessary a small value of K_{protein} , and vice-versa.

The contaminant proteins were partitioned into the bottom salt-rich phase with the highest PEG molecular weight, the highest NaCl concentration and with the lowest phosphate concentration. The K_{protein} decreased from 2.5 to 0.5 with replacing PEG 1,500 by PEG 6,000, absence of NaCl by 12% NaCl and 13% phosphate by 10% phosphate.

Therefore, the best ATPS to purify xylanase was composed by 22% PEG 6,000, 12% NaCl and 10% phosphate with 98% enzyme recovery and a purification factor of 33. Gaikaiwari et al. [14] used ATPS to purify xylanase, although they reached only a purification factor of about 2.6 with 98% enzyme recovery. Partitioning of xylanase produced by *Penicillium janthinellum* was studied in ATPS by Costa [15]. The optimum conditions found were pH 7.0, 8.8% PEG 4,000, 10% phosphate and 6.0% NaCl. The xylanase partitioning coefficient (K_{enzyme}) was 2.21 with purification factor 1.34 and 80% recovery of xylanase.

Figure 2 illustrates the SDS-PAGE electrophoresis of the main proteins in the fermentation broth of *B. pumilus* and the protein bands of the purified material.

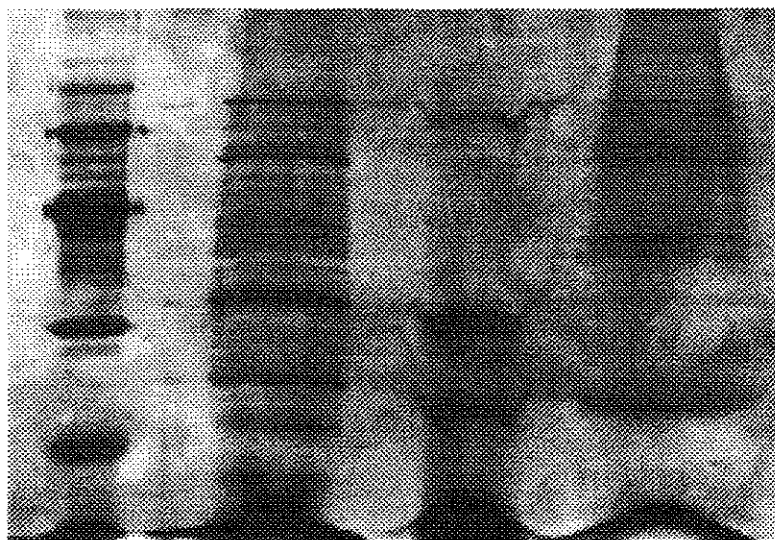


Figure 2. SDS-PAGE of purification step in ATPS. . Lane 1) molecular markers (Phosphorylase b 94,000 Da; Bovin Serum Albumin 67,000 Da; Ovalbumin 43,000 Da; Carbonic Anhydrase 30,000 Da; Trypsin Inhibitor 20,200 Da and Lactalbumin 14,400 Da; 2) fermentation broth; 3) top phase and 4) bottom phase

Most of xylanase activity is in top phase where there are only three main bands with MW of 22,600, 32,600 and 74,200 Da. Lumba and Penninckx [16] purified three xylanases produced by *Streptomyces sp.* with MW of 21,000, 22,000 and 32,000 Da. Nakamura et al. [17] obtained a xylanase of 40,000 Da; Blanco et al. [18] a xylanase of 32,000 Da by *Bacillus sp.* and Panbangred et al. [19] a xylanase of 24,000 Da by *B. pumilus*. Xylanases with low molecular weight are required in pulp bleaching tests to be able to scattering into pulp fibers.

Elucidation of the exact mechanisms of xylanase aided bleaching method is a key question. One hypothesis says xylan hydrolyzed by xylanase make the fibre structure more porous and thus more permeable to the extraction of lignin by chemicals. Another possible explanation involves the role of redeposited xylan, this redeposited xylan may physically shield the residual lignin from bleaching chemicals. Xylanase hydrolyze part of the redeposited xylan, allowing better access of bleaching chemicals to the residual lignin [20].

Continuous Extraction in ATPS

Purification in ATPS can be developed in continuous operation and countercurrent flow, using classic liquid-liquid extraction equipments. This technique, among other advantages, reduces the processing time [5]. A kind of equipment is perforated plate columns which have proven very effective, with respect to liquid-handling capacity and efficiency of extraction, particularly for systems of low interfacial tension [21].

The continuous extraction process was carried out at pulsed caps column using the top and bottom phase of the ATPS initially composed by 22% PEG 6,000, 12% NaCl and 10% phosphate. Fermentation broth was added only in bottom phase. Figures 3 and 4 show the xylanase activity in both phases and pulse frequencies (1/1 and 1/5).

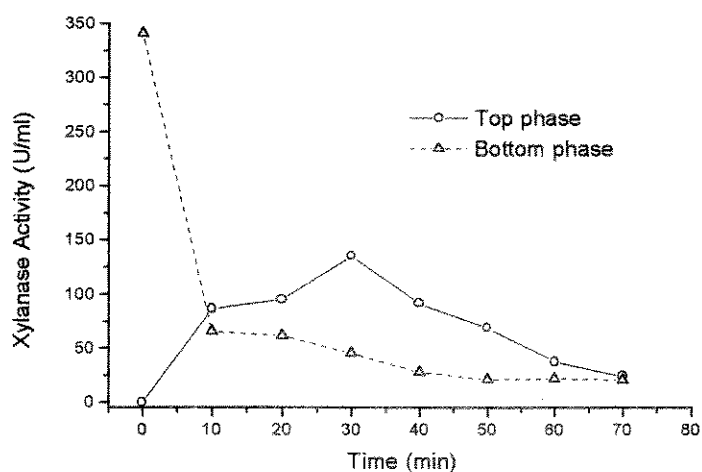


Figure 3. Xylanase activity at pulse frequency 1/1

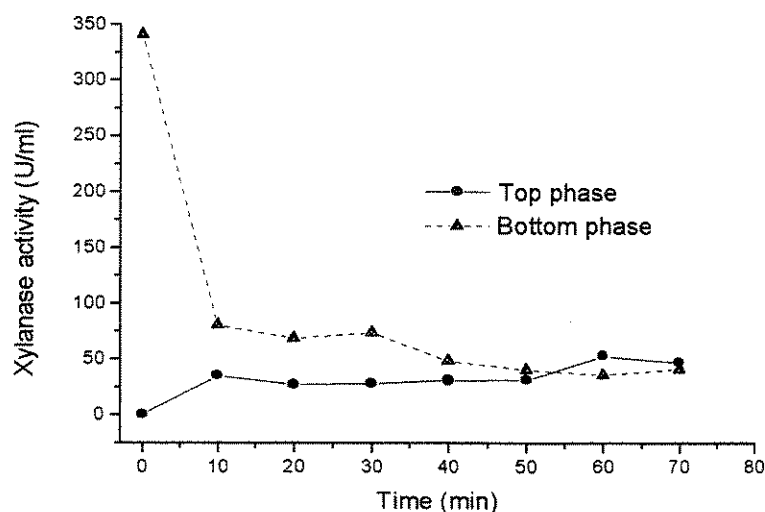


Figure 4. Xylanase activity at pulse frequency 1/5

Figures 3 and 4 do not show large differences between the two pulse frequencies experimented. These experiments did not present advantages upon batch experiment using 22% PEG6,000, 10% phosphate and 10% NaCl because xylanase was equally partitioned in both phases. Agitation in liquid-liquid extraction breaks liquid drops inside the column, this fact promotes decreasing of drops size and increases the mixture of phases. This way, the contact area between the phases is increased and the mass transfers also increases. However, this behaviour was not found at this work, probably because a stable emulsion was formed in the system interrupting mass transfer. Carneiro da Cunha et al. [22] have also observed problem of mass transfer with this sort of equipment. Currently we are improving the extraction the best system in order to break this emulsion.

Pulp bleaching

The results of xylanase bleaching of commercially hardwood kraft pulp are show at Table 3.

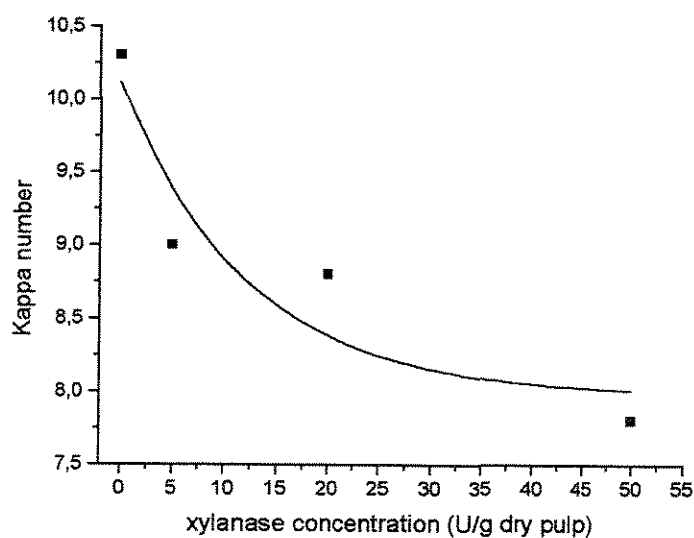
Table 3. Xylanase bleaching of hardwood kraft pulp

Assay	Xylanase concentration (U/g dry pulp)	Time (hours)	Kappa number	Brightness	Viscosity	Delignification Efficiency %
E ₀			10.5	49.2	41.0	
E	5	2	9.0	50.9	42.8	14
E	20	2	8.8	52.0	42.4	16
E	50	2	7.8	52.6	42.0	26
C		2	10.3	48.8	42.0	

E₀ - kraft pulp before xylanase treatment

E - kraft pulp after xylanase treatment

C - control without xylanase

**Figure 5. Kappa number vs xylanase concentration**

According to Table 3 and to Figure 5 kappa number decreased 2.5 units from 10.3 (control without enzyme) to 7.8 and xylanase treatment also had no effect on the viscosity of pulp, indicating that xylanase did not affect pulp fibers.

Bocchini et al. [23] obtained only one unit decreasing in kappa number decreasing by enzymatic treatment. They continue the chemical bleaching with ClO₂ and alkaline extraction (NaOH) reaching reduction of 23% and 37% of ClO₂ and NaOH, respectively.

Munk [24] used xylanase treatment and further ECF (elementary chlorine free) reaching reduction of 1.4 units in kappa number after xylanase treatment and at the end of bleaching they saved 25% and 16% of active chlorine and NaOH, respectively.

In general, xylanase treatment has been shown to reduce the requirement of chlorine for bleaching while still achieving high brightness and good pulp properties. Results from laboratory studies and mill trials showed about 20-25% reduction in total active chlorine for hardwoods and 10-15% for softwoods [25, 26, 27, 28]. Therefore, xylanase treatment of pulps reduces bleach chemical requirements and permits reaching higher brightness. The reduction in chemical charges can translate into significant cost savings when high levels of chlorine dioxide and hydrogen peroxide are used. Reduction in the use of chlorine chemicals reduces the formation and release of chlorinated organic compounds in the effluents and in the pulps [1].

CONCLUSION

The ATPS composition of 22% PEG 6,000, 10% K_2HPO_4 and 12% NaCl has proved to be an excellent system for the concentration and purification of the xylanase in a single-step operation. A purification factor of 33 and 98% of enzyme yield were achieved in the top phase of this system.

Continuous extraction in a perforated plate column is currently being developed.

Although the effect of xylanase treatment on hardwood pulp was significant, it is necessary to study a full bleaching sequence in order to know how much chlorine could be saved.

REFERENCES

- [1] P. Bajpai, *Biotechnology Progress* 15:2 (1999) 147-157.
- [2] Y. Shoham, Z. Schwartz, A. Khasin, O. Gat, Z. Zosim, E. Rosenberg, *Biodegradation* 3 (1992) 207-218.

- [3] M.C.T. Duarte, E.P. Portugal, A.N. Ponezi, M.A. Bim, C.V. Tagliari, T.T. Franco, *Bioresource Technology* 68:1 (1999) 49-53.
- [4] A.P.B. Rabelo, E.B. Tambourgi, *Process Industry*, submitted for publication.
- [5] M.R. Kula, *Bioseparation*, 1 (1990) 181-189.
- [6] M.J. Bailey, P. Biely, K. Poutanen, *J. Biotechnology* 23 (1992) 257-270.
- [7] G.L. Miller, *Analytical Chemistry* 31 (1959) 426-428.
- [8] P.D. Haaland, in Ed. Marcel Dekker, *Experimental Design in Biotechnology*, New York, 1989.
- [9] T.T. Franco, A.T. Andrews, J.A. Asenjo, *Biotechnology and Bioengineering*, 49(1996b) 300-308.
- [10] J.J. Sedmak, S.E. Grossberg, *Analytical Biochemistry* 79 (1977) 544-552.
- [11] U.K. Laemmli, *Nature*, 227 (1970) 680-685.
- [12] TAPPI Test Methods: T 205 om-88 (forming handsheets for physical tests of pulp), T 236 cm-85 (kappa number which measures the amount of residual lignin in pulp), T 230 om-94 (viscosity of pulp) T 525 om-86 (brightness of pulp).
- [13] Albertsson, in Interscience, *Partition of Cell Particles and Macromolecules*. 2nd ed. New York, 1971.
- [14] R. Gaikawari, A. Shendye, N. Kulkarni, M. Rao, *Biotech. and Applied Biochem*, 23 (1996) 237-241.
- [15] S.A. Costa, A. Pessoa, I.C. Roberto, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 70-2 (1998) 629-639.
- [16] F.L. Lumba, M.J. Penninckx, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36 (1992) 733-738.
- [17] S. Nakamura, Y. Ishiguro, R. Nakai, K. Wakabayashi, R. Aono, K. Horikoshi, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 1(1995) 7-15.
- [18] A. Blanco, T. Vidal, J.F. Colom, F.I.J. Pastor, *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (1995) 4468-4470.
- [19] W. Panbangred, A. Shinmyo, S. Kinoshita, H. Okada, *Agric. Biol. Chem.* 47:5 (1983) 957-963.
- [20] L. Viikari, A. Kantelinen, J. Sundquist, M. Linko, *FEMS Microbiology Reviews* 13 (1994) 335-350.

- [21] R.E. Treybal, in MacGraw Hill, Mass Transfer Operations, Auckland, 1982, p. 424-426.
- [22] M.G. Carneiro da Cunha, M.R. Aires Barros, E.B. Tambourgi, J.M.S. Cabral, *Biotechnology Techniques*, 8:6 (1994) 413-418.
- [23] D.A. Bocchini, V.B. Tavares, R. Silva, 30° Congresso Anual de Celulose e Papel da ABTCP, 1997.
- [24] N. Munk, *Pulpzyme HC: 6 Stage ECF Bleaching* Novo Nordisk, 1993.
- [25] L. Viikari, M. Ranua, A. Kantelinen, J. Sundquist, M. Linko, *Proceedings of the 4th International Symposium on Wood & Pulping Chemistry*, Paris, April 27-30, 1987, p. 151.
- [26] J. Buchert, M. Siika-aho, A. Kantelinen, M. Ranua, L.Viikari, Presented at the 5th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, Kyoto, Japan, May 27-30, 1992.
- [27] P.S. Sherker, R.L. Farrell, *Proceedings of the International Pulp Bleaching Conference*, Stockholm, Sweden, June 11-14, 1991, p.93.
- [28] J.L. Yang, G. Lou, K.E.L. Eriksson, *Tappi Journal*, (1992), 95-101.

AKNOWLEDGEMENTS

Prof. Dr. Elias B. Tambourgi, Dr. Marta C.T. Duarte and M. Flávio Tessa (Champion Papel e Celulose from Brazil).

PURIFICATION OF ALKALINE XYLANASE BY LIQUID-LIQUID EXTRACTION IN
AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS.

Trabalho apresentado no Quinto Simpósio Brasileiro sobre química de ligninas e outros componentes da madeira. Curitiba, 31 de agosto a 5 de setembro de 1997 e artigo publicado na revista BIORESOURCE TECHNOLOGY em maio de 1999 (v.68, p.49-53, 1999).

Production and purification of alkaline xylanases

M.C.T. Duarte^a, E.P. Portugal^a, A.N. Ponezi^a, M.A. Bim^b, C.V. Tagliari^b,
T.T. Franco^{b*}

^aCPQBA/UNICAMP, PO Box 6171, Campinas 13081-970, SP, Brazil

^bFEQ/UNICAMP, PO Box 6066, Campinas 13081-970, SP, Brazil

Received 5 September 1997; revised 15 December 1997

Abstract

This work investigated more than 500 colonies with xylanolytic activity which were able to grow in a medium containing corn xylan as the only carbon source. Out of the 500 colonies, 22 microorganisms were also able to grow in birchwood xylan and were cellulase-free producers. The xylanase activity was studied at pH 10.0 and pH 5.0. It was observed that the three best producers of alkaline xylanase yielded enzyme levels in the range of 2.6 to 4.0 U/ml. Enzyme levels of 1.0 to 1.25 U/ml were achieved by four other microorganisms. Conversely, there were three microorganisms that produced a xylanase which was mostly active at pH 5.0. There was just one microorganism able to produce an enzyme active at pH 10.0.

The alkaline xylanases from crude fermentation broth were extracted in aqueous two-phase systems (ATPS) composed of 16% polyethyleneglycol (PEG 6000) and 8% phosphate salt. A purification factor of 57 and a 41% yield of enzyme activity were achieved for the system containing 16% PEG 6000, 8% K_2HPO_4 and 12% NaCl. © 1998 Published by Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Alkaline xylanases; *Bacillus pumilus*; Enzyme purification; Aqueous two-phase systems; Protein partitioning; Downstream processing

1. Introduction

Extremophilic enzymes, which are active under alkaline conditions and higher temperatures, have great potential for industrial application, such as the bleaching process, without any need for cooling or changes in pH (Shoham *et al.*, 1992). In the case of agrofiber or kraft processing, enzyme preparations with low cellulase activity are also desirable. Currently, most of the commercially available xylanases have been produced by fungi and are active at neutral or acidic pHs and their optimum temperatures for activity are below 45°C.

The polysaccharide xylan comprises the major part of the hemicellulose fraction of many plant materials. It is mainly formed by heteropolysaccharides of a chain of β -1,4-linked D-xylanopyranose units highly substituted mostly by acetyl, arabinosyl and glucopyranosyl residues (Aspinall, 1980). Xylanases are important enzymes for the degradation of plant materials and for releasing the readily assimilable carbon sources.

The xylan chemical modification by xylanases can be used for several different applications which require lignocellulolytic bioconversion, such as paper and cellulose production and textile, food and feed industrial processes (Milagres & Prade, 1993; Silva *et al.*, 1994).

Purification of target proteins requires their separation from the media or from the raw extract used for the maintenance of the biomolecules. The product is usually present at low levels and also needs to be concentrated. Protein extraction in aqueous two-phase systems (ATPS) is a rapid procedure which avoids most of the problems of denaturing fragile molecules in chromatographic beads. ATPS provide a gentle environment for biologically active proteins and may be employed on a large scale (Kula, 1990). In order to have a high yield, recovery and also a good purification factor for a target protein, a composition of the ATPS has to be selected to quantitatively extract the desirable protein from one of the phases with minimal concentration of contaminant molecules (Franco *et al.*, 1996).

The purpose of this work was to isolate bacteria able to produce alkaline xylanases, and to characterize and purify the enzymes. Two isolates (B and I) identified as

*Corresponding author.

Bacillus pumilus produced the highest xylanase activity and they were cellulase-free. Despite belonging to the same species, they were characterized as different strains. Xylanase isolated from *B. pumilus* was purified in an aqueous two-phase system composed of PEG 6000 and K_2HPO_4 . The effect of NaCl concentration (3, 6, 9 and 12% w/w) in improving the recovery of xylanase was also investigated.

2. Methods

2.1. Materials

Polyethylene glycol (PEG 6000, Synth, Brazil), potassium phosphate dibasic and sodium chloride (Ecibra, Brazil). Birchwood xylan (Sigma, USA) was used as the substrate. All other chemical and biochemical reagents used were of an analytical grade.

2.2. Screening of microorganisms

Microorganisms with xylanolytic activity were isolated from several sources of soil and wood decomposition material from Holambra, SP, Brazil. The isolates were screened and maintained on corn xylan agar and subcultured monthly. The xylanase was screened for using 1% xylan in 1.5% agar overlaid on Petri dishes. Xylanases-producing bacteria created clear halos around colonies on xylan plates. The screening for cellulase-free microorganisms was done using 1% carboxymethylcellulose (CMC) in 1.5% agar overlaid on Petri dishes. Cellulase activity was detected by staining the CMC plates with 1% Congo red in water for 15 min while shaking. The plates were rinsed with 1 M NaCl and colonies expressing cellulase appeared as clear zones (Tremblay & Archibald, 1993). After fermentation, this was confirmed by cellulase activity in filtrates according to the IUPAC method (Ghose, 1987).

2.3. Enzyme production

For the enzyme production, the isolated microorganisms previously incubated for 48 h were transferred to 50 ml Erlenmeyer flasks containing 7 ml of the following culture medium (Mandels & Stenberg, 1976): xylan Birchwood (Sigma), 10.0 g; peptone, 1.0 g; Tween 80, 1.0 g; $(NH_4)_2SO_4$, 1.4 g; KH_2PO_4 , 2.0 g; urea, 0.3 g; $CaCl_2$, 0.3 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.3 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 5.0 mg; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 1.6 mg; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.4 mg; $CoCl_2$, 2.0 mg; distilled water to 1000 ml; adjusted to pH 10 with 2 N NaOH. Fermentation was carried out for 48 h at 45°C. The fermented medium was centrifuged for 15 min at 12,000g and filtered in 0.22 μ m Millipore membrane.

2.4. Determination of xylanase activity and stability

Enzyme activities at pH 5 were determined according to Bailey *et al.* (1992) and the amount of reducing sugars was determined according to Mille (1959), and activities at pH 10 were measured under the same standard assay conditions, replacing the previous buffer by 100 mM glycine–NaOH buffer at 45°C. Enzyme stability was determined by measuring xylanase activity of samples previously incubated at pH 10 at 45°C. Xylan from birchwood (Sigma) was used as substrate. One unit of xylanase activity was defined as 1 μ mol of xylose produced per minute under the given conditions.

2.5. Aqueous two-phase systems preparation

5 g of 16% PEG 6000/8% K_2HPO_4 (w/w) systems was prepared in test tubes in duplicate from stock solutions of 40% polyethyleneglycol (PEG) 6000 and 40% w/w dipotassium hydrogen phosphate (w/w). Solid NaCl was added when necessary and the remainder was fermented broth. The aqueous systems were mixed with a Vortex for 1 min. Phase separation was achieved by centrifugation for 3 min at 3000g.

2.6. Partitioning of total proteins

50 to 100 μ l of the top phase was transferred from each prepared system to a cuvette containing 2.4 ml of water and 1.0 ml of Coomassie blue solution, according to Sedmak & Grossberg (1977). It was mixed well and the A_{595} was read with a spectrophotometer, against a blank which had 50 μ l of a top phase of a system which had been equally prepared without any sample. The procedure was repeated for the bottom phase of each system and a BSA standard curve was used to calculate protein concentration. The partition coefficient, K , was calculated as the ratio of protein in the top phase to that in the bottom phase at room temperature.

2.7. Xylanase partitioning

A known volume of each phase of the ATPS was transferred for the measurement of the enzyme activity. The ratio of the activity in the top phase to the enzyme activity in the bottom phase was calculated.

2.8. Electrophoresis

SDS electrophoresis was carried out in 12% homogeneous gel (Laemmli, 1970) in the Mini-Protean II system (Biorad). The staining was carried out in Blue Coomassie R-250. The standard markers used for MW were from Pharmacia: phosphorylase b (94,000),

bovine serum albumin (BSA, 67,000), ovalbumin (43,000), carbonic anhydrase (30,000), soybean trypsin inhibitor (20,100), α -lactalbumin (14,400).

3. Results and discussion

In order to produce alkaline xylanase, 500 microorganisms from different soil sources were screened in corn xylan-containing culture media at pH 10.0 at 45°C. 75 isolates were able to grow and to create clear halos on corn xylan plates and only 22 produced clear halos on birchwood xylan plates. As they had also been incubated on CMC plates, with carboxymethylcellulose as the only carbon source, the 22 microorganisms chosen for investigation in this work were cellulase-free producers. Cellulase activity was also investigated by incubating the filtered fermented broth with filter paper according to IUPAC, and the cellulase levels were found to be below 0.009 U/ml.

Xylanase activity was determined at pH 10.0 because of the similarity of these pH conditions with the bleaching process for paper and cellulose. The activity assays at pH 5.0 were carried out for comparison with the fungal enzymes which are mostly active at neutral or acidic pHs according to the literature (Dahlberg *et al.*, 1996).

It was observed that the best producers of alkaline xylanase were microorganisms B, I and K which yielded enzyme levels from 2.6 to 4.0 U/ml (Fig. 1). The isolates B, I, K and L were identified as different strains of *Bacillus pumilus*.

Enzyme levels of 1.0 to 1.25 U/ml were achieved by microorganisms L, M, R and S. In contrast, microorganisms N, O and P produced xylanases which were mostly active at pH 5.0. It is important to notice that microorganism L was able to produce an enzyme which was only active at pH 10.0. The behaviour of the latter microorganism suggests that a different enzyme may

have been produced by L, which did not degrade xylan at pH 5.0 or become unstable at this pH. The enzyme production profile observed for the B, I, K, M, N, O, P, R and S microorganisms may indicate the formation of two different enzymes, one of which would be most active at acidic pH and the other at alkaline pH. However, it can also indicate the production of enzymes with completely different structures.

Table 1 reports the specific activity of the alkaline xylanases.

Figure 2 illustrates the SDS-PAGE electrophoresis of the main proteins excreted by microorganisms S, M and N and Fig. 3 shows the gel of the extracellular proteins of microorganisms K, B and L. Electrophoresis gel of a blank of culture medium before fermentation has not shown any protein bands. The molecular weight of the main protein bands was estimated to be about 78,900, 63,800, 24,500 and 15,500 Da.

For enzyme purification, the production of alkaline xylanases and of total proteins by *B. pumilus* was monitored every 4 h. Maximum xylanase activity was achieved at 24 h of cultivation and after that the xylanase level decreased. The specific activity in the fermented broth was 0.97 U/mg of protein.

The stability of xylanase from microorganism I was investigated at pH 10.0 in order to verify the suitability of the enzyme for the bleaching process of alkaline cellulose pulps. It was observed that the xylanase relative stability was reduced to 75% after incubation at 45°C for 30 min and remained above 65% after 80 min of incubation in these conditions. Stability assays of xylanases produced by the other microorganisms are currently being investigated.

In order to purify the alkaline xylanase, the fermentation broth from microorganism I was mixed with PEG 6000 and phosphate at pH 10.0, since this enzyme is able to hydrolyse xylan at this pH. The final composition of the ATPS was 16% PEG 6000 and 8% K_2HPO_4 .

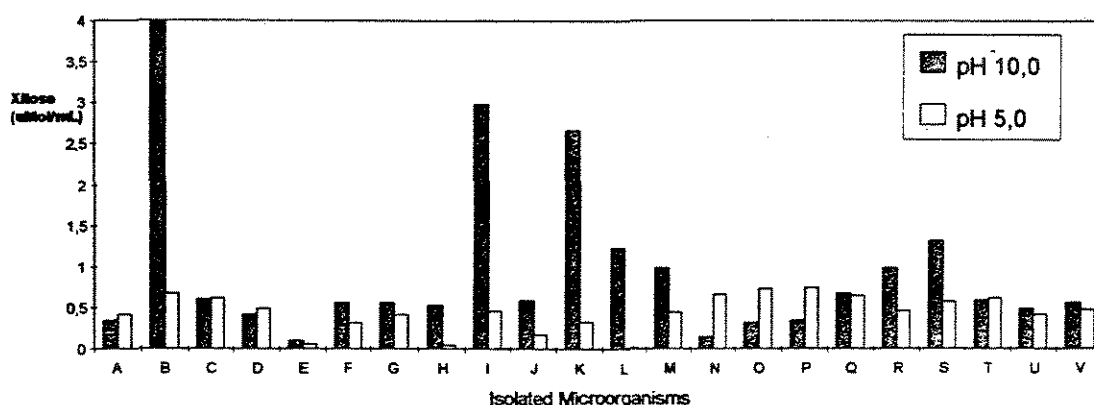


Fig. 1. Xylanase activity of 22 isolates at pH 5.0 and 10.0 at 45°C.

Table 1

Xylanase activity, extracellular protein and specific activity of the best xylanase producers strains

Strain	Xylanase activity (U/l)	Protein (mg/l)	Specific activity (U/mg)
B	3983	96.9	41.1
I	2981	94.1	31.7
K	2659	93.4	28.5
L	1228	97.1	12.7
M	978	88.5	11.1
N	143	128.6	1.1
O	310	89.7	3.5
S	1312	75.8	17.1

and the enzyme concentration was 183 U/l of aqueous system.

Table 2 shows the influence of NaCl concentration upon the xylanase and protein partition coefficients. It

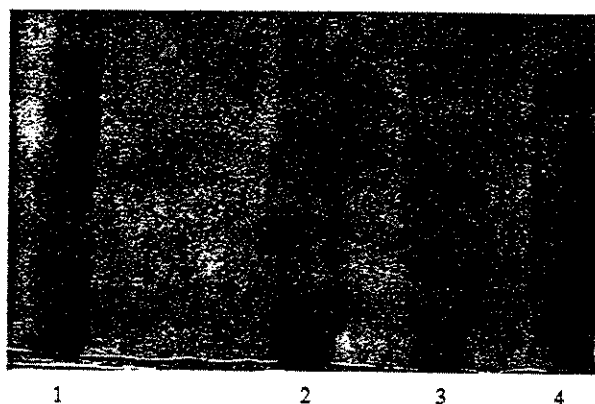


Fig. 2. SDS-PAGE of fermented media by isolates S, I and N. Lane 1: molecular markers. Lane 2: strain S. Lane 3: strain I. Lane 4: strain N.

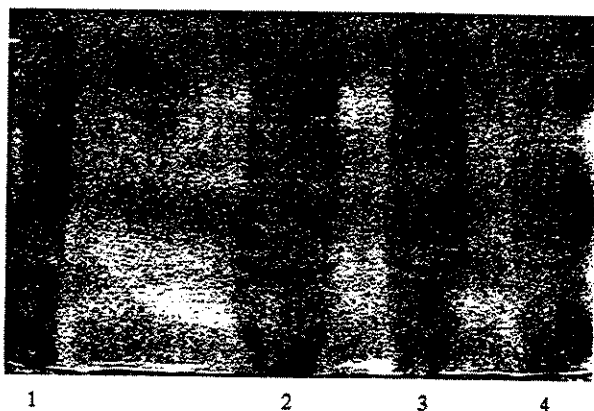


Fig. 3. SDS-PAGE of fermented media by isolates K, B and L. Lane 1: molecular markers. Lane 2: strain K. Lane 3: strain B. Lane 4: strain L.

Table 2

Effect of NaCl concentration upon the partition coefficient of the xylanase and of total proteins in the 16% PEG 6000/8% K_2HPO_4 aqueous system

%NaCl	K_{enzyme}	K_{protein}
0	0.7	0.3
3	2.5	2.7
6	4.9	5.3
9	3.0	2.0
12	0.7	108

was observed that xylanase partitioned towards the bottom phase in the absence of NaCl and in systems containing 6 and 12% NaCl and that it partitioned towards the top phase in systems containing 3 and 9% NaCl. However, the xylanase partition coefficient was affected less by the addition of NaCl to the ATPS than the total proteins. The partition coefficient of the total proteins was strongly influenced by NaCl concentration. The K value of the protein was raised from 0.3 to 108 in systems in the absence of NaCl and in systems containing 12% NaCl, respectively.

The results of the purification of *B. pumilus* xylanase are summarised in Table 3. Figure 4 clearly shows that the best separation of the enzyme from the contaminant material is achieved in PEG 6000/phosphate systems with 12% NaCl. As the enzyme partitions towards the bottom phase and the contaminant proteins (total proteins) were mainly collected in the top phases of the systems composed of 16% PEG 6000/8% K_2HPO_4 +12% NaCl, the purification factor was increased 57-fold in a single-step operation. The xylanase yield in the bottom phase was 41%. Material isolated from the top and from the bottom phases of PEG 6000/phosphate+12% NaCl was applied into SDS electrophoretic gels. Figure 5 shows that the top phase contained most of the contaminant proteins (large number of protein bands) and that the bottom phase only contained two main protein bands. This figure expresses the potential application of partitioning the fermented broth for the primary purification of

Table 3

Enzyme and protein yield and purification factor of *Bacillus pumilus* (strain I) xylanase in the 16% PEG 6000/8% K_2HPO_4 aqueous system

% NaCl	Enzyme yield		Protein yield		Enzyme purification factor	
	Top	Bottom	Top	Bottom	Top	Bottom
0	64	58	37	87	1.73	0.67
3	130	45	66	16	1.96	2.90
6	56	50	82	12	0.69	4.16
9	172	46	94	16	1.85	1.25
12	41	41	114	0.8	0.36	57

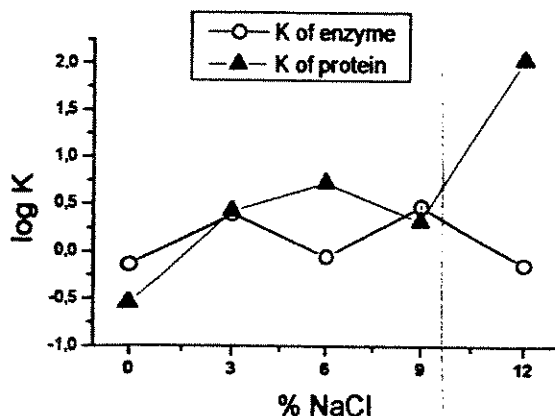


Fig. 4. Effect of NaCl upon xylanase and total proteins partition coefficients in the 16% PEG 6000/8% K_2HPO_4 aqueous system.

alkaline xylanase, since a significant reduction of contaminants was achieved in a single-step procedure. Current experiments are being carried out to investigate the effect of PEG molecular weight upon purification of the enzyme.

Gaikaiwari *et al.* (1996) have separated xylanase from *Bacillus* sp in ATPS by using two-step operations: the first in 8% phosphate and 16% PEG 8000 and the second in 12% phosphate and 8% PEG 8000 with a 1.2 purification factor and an 85% yield of enzyme activity.

4. Conclusion

Out of 500 microorganisms, 22 isolates were able to grow and produce clear halos in softwood and

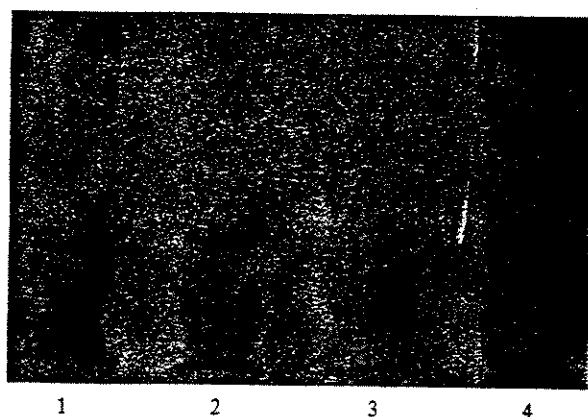


Fig. 5. SDS-PAGE of purification step in ATPS. Lane 1: molecular markers. Lane 2: fermentation broth. Lane 3: bottom phase. Lane 4: top phase.

hardwood xylan media, as the only carbon source. The best producers were identified as four different strains of *B. pumilus*. Amongst all isolates, *B. pumilus* B was the best producer of alkaline xylanase. The specific enzyme activity of isolate B was 41.1 U/mg of extra-cellular protein.

The ATPS composition of 8% K_2HPO_4 , 16% PEG 6000 and 12% NaCl has proved to be an excellent system for the concentration and purification of the xylanase in a single-step operation. A purification factor of 57 and 41% of enzyme yield were achieved in the bottom phase of this system.

References

- Aspinall, G.O., 1980. Chemistry of cell wall polysaccharides. In *The Biochemistry of Plants. Carbohydrates: Structure and Function*, Press, J. (Ed.), Vol. 3, pp. 473–500. Academic Press, New York.
- Bailey, M.J., Biely, P., Poutanen, K., 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology* 23, 257–270.
- Dahlberg, L., Holst, O., Kristjansson, J.K., 1996. Thermostable xylanolytic enzymes from *Rhodothermus marinus* grown on xylan. *Applied Microbiology and Biotechnology* 40, 63–68.
- Franco, T.T., Andrews, A.T., Asenjo, J.A., 1996. Use of chemically modified proteins to study the effects of single protein characteristics in aqueous two-phase systems. Effect of surface hydrophobicity. *Biotechnology and Bioengineering* 49, 300–308.
- Gaikaiwari, R., Shendye, A., Kulkarni, N., Rao, M., 1996. Two-phase separation of xylanases from alkalophilic thermophilic *Bacillus* using a poly(ethylene glycol)– K_2HPO_4 system. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 23, 237–241.
- Ghose, T.K., 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry* 59(2), 257–268.
- Kula, M.R., 1990. Trends and future of aqueous two-phase extraction. *Bioseparation* 1, 181–189.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Mandels, N., Stenberg, D., 1976. Recent advances in cellulase technology. *Journal of Fermentation Technology* 54, 267–286.
- Milagres, A.M.F., Prade, R.A., 1993. Characterization of xylanase production by local isolated *Penicillium janthinellum*. *Enzyme and Microbial Technology* 15, 248–253.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31, 426–428.
- Sedmak, J.J., Grossberg, S.E., 1977. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G250. *Analytical Biochemistry* 79, 544–552.
- Silva, R., Yim, D.K., Park, Y.K., 1994. Application of thermostable xylanases from *Humicola* sp for pulp improvement. *Journal of Fermentation Bioengineering* 77(1), 109–111.
- Shoham, Y., Schwartz, Z., Khasin, A., Gat, O., Zosim, Z., Rosenberg, E., 1992. Delignification of wood pulp by a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* strain T-6. *Biodegradation* 3, 207–218.
- Tremblay, L., Archibald, F., 1993. Production of a cloned xylanase in *Bacillus cereus* and its performance in kraft pulp prebleaching. *Canadian Journal of Microbiology* 39, 853–860.

PURIFICAÇÃO DA XILANASE ALCALINA EM SISTEMAS DE DUAS FASES
AQUOSAS

Trabalho apresentado oralmente no XII Simpósio Nacional de Fermentações - SINAFERM.
Universidade Federal de Uberlândia 4 a 7 de agosto de 1998.

PURIFICAÇÃO DA XILANASE ALCALINA EM SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS

Bim, Mônica A. e Franco, Telma T.

Laboratório de Engenharia Bioquímica, Faculdade de Engenharia Química -UNICAMP Caixa Postal 6066, Campinas-SP CEP 13081-970 Brasil - e-mail: franco@feq.unicamp.br

RESUMO: Este trabalho investigou a purificação da enzima alcalina obtida da fermentação do *Bacillus pumillus*, em sistemas de duas fases aquosas (SDFA). Foi utilizado planejamento fatorial, visando a maximização do rendimento, do fator de purificação, da eliminação do material contaminante bem como a preservação máxima da atividade biológica enzimática, considerando as propriedades bioquímicas das mesmas. Os fatores estudados foram o peso molecular do polietilenoglicol (PEG) e as concentrações de PEG, de fosfato e de cloreto de sódio. Foi verificado que a xilanase alcalina foi preferencialmente extraída na fase superior (fase rica em PEG) do SDFA. O fator de purificação e o rendimento obtido para o melhor sistema foi de 33 e 98% respectivamente.

INTRODUÇÃO

Uma das principais aplicações da xilanase é no branqueamento de polpa de papel. Pressões de mercado, ambientais e legislativas têm forçado as indústrias de papel a modificarem seus processos de polpação e branqueamento, para reduzir o impacto ambiental de seus efluentes. Xilanasas têm sido empregadas durante o processo de pré-branqueamento da polpa de madeira, com intuito de diminuir a carga de cloro utilizada na etapa subsequente de branqueamento de polpa kraft.

Os materiais lignocelulósicos, primariamente compostos de celulose, hemicelulose e lignina, constituem a principal fonte de biomassa do planeta, a partir dos quais muitos alimentos ou produtos químicos podem se derivar. A hemicelulose apresenta como constituinte principal a xilana, um heteropolímero composto de ligações β -1,4 de resíduos de D-xilanopirosil (Detroy, 1981).

A degradação enzimática da hemicelulose se dá pela ação sinérgica de endo e exo-xilanasas (1,4- β -D-xilana hidrolase), que hidrolisam a cadeia principal de xilana, e β -xilosidases (β -D-xilosideo xilohidrolase) que hidrolisam xilooligômeros. Ainda, para a

hidrólise completa de heteroxilo-oligossacarídeos, são necessárias enzimas que hidrolisem os grupos substituintes (Biely, 1985).

A matéria prima de várias indústrias de alimentos, rações e de papel e celulose, tem como componente integral o polissacarídeo hemicelulolítico xilana. A modificação deste polissacarídeo pode ser obtida pela ação de xilanases, gerando novos processos de produção bem como novos produtos.

A remoção seletiva da xilana da polpa pelo uso de xilanases microbianas, além de apresentar uma maior especificidade no branqueamento do material, diminui a poluição ambiental, uma vez que os processos químicos de branqueamento são as principais fontes de poluição da indústria de papel.

Atualmente, várias xilanases têm sido isoladas a partir de fungos filamentosos, leveduras, bactérias e actinomicetos (Wong *et al.*, 1988). Em vistas do crescente interesse comercial dessas enzimas, trabalhos que visem selecionar microrganismos produtores de xilanases bem como a caracterização e purificação destas enzimas são de grande importância em biotecnologia.

Análises econômicas mostram que a purificação é um dos mais importantes aspectos da produção e processamento de biomoléculas. Assim um dos grandes desafios da biotecnologia é desenvolver processos de purificação simples, seguros, baratos e que atinjam altos grau de purificação. Atualmente os sistemas de duas fases aquosas (SDFA) têm sido muito empregado por fornecer um meio adequado e não agressivo a materiais biológicos visto a maior parte do sistema ser constituída de água (Albertsson 1986; Asenjo *et al.* 1990). Além disso o uso de sistemas de duas fases aquosas pode proporcionar altos graus de purificação e rendimento em uma única etapa. Escalas pequenas podem ser linearmente ampliadas até 10.000 vezes sem perda significativa da eficiência (Carlson, 1988).

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais: Polietilenoglicol (PEG 1500, 4000 e 6000, Synth, Brasil), fosfato de potássio dibásico e cloreto de sódio (Ecibra, Brasil). Xilana de Bétula (Sigma, USA) foi usada como substrato. Todos os outros reagentes químicos e bioquímicos usados são de grau analítico.

Caldo de fermentação: O caldo de fermentação do *Bacillus pumillus*, obtido a pH 10 e 45°C, foi gentilmente cedido pela aluna de mestrado Cristiane Vanessa Tagliari do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp.

Preparação dos Sistemas de duas Fases Aquosas: Os SDFA foram preparados em tubos de ensaio graduados de 10 ml contendo 10g de sistema. Composições diferentes de SDFA foram utilizadas para comparação da melhor eficiência da recuperação da enzima, as diferentes composições são mostradas na Tabela 1. Cada composição foi realizada em duplicata. Os tubos foram centrifugados à 3000 x g durante 5 minutos e em seguida as fases foram separadas.

Otimização do SDFA: a otimização do SDFA foi baseada num planejamento fatorial fracionário em 2^{4-1} (de 4 fatores, PM do PEG, concentração de PEG, concentração de fosfato e concentração de NaCl), conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 1 - Valores reais dos níveis codificados dos fatores do SDFA estudados no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}

Variável	Símbolo	Valores reais dos níveis		
		-1	0	+1
PM do PEG (Da)	X ₁	1500	4000	6000
Concentração do PEG %	X ₂	16	19	22
Concentração do fosfato %	X ₃	10	11.5	13
Concentração do NaCl %	X ₄	0	6	12

Tabela 2 - Matriz do planejamento fatorial 2^{4-1} para determinar o melhor sistema de purificação para a xilanase.

Nº do Ensaio	Níveis Codificados das Variáveis				Valores Reais das Variáveis			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	PM PEG	% PEG	% fosfato	% NaCl
1	-1	-1	-1	-1	1500	16	10	0
2	-1	-1	+1	+1	1500	16	13	12
3	-1	+1	-1	+1	1500	22	10	12
4	-1	+1	+1	-1	1500	22	13	0
5	0	-1	-1	+1	4000	16	10	12
6	0	-1	+1	-1	4000	16	13	0
7	0	+1	-1	-1	4000	22	10	0
8	0	+1	+1	+1	4000	22	13	12
9	+1	-1	-1	-1	6000	16	10	0
10	+1	-1	+1	+1	6000	16	13	12
11	+1	+1	-1	+1	6000	22	10	12
12	+1	+1	+1	-1	6000	22	13	0

Determinação da atividade da xilanase: A atividade enzimática foi determinada em ambas as fases do SDFA de acordo com Bailey et al. (1992) a pH 10 e 45°C, os açúcares redutores formados foram dosados pelo método do ácido dinitrosalicílico (Miller, 1959). Xilana de bétula (Sigma) foi usada como substrato. Uma unidade de atividade de xilanase (1UI) foi definida como 1µmol de xilose produzido por minuto, nas condições acima citadas.

Determinação das Proteínas Totais: A concentração de proteínas em ambas as fases do SDFA foi determinada de acordo com o método de Sedmak (1977).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A otimização do SDFA foi feita visando obter melhor eficiência na recuperação da enzima, sem afetar suas propriedades bioquímicas. A xilanase foi particionada preferencialmente na fase superior, fase rica em PEG, do SDFA, nos 12 ensaios realizados, como mostrado na tabela 3 abaixo:

Tabela 3 – Valores de K_{enzima} e $K_{proteína}$ para os 12 ensaios realizados

No do ensaio	K_{enzima}	$K_{proteína}$
1	24,1	1,9
2	9,2	1,4
3	1,1	2,6
4	27,5	0,8
5	36,6	0,3
6	2,0	4,3
7	2,2	2,6
8	0,5	0,3
9	5,1	0,3
10	15,2	3,5
11	46,9	0,1
12	23,8	1,0

Os resultados do planejamento experimental mostram que o aumento do PM do PEG, de 1500 para 6000, promove um aumento significativo no coeficiente de partição da enzima ($K = [C_{enzima}]_{topo} / [C_{enzima}]_{fundo}$). Do mesmo modo, o aumento da concentração de NaCl de 0 para 12%, contribuiu para o aumento do K da enzima, como é mostrado na Figura 1.

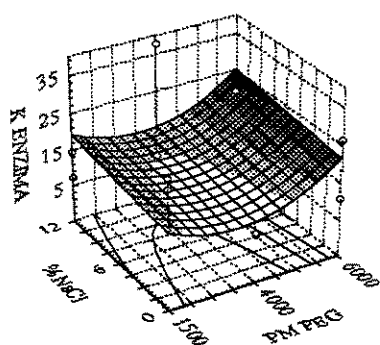


Figura 1. Influência do PM do PEG e da concentração do NaCl no coeficiente de partição da enzima

Também foi observado que, dentro dos sistemas estudados nesse planejamento experimental, a concentração de PEG não influenciou significativamente o coeficiente de partição da enzima, entretanto no nível inferior da concentração de fosfato há um aumento significativo do K da enzima, de 25 para 35 em 13% e 10% de fosfato respectivamente, conforme mostra a Figura 2.

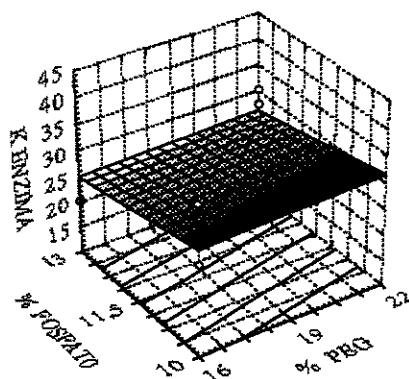


Figura 2. Influência das concentrações de fosfato e PEG no coeficiente de partição da enzima

Para que se tenha uma purificação efetiva é necessário que as proteínas contaminantes contidas no caldo de fermentação não sejam extraídas na mesma fase que a enzima, isto é, para um alto K da enzima é necessário um K das proteínas menor que a unidade, e vice-versa.

As Figuras 3 e 4 representam que a partição das proteínas na fase inferior foi favorecida pelos níveis superiores do PM do PEG e da concentração de NaCl e pelo nível inferior da concentração de fosfato, isto é, o K da proteína diminuiu de aproximadamente 2,5 para 0,5 utilizando-se PEG6000 ao invés de PEG1500, quando a concentração de NaCl aumentou de 0 para 12% e quando a concentração de fosfato diminuiu de 13 para 10%

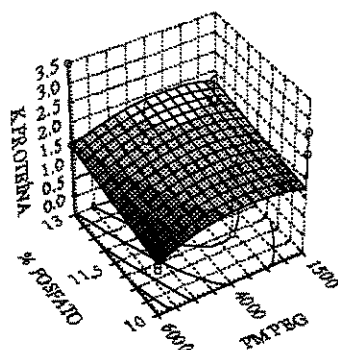


Figura 3. Influência do PM do PEG e da concentração de fosfato no coeficiente de partição das proteínas

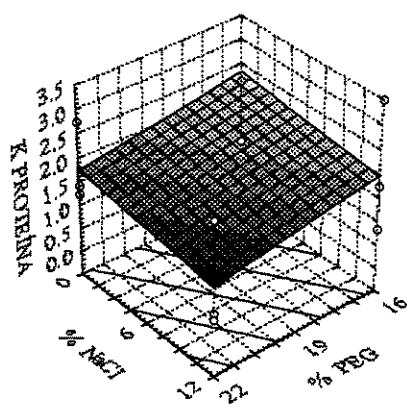


Figura 4. Influência das concentrações de PEG e NaCl no coeficiente de partição da proteína

CONCLUSÃO

Foi observado que o melhor sistema para purificação da xilanase foi o composto por 22% de PEG6000, 13% de K_2HPO_4 e 12% de NaCl, onde se obteve um fator de purificação de 33 vezes com 98% de recuperação da enzima no topo. Os valores de K da enzima e K da proteína obtidos nesse sistema foram de 47 e 0,1 respectivamente.

Deste modo, os fatores que influenciam o aumento do K da enzima, também provocam a diminuição do K da proteína, proporcionando assim altos fatores de purificação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) ALBERTSSON, P-Å. "Partition of Cell Particles and Macromolecules" Willey Interscience, New York, 3 ed. 1986.
- (2) ASENJO, J.A; FRANCO, T.T; ANDREWS, A.T., ANDREWS, B. A. "In Biological for Recombinant Microorganisms and Animal Cells- New Strategies in Production and Recovery" Eds. M. White, S. Veuveny and S. Shafferman. VCH Publisher. 1990.
- (3) BAILEY, M.J.; BIELY, P. and POUTANEN, K. "Interlaboratory Testing of Methods for Assay of Xylanase Activity" **Journal of Biotechnology**, **23**:257-270, 1992.
- (4) BIELY, P. "Microbial xylanolytic systems" **Trends in Biotechnology**, **3**: 286-290, 1985.
- (5) CARLSON, A. "Factors Influencing the Use of Aqueous Two-Phase Partition for Protein Purification" **Separation Science and Technology**, **23**:785-817, 1988.
- (6) DETROY, R. W. - "Bioconversion of agricultural biomass to organic chemicals", p. 19-43. In I. S. Goldstein (ed.), Organic chemicals from biomass. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., 1981.
- (7) MILLER, G.L. "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar" **Analytical Chemistry** **31**, 426-428, 1959

- (8) SEDMAK, J.J; GROSSBERG, S.E. "A Rapid, Sensitive and Versatile Assay for Protein Using Coomassie Brilliant Blue G250" **Analytical Biochemistry** 79, 544-552, 1977
- (9) WONG, K. K. Y.; TAN, L. U. L.; SADDLER, J. N. - Multiplicity of β - 1, 4- xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiol. Rev.**, 52, 305-317, 1988.

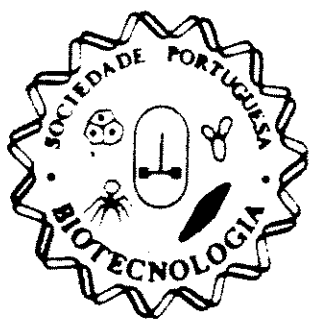
PRODUCTION AND PURIFICATION OF AN ALKALINE XYLANASE USING
AQUEOUS TWO PHASE SYSTEMS.

Trabalho apresentado no IV Iberian Congress on Biotechnology - BIOTEC'98,
12 a 15 de Julho, 1998. University of Minho - Guimarães, Portugal.



IV Iberian Congress on Biotechnology
I Ibero-American Meeting on Biotechnology

BIOTEC'98



BOOK OF ABSTRACTS



Edited by

MANUEL MOTA and EUGÉNIO C. FERREIRA

IV Iberian Congress on Biotechnology
I Ibero-American Meeting on Biotechnology

BIOTEC'98
BOOK OF ABSTRACTS

Edited by
MANUEL MOTA and EUGÉNIO C. FERREIRA
Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho
4700 Braga, PORTUGAL



Production and Purification of an Alkaline Xylanase using Aqueous Two Phase Systems

Blm, M.A.¹; Duarte, M.C.T.¹; Melo, E.C.¹; Tagliari, C.V.¹ and Franco, T.T.²

¹Biochemical Engineering Laboratory, Chemical Engineering - UNICAMP PO Box 6066, Campinas-SP 13081-970 Brazil

²Biochemical Engineering Laboratory, Chemical Engineering - UNICAMP PO Box 6066, Campinas-SP 13081-970 Brazil e-mail: franco@feq.unicamp.br

Keywords: purification, aqueous two-phase systems, bacillus, xylanase

Xylan is a major component of hemicellulose and one of the most abundant polysaccharides in nature after cellulose. Its structure is made up of β -1,4-linked β -D-xylopyranosides highly substituted. Xylanases catalyse the hydrolysis of xylan but most of the xylanases commercially available have been produced by fungi are active at neutral or acidic pH and their optimum temperature for activity is below 45°C. Various applications for xylanases in bioconversion and food industries have been suggested and one of the major potential applications of xylanases involves the pulp and paper industry. This way, extremophilic enzymes which are active at alkaline conditions have great potential in bleaching process without any need for changes in pH and with the advantage in the release of polluting organic chlorine compounds.

The aim of this work is to optimise the xylanase production, to extract and to purify the enzyme from the crude fermentation broth without cell harvesting and to achieve higher purification factors and enzyme yields.

The composition of the culture media was optimised for the maximisation of the alkaline xylanase levels and the minimisation of cellulases produced by *Bacillus pumillus*. The produced xylanase was able to hydrolyse birchwood xylan at pH 10.0 at 45°C.

The enzyme from crude fermentation broth was extracted by partitioning in aqueous two-phase systems (ATPS) composed of phosphate and polyethyleneglycol (PEG). The effect of tie-line length, PEG molecular weight and NaCl concentrations upon the purification factors and yields of xylanase were investigated by statistical design. The effect of pH and temperature on the xylanase activity were identified.

The complete methodology, the results and the discussion will be shown in a full paper.

Foreword

BIOTEC'98 was the chosen name corresponding to the IV Iberian Congress on Biotechnology. Since 1992, both the Portuguese and the Spanish Societies on Biotechnology have decided to join their efforts and organise a scientific congress on biotechnology.

Ever since the first joint congress, several structuring principles were outlined. Firstly, the congress should have a significant dimension and a scientific standard as high as possible. Secondly, the congress should seek for plenary lecturers who could bring about a sound and updated overview of frontier knowledge on biotechnology. Thirdly, the congress should be youth oriented, in the sense that young researchers should be specially favoured as far as registration prices and time for exposition of their own work are concerned. Both societies share the common opinion that young researchers must be encouraged to participate, in order to discuss their work and to be exposed to the criticism of their peers.

So far, all the above mentioned rules have been fulfilled. We think that now, these rules are being accepted as terms of reference by each organising committee. In BIOTEC'98, in a total of 250 oral communications, 180 oral communications will be presented by young scientists, corresponding to 70% of the total number of oral communications.

In the present case, both societies agreed also in opening the congress to our colleagues from Northern and Latin America. This last experience revealed to be a success. More than 100 abstracts were submitted by American scientists.

The congress aims to cover the most advanced subjects investigated in each of the 10 scientific areas included in its program.

The organising committee feels that, with the close co-operation of the scientific committee, a high scientific standard was achieved.

With the publication of the book of abstracts, and a few inevitable minor logistic problems, we feel that the work of the organising committee, which lasted almost 2 years, is coming to an end.

From now on, place should be made to the congress attendants. It will be in their hands, lecturers, researchers, students, exhibitors, the conversion of the present congress in a definitely scientific event that could be remembered in the years to come.

MANUEL MOTA

July 1998

OPTIMISATION AND EXTRACTION OF AN ALKALINE XYLANASE PRODUCED
OF BACILLUS PUMILLUS.

Trabalho apresentado no Fifth European Workshop on Lignocellulosics and Pulp, 30 de
Agosto – 2 de Setembro, 1998, Aveiro – Portugal/



Fifth European Workshop on Lignocellulosics and Pulp

Advances in Lignocellulosics Chemistry
for Ecologically Friendly
Pulping and Bleaching Technologies

August 30 - September 2, 1998

PROCEEDINGS



University of Aveiro
PORTUGAL

OPTIMIZATION AND EXTRACTION OF AN ALKALINE XYLANASE PRODUCED OF *Bacillus pumilus*

Bim¹, M. A.; Tagliari¹, C. V.; Duarte², M. C. T.; Portugal², E. P.; Ponezi², A. N. and Franco¹, T. T.
¹ Biochemical Engineering Laboratory, Chemical Engineering - UNICAMP PO.Box 6066
² Microbiology Laboratory, CPQBA - UNICAMP, PO. Box 6171.
Campinas-SP 13081-970 -Brazil

ABSTRACT

Most of the xylanases commercially available produced by fungi are active at neutral or acidic pH and their optimum temperature for activity is below 45°C. Extremophilic xylanases which are active at alkaline conditions have great potential for industrial application as a bleaching process without any need for changes in pH.

The best composition of the culture media for maximisation of the alkaline xylanase produced by *Bacillus pumilus* able to hydrolyse birchwood xylan at pH 10 at 45°C was 3% xylan and 0.6% peptone, the highest enzyme activity was around 33.0U/mL. The enzyme from crude fermentation broth was extracted in aqueous two phase systems (ATPS). An experimental design was used to study the effects of polyethyleneglicol (PEG) molecular weight (MW) and PEG, phosphate and sodium chloride concentrations on xylanase recovery and purification factor. A purification factor of 33 and a 98% enzyme recovery were achieved for the system containing 22% PEG 6,000, 10% K₂HPO₄ and 12% NaCl.

I. INTRODUCTION

Many microorganisms exhibit a complex system of enzymes involved in the degradation of hemicellulose. Xylan can be enzymatically hydrolyzed to xylose by xylanase and β -xylosidase.

The large number of potential applications of these enzymes in several fields is one of the main reasons for the investigation of fungal and bacterial xylanase production. Xylanases have also gained increasing attention as an aid to chemical pulp bleaching (Paice et al., 1984; Biely, 1985; Viikari et al., 1994). Extremophilic enzymes active at high temperatures and alkaline pH have great potential as they can be introduced at different stages of the bleaching process without needing changes in pH or temperature (Shoham et al., 1992).

Purification of target proteins requires their separation from the media or from the raw extract used for the maintenance of the biomolecules. Protein extraction in aqueous two-phase systems (ATPS) is a rapid procedure which avoids most of problems of denaturing fragile molecules in chromatographic beads. ATPS provide a gentle environment for biologically active proteins and may be employed on a large scale (Kula, 1990).

The aim of this work was to optimise the composition of the culture media for the production of xylanase by *Bacillus pumilus* S₂, and to extract the enzyme from crude fermentation broth in ATPS.

II. EXPERIMENTAL

Materials: Polyethyleneglycol (PEG 6,000, Synth, Brazil), potassium phosphate dibasic and sodium chloride (Ecibra, Brazil). Birchwood xylan (Sigma, USA) was used as the substrate. All other chemical and biochemical reagents used were of an analytical grade

Microbial strain - *B. pumilus* S₂ previously isolated from wood decomposition material was maintained on xylan agar and subcultured montly.

Enzyme production - For the enzyme production, the microorganism previously incubated for 48h was transferred to 50 mL Erlenmeyer containing 10 mL of the following culture medium which was formulated according to Mandels and Stenberg, (1976): xylan Birchwood (Sigma) and peptone, various concentrations according to the experimental design; Tween 80, 1.0; (NH₄)₂SO₄, 1.4g; KH₂PO₄, 2.0; urea, 0.3g; CaCl₂, 0.3g; MgSO₄·7H₂O, 0.3g; FeSO₄·7H₂O, 5.0 mg; MnSO₄·H₂O, 1.6 mg; ZnSO₄·7H₂O, 1.4 mg; CoCl₂, 2.0 mg; distilled water to 1000 mL; adjusted to a pH 10.0 with NaOH 2N. Fermentation was carried out for 24h at 45°C. The fermented media was centrifuged for 15 min at 12000 x g.

Determination of xylanase activity - Enzyme activities were determined according to Bailey et al. (1982) with Birchwood xylan 1% solution in 100 mM glycine-NaOH buffer, pH 10.0 at 45°C. The amount of reducing sugars were determined according to Miller (1959). One unit of xylanase activity was defined as 1 μ mol of xylose produced per minute under the given conditions.

Experimental design - To determine the ideal concentration of xylan and peptone in the fermentation media of *B. pumilus* to enzyme production, a complete factorial design with five coded levels was performed, according to Haaland (1989) and Barros Neto (1993). The levels of the variables studied were determined from preliminary tests (Table 1). An other experimental design was applied to determine the best ATPS to extract the xylanase (Table 2)

Statistical analysis: Statistica for Windows, version 5.0A, was used for the regression analysis of the experimental data obtained. The quality of the fit of the polynomial model equation was expressed by the coefficient of determination R^2 , and its statistical significance was determined by an F-test.

Table 1. Assigned concentrations of variables at different levels

Factor	Levels				
	- α	-1	0	+1	+ α
Xylan (g/100mL)	0,17	1,0	3,0	5,0	5,83
Peptone (g/100mL)	0,034	0,2	0,6	1,0	1,17

Table 2. Factors studied in ATPS using a fractionated experimental design 2^{4-1}

Factor	Real Values of Levels		
	-1	0	1
PEG MW (Da)	1500	4000	6000
PEG concentration (%)	16	19	22
Phosphate concentration (%)	10	11,5	13
NaCl concentration (%)	0	6	12

Aqueous two-phase systems preparation: Ten grams of the ATPS which compositions are shown in Table 2 were prepared in test tubes in duplicate. The aqueous systems were mixed with a Vortex for 1 min. Phase separation was achieved by centrifugation for 5 min. at $3,000 \times g$.

Partitioning of total proteins: 500 μ L of the top phase was transferred from each prepared system to a cuvette containing 1000 μ L of water and 1.5 mL of Coomassie blue solution, according to Sedmak and Grossberg (1977). It was mixed well and the A_{595} was read with a spectrophotometer, against a blank which had 500 μ L of a top phase of a system which had been equally prepared without any sample. The procedure was repeated for the bottom phase of each system and a BSA standard curve was used to calculate protein concentration. The partition coefficient, K_{protein} , was calculated as the ratio of protein in the top phase to that in the bottom phase at room temperature.

Xylanase partitioning: A known volume of each phase of the ATPS was transferred for the measurement of the enzyme activity. The ratio of the activity in the top phase to the enzyme activity in the bottom phase was calculated (K_{enzyme}).

III. RESULTS AND DISCUSSION

In preliminary experiments, xylan, peptone, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and KH_2PO_4 were tested for their suitability to sustain good production of xylanase activity by *B. pumilus*. The results indicated that xylan and peptone are the most important factors on the formation of xylanase activity and were chosen for this study. The design of the experiments and the experimental results is given in Table 3.

Table 3. Experimental design and results of the xylanase activity obtained for *B. pumilus*

Assay	Xylan (g/100mL)	Peptone (g/100mL)	Activity (U/mL)
1	1,0	0,2	10,1
2	1,0	1,0	12,4
3	5,0	0,2	11,0
4	5,0	1,0	13,7
5	0,17	0,6	2,8
6	5,83	0,6	18,3
7	3,0	0,034	4,8
8	3,0	1,17	22,3
9 (c)	3,0	0,6	38,9
10 (c)	3,0	0,6	31,3
11 (c)	3,0	0,6	29,6

(c) = central point

The experimental results were fitted with a second-order polynomial function and submitted to the analysis of surface response. The model equation obtained and the surface response graphic for *B. pumilus* is presented in Figure 1. The statistical significance of the second-order model equation was checked by an F-test.

The analysis of variance applied showed that this model is significant at a confidence level of 95%, indicating that the enzyme activity responded to concentration changes of xylan and peptone. The fit of this model was also expressed by the coefficient of determination R^2 , which was 89%.

The maximum activity was 33.0U/mL obtained at the central point (3% xylan and 0.6% peptone). The optimum xylan concentration was three times higher than original media, which had 1% xylan, the enzyme activity also increased in the same proportion (Table 3). *B. pumilus* exhibit good enzyme activity on the pH and temperature studied. According to Silva et al. (1994) *Humicola* sp produced 23U/mL of xylanase at pH 5.0 and 50°C.

The optimisation of ATPS aims high efficiency for enzyme recovery without affecting biochemical properties. Therefore the xylanase was mostly partitioned in the top PEG-rich phase in the 12 investigated systems (Table 4).

Table 4: Compositions of the investigated ATPS and partition coefficients of xylanase (K_{enzyme}) and of contaminant proteins (K_{protein})

Assay	ATPS composition				K_{enzyme}	K_{protein}
	PEG MW	% PEG	% phosphate	% NaCl		
1	1500	16	10	0	24.1	1.9
2	1500	16	13	12	9.2	1.4
3	1500	22	10	12	1.1	2.6
4	1500	22	13	0	27.5	0.8
5	4000	16	10	12	36.6	0.3
6	4000	16	13	0	2.0	4.3
7	4000	22	10	0	2.2	2.6
8	4000	22	13	12	0.5	0.3
9	6000	16	10	0	5.1	0.3
10	6000	16	13	12	15.2	3.5
11	6000	22	10	12	46.9	0.1
12	6000	22	13	0	23.8	1.0

The experimental design showed that the increase of molecular weight of PEG (from 1500 to 6000) raised the partition coefficient of the enzyme. In the same way, the increase of the concentration of NaCl from 0 to 12% contributed for the increase of K_{enzyme} (Figure 2).

Another important point to be observed in order to have an effective purification factor is that the contaminant proteins should be extracted in the opposite phase to the target enzyme. Therefore, for a high value of K_{enzyme} it is necessary a small value of K_{protein} , and vice-versa.

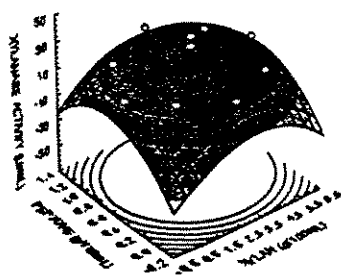


Figure 1 - Effect of xylan and peptone concentration on alkaline xylanase production

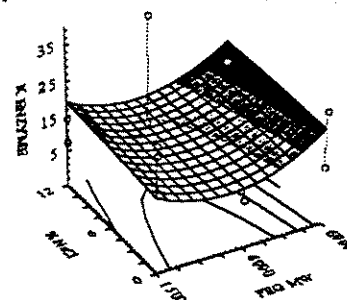


Figure 2- Effect of PEG MW and NaCl concentration on partitioning xylanase

Figures 3 and 4 show that the contaminant proteins partition into the bottom salt-rich phase with the highest PEG molecular weight, with the highest NaCl concentration and with the lowest phosphate concentration. The K_{protein} decreased from 2.5 to 0.5 replacing PEG 1,500 by PEG 6,000, 0% NaCl by 12% NaCl and 13% phosphate by 10% phosphate.

The best ATPS to purify xylanase was composed by 22% PEG 6,000, 12% NaCl and 10% phosphate with 98% enzyme recovery and a purification factor of 33. Gaikawai et al. (1996) also used ATPS to purify xylanase, although they reached only a purification factor of about 2.6 with 98% enzyme recovery.

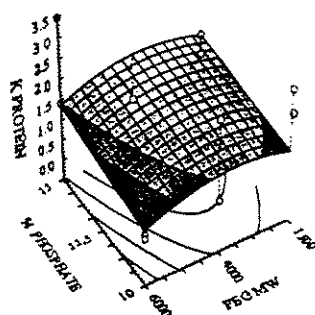


Figure 3- Effect of PEG MW and phosphate concentration on partitioning of contaminant proteins.

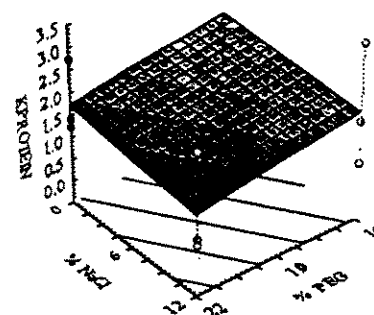


Figure 4- Effect of PEG and NaCl concentrations on partitioning of contaminant proteins

IV. CONCLUSION

B. pumilus exhibited good potential to produce alkaline xylanase (pH 10) at 45°C, which are appropriate conditions for bleaching process.

The ATPS composition of 22% PEG 6,000, 13% K_2HPO_4 and 12% NaCl has proved to be an excellent system for the concentration and purification of the xylanase in a single-step operation. A purification factor of 33 and 98% of enzyme yield were achieved in the bottom phase of this system.

V. ACKNOWLEDGMENT

This research was supported by FAPESP

VI. REFERENCES

- BAILEY, M.J.; BIELY, P. and POUTANEN, K. Interlaboratory Testing of Methods for Assay of Xylanase Activity *Journal of Biotechnology*, 23:257-270, 1992.
- BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. *Trends in Biotechnology*, 3: 286-290, 1985.
- GAIKAIWARI, R.; SHENDYE, A.; KULKARNI, N.; RAO, M. Two-phase separation of xylanases from alkalophilic thermophilic *Bacillus* using a poly(ethylene glycol)- K_2HPO_4 system *Biotech. and Applied Biochem.*, 23: 237-241, 1996.
- KULA, M.R. Trends and future of aqueous two-phase extraction. *Bioseparation*, 1, 181-189, 1990.
- MANDELS, N. and STENBERG, D. Recent Advances in Cellulase Technology. *J. Ferment. Technol.* 54: 267-286, 1976.
- MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar *Analytical Chemistry* 31, 426-428, 1959.
- SEDMAN, J.J.; GROSSBERG, S.E. A Rapid, Sensitive and Versatile Assay for Protein Using Coomassie Brilliant Blue G250 *Analytical Biochemistry* 79: 544-552, 1977.
- SILVA, R.; YIM, D.K.; PARK, Y.K. Application of Thermostable Xylanases from *Hemicola sp.* For Pulp Improvement. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 77(1): 109-11, 1994.

- SHOHAM, Y.; SCHWARTZ, Z.; KHASIN, A.; GAT, O.; ZOSIM, Z.; ROSENBERG, E. Delignification of wood pulp by a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* strain T-6. *Biodegradation* 3: 207-218, 1992.
- PAICE, M. G.; JURASEK, L. Removing hemicellulose from pulps by specific enzymic hydrolysis. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 4 (2): 187-198, 1984.
- VIHKARI, L.; KANTELINEN, A.; SUNDQUIST, J.; LINKO, M. Xylanases in bleaching: From an idea to the industry. *FEMS Microbiol. Rev.*, 13: 335-350, 1994.

**PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE XILANASES ALCALINAS DE *Bacillus Pumilus*
PARA APLICAÇÃO NO BRANQUEAMENTO DE POLPAS DE PAPEL**

Trabalho apresentado no ENZITEC99
realizado 5 a 8 de outubro de 1999, Rio de Janeiro-RJ.

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE XILANASES ALCALINAS DE *Bacillus Pumilus* PARA APLICAÇÃO NO BRANQUEAMENTO DE POLPAS DE PAPEL

Cristiane V. Tagliari¹, Mônica A. Bim¹, Marta C. T. Duarte² e Telma T. Franco^{1*}

¹Laboratório de Engenharia Bioquímica, Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP, caixa postal 6066, 13081970, Campinas, SP. e-mail: franco@feq.unicamp.br *

²Laboratório de Microbiologia, CPQBA – UNICAMP, caixa postal 6171, 13081970, Campinas, SP.

Palavras chave: *Bacillus*, xilanases, purificação, fermentação, branqueamento.

Para reduzir os problemas ambientais, a indústria de papel e celulose vem buscando alternativas para seus processos de branqueamento através da tecnologia enzimática. Desta forma, xilanases tem sido empregadas durante o processo de pré-branqueamento de polpas Kraft, com intuito de diminuir a carga de cloro utilizada nas etapas subsequentes e, consequentemente, reduzir a quantidade de organoclorados no efluente.

O uso de enzimas para aumentar a deslignificação de polpas de papel foi inicialmente sugerido por Viikari *et al.* (1986), e revisado por vários autores, dentre eles Daneault *et al.* (1994), Duran *et al.* (1995) e Duarte *et al.* (1999).

Xilanases ativas em condições alcalinas e temperatura acima de 45°C possuem elevado potencial de aplicação em branqueamento de polpas de papel, já que podem ser introduzidas livremente nos diferentes estágios do processo sem a necessidade de drásticas etapas de resfriamento ou ajustes de pH. Bactérias são aptas a produzir enzimas xilanolíticas termoestáveis e tolerantes a álcali, o que torna atrativo o estudo da produção de xilanases por *Bacillus pumilus*.

Para viabilizar a aplicação de xilanases em larga escala é necessário que esta seja obtida com alta produtividade e baixo custo. Os principais objetivos deste trabalho foram otimizar as condições de produção de xilanases alcalinas por *B. pumilus* em fermentação submersa, extrair e purificar a enzima do caldo de fermentação utilizando sistema de duas fases aquosas (SDFA) e aplicar as xilanases no branqueamento da polpa kraft de eucalipto.

O meio de cultivo foi investigado por planejamento estatístico, objetivando maximizar a produção de xilanases em frascos agitados. Após determinar as melhores condições de cultivo, um biorreator com volume útil de 2L foi utilizado para produzir a quantidade necessária de enzima para aplicação nos testes de branqueamento.

A purificação do caldo de fermentação foi desenvolvida por partição em SDFA e foram estudados os efeitos da concentração e da MM do PEG e das concentrações dos sais (K₂HPO₄ e NaCl).

A maior produção da enzima em frascos agitados foi 129 U/mL em 20 horas de fermentação, no ensaio composto por 3% de xilana, 0,6% de peptona, 0,15% de sulfato de amônio, pH 9,5 e 40°C (Figura 1).

Para a produção de xilanases no biorreator com a mesma composição, a atividade máxima foi de 173,30

U/mL (a pH 9 e 55 °C) em 10 horas de fermentação, alcançando uma produtividade maior do que a obtida em frascos agitados, 17,33 U.mL⁻¹.h⁻¹.

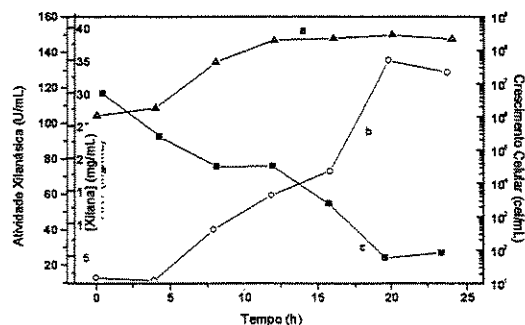


Figura 1: Produção de xilanases: a) crescimento celular; b) atividade xilanásica; c) consumo de xilana o composto por 22% de PEG 6000, 10% de K₂HPO₄ e 12% de NaCl com um fator de purificação de 40 vezes e 97% de rendimento (Tabela 1).

Tabela 1: Coeficientes de partição (K), fatores de purificação (FP) e rendimento (R) obtidos no SDFA

Atividade (U/mL)	K		Purificação (FP)		Rendimento (%)	
	enzima	proteína	topo	fundo	topo	fundo
topo fundo						
171 5,7	30,1	0,04	40,1	0,1	97	3

Quanto a aplicação da enzima no branqueamento de polpas Kraft, foi verificado uma redução de 2,5 unidades no número Kappa, sem afetar a viscosidade da polpa quando esta foi tratada com xilanases na dosagem de 50U/g polpa seca, o que representa uma eficiência de deslignificação de 26%. Este resultado foi superior aos encontrados na literatura, evidenciando assim, o potencial desta enzima para aplicação em branqueamento de polpas de papel.

Agradecimentos: FAPESP, CAPES e Champion Papel e Celulose LTDA.

- VIKARI, L., *et al.* In: Third Int. Conf. Biotechnol. Pulp Paper Industry. **Proceedings**, Stockholm, p. 67-69, 1986.
- DANEULT, C., *et al.* The use of xylanases in kraft pulp bleaching: a review. **Tappi Journal**, v.77, n.6, 1994.
- DUARTE, M. C. T., PORTUGAL, E. P., PONEZI, A. N., BIM, M. A.; TAGLIARI, C. V., FRANCO, T. T. Production and Purification of Alkaline Xylanases. **Bioresource Technology**, v.68, p.49-53, 1999.
- DURAN, N., *et al.* Enzimas de importância na indústria de polpa de celulose e papel. **O Papel**, dezembro, 68-85, 1995.