UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DE ENZIMAS

Candidato: ADALBERTO PESSOA JUNIOR

Texto sistematizado, apresentado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP para fins de concurso de Livre Docência, junto ao Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

SÃO PAULO, março de 2001

*O analfabeto do século XXI não
será aquele que não conseguir ler
ou escrever, mas aquele que não
puder aprender, desaprender e, por
fim, aprender de novo.*

Alvin Toffler

AGRADECIMENTOS

Aproveitando a oportunidade quero expressar meus sinceros agradecimentos:

- A todos os amigos do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da FCF/USP;
- Aos meus orientadores, co-orientadores, professores, colegas e orientados que contribuíram para o desenvolvimento de minha carreira acadêmica;
- Aos Professores Michele Vitolo e Beatriz Vahan Kilikian pelas importantes contribuições dadas à minha trajetória acadêmica;
- Aos amigos e pesquisadores do M.I.T., em especial ao Prof. Daniel Blankschtein e ao PhD Daniel T. Kamei, pelas estimulantes discussões de trabalho;
- Ao Professor Laurindo Bonilha Regueira pelas valiosas correções sugeridas no texto deste trabalho;
- Ao Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da FCF/USP, pela concessão do afastamento para a realização da parte experimental deste trabalho no M.I.T. (*Massachusetts Institute of Technology*, Cambridge, MA, Estados Unidos.) e pelo apoio, nos últimos anos, à minha carreira de docente;
- À FAPESP, pela concessão de 09 bolsas de mestrado (Eliana, Sílvia, Ely, Francislene, Daniel, Marcela, Cidinha, Luis e Fernanda), 02 de doutorado (Ely e Francislene) e 01 de iniciação científica (George); pela aprovação de 03 projetos de Auxílio Individual sob minha coordenação e de 02 projetos de Infra-Estrutura, no qual fui colaborador;
- À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa de estudos concedida para executar o estágio que proporcionou a obtenção de resultados inéditos apresentados neste trabalho e pelo fundamental apoio que vem oferecendo ao nosso grupo de trabalho;
- Ao CNPq pela ajuda que vem me dando desde a defesa da minha tese de doutorado, na forma de Bolsa Produtividade em Pesquisa;

E um agradecimento especial à minha esposa Laura e ao meu filho Pedro.

SUMÁRIO

Item	Página
Nomenclatura.....	4
Lista de Figuras.....	7
Lista de Tabelas.....	11
Apresentação.....	12
1 Introdução.....	14
2 Revisão Bibliográfica.....	16
2.1 Extração Líquido-Líquido em Sistemas Poliméricos de Duas Fases Aquosas.....	16
2.2 Extração Líquido-Líquido em Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas.....	29
2.3 Extração Líquido-Líquido em Sistemas Micelares Reversos.....	48
2.4 Enzimas.....	65
3 Retrospectiva dos Trabalhos Realizados.....	76
3.1 Sílvia Aparecida da Costa	77
3.2 Daniel Pereira da Silva.....	83
3.3 Marcela Zanella Ribeiro.....	88
3.4 Maria Aparecida de Souza.....	97
3.5 Eliana Maria Gonçalves Rodrigues.....	104
3.6 Francislene Andréia Hasmann.....	110
3.7 Ely Vieira Cortez.....	117
3.8 Luis Fernando Peffi Ferreira.....	121
4 Materiais e Métodos.....	124
4.1 Extração Líquido-Líquido em Sistemas Poliméricos de Duas Fases Aquosas.....	124
4.2 Extração Líquido-Líquido em Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas.....	125
4.2.1 Construção da Curva Binodal.....	126
4.2.2 Avaliação da Estabilidade da Enzima G6PDH na Presença dos Agentes Tensoativos C ₁₀ E ₄ e DTAB.....	126
4.2.3 Determinação do Valor de R.....	126
4.3 Extração Líquido-Líquido em Sistemas Micelares Reversos.....	127
4.4 Métodos Analíticos.....	127
4.4.1 Teor de Proteínas Totais.....	127
4.4.2 Atividades Enzimáticas.....	128
4.5 Metodologia de Análise dos Resultados.....	131
5 Resultados e Discussões.....	134
5.1 Avaliação da Estabilidade da Enzima Frente aos Agentes Tensoativos C ₁₀ E ₄ e DTAB.....	134
5.2 Determinação do Valor de R.....	138
5.3 Extração da Glicose-6-Fosfato Desidrogenase por SMDFA.....	141
6 Conclusões e Considerações.....	157
7 Referências Bibliográficas.....	160
Anexos.....	181

NOMENCLATURA

Abreviaturas

AOT bis(2-etilhexil) sulfosuccinato de sódio
ART açúcares redutores totais
ATP adenosina-5-trifosfato
BDBAC cloreto de benzil dodecil bis(hidroxietil) amônio
BSA “bovine serum albumine”; albumina de soro bovino
C₁₀E₄ óxido de n-decil-tetraetileno
CMC concentração micelar crítica: concentração mínima de tensoativo necessária para a formação de micelas
CPB brometo de cetil piridínio
CTAB brometo de cetiltrimetil amônio
DDAB brometo de didodecil dimetil amônio
DSP “downstream processing”; recuperação de produtos biotecnológicos
FAD adenina dinucleotídeo flavina
G6PDH glicose-6-Fosfato Desidrogenase
GOD glicose-oxidase
HK hexoquinase
NaDEHP bis(2-etilhexil) fosfato de sódio –
NADP⁺ nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato
NADPH nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
PEG polietileno glicol
SPDFA ou SDFA sistemas Poliméricos de Duas Fases Aquosas
SMDFA sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas
SMR sistemas Micelares Reversos
TOMAC cloreto de trioctilmetil amônio
XD xilitol Desidrogenase
XR xilose Redutase

Símbolos

%R porcentagem de enzima recuperada

A_b atividade enzimática na fase inferior multiplicada pelo volume dessa fase [U],

A_{e2} atividade específica da enzima após o processo de extração e/ou reextração, expressa em U/mg_{prot,i}

A_{ei} atividade específica da enzima antes da extração, expressa em U/mg_{prot,i}

$\bar{A}_i$ atividade enzimática antes da extração multiplicada pelo volume da amostra colocada para extração [U].

AP = aumento de pureza (adimensional)

A_t atividade enzimática na fase superior multiplicada pelo volume dessa fase [U] para o SDFA e SMDFA,

C_b concentração (ou atividade) de enzima na fase inferior (mg/L ou U/mL)

C_t concentração (ou atividade) de enzima na fase superior (mg/L ou U/mL)

D diâmetro da molécula de proteína (Å)

D_m comprimento médio de uma micela cilíndrica (Å)

D_{pol} diâmetro do novelo polimérico (Å)

E_a - Energia de Ativação (kcal/mol)

FAI fase aquosa I

FAII fase aquosa II

FMI fase micelar I

FMII fase micelar II

K coeficiente de partição (adimensional)

K_M constante de Michaelis e Menten (g/L)

K_p coeficiente de partição de proteínas em geral (adimensional)

$K_{E,G6PDH}$ coeficiente de partição da enzima G6PDH (adimensional)

K_{pc} coeficiente de partição das proteínas, considerando micelas cilíndricas (adimensional)

K_{pe} coeficiente de partição das proteínas, considerando micelas esféricas (adimensional)

N_{ag} número de moléculas de tensoativo agregadas na micela (adimensional)

pI ponto isoelétrico (adimensional)

R proporção entre volumes das fases do SMDFA (adimensional)

R_E recuperação da enzima após processo de extração e reextração (%)

R_m raio micelar (Å)

R_o raio de corte transversal das micelas cilíndricas (Å)

ROH solvente qualquer

R_p raio hidrodinâmico da proteína (Å)

R_{sup} recuperação da enzima na fase superior (%)

T temperatura de extração (°C)

T_c temperatura crítica (°C)

t_E tempo de extração no SMDFA (h ou min)

- V'_B corresponde ao comprimento do segmento-de-reta da linha de amarração compreendido entre ϕ_T e o valor da concentração total do tensoativo no sistema antes da separação das fases (cm)
- V'_T comprimento do segmento-de-reta da linha de amarração compreendido entre ϕ_B e o valor da concentração total do tensoativo no sistema antes da separação das fases (cm)
- V_b volume da fase inferior do sistema bifásico (mL)
- V_m velocidade máxima de reação enzimática (U/mL)
- V_t volume da fase superior do sistema bifásico (mL)
- W_m diâmetro da micela (Å)
- W_o "water in oil"; relação entre a concentração de água presente no interior da micela e a concentração de tensoativo (adimensional)
- X_c concentração crítica de agente tensoativo (% p/p)

Letras Gregas

- ΔG energia livre de Gibbs (kJ/mol)
- ΔH entalpia (kJ/K.mol)
- ΔS entropia (kJ/K.mol)
- η_a balanço de massa (%)
- ϕ_B fração do tensoativo, sem considerar a superfície de hidratação, na fase inferior ("bottom") (% p/p)
- ϕ_T fração do tensoativo, sem considerar a superfície de hidratação, na fase superior ("top") (% p/p)
- ξ_m diâmetro do poro da rede micelar (Å)
- ξ_{pol} diâmetro do poro da rede polimérica (Å)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1 - Produção Nacional de Enzimas *versus* Importações (Adaptado de ENZITEC, 1999)
- Figura 2.1 – Diagrama de Fases para um sistema genérico (PEG/sal ou PEG/Dextrana) ontem tem-se a Curva Binodal (—) e a linha de Amarração (---). Acima da curva binodal o sistema é bifásico e abaixo dela o sistema é monofásico. Três sistemas (tubos em azul) pertencentes à mesma linha de amarração são mostrados. As composições das fases superiores e das fases inferiores são encontradas nas curvas binodais.
- Figura 2.2 - Representação esquemática da formação de micelas. As moléculas de agentes tensoativos são constituídas por uma cabeça hidrofílica e uma cauda hidrofóbica. Nota-se que, como indicado pelas setas, as micelas e as moléculas de tensoativos que a constituem fazem parte de um equilíbrio termodinâmico reversível (SHAH, 1998).
- Figura 2.3 – Representação esquemática de diferentes formas de micelas em solução aquosa diluída. As estruturas formadas incluem: (a) pequenas micelas esféricas; (b) micelas globulares ; (c) micelas esfero-cilíndricas - com possibilidade de diferentes diâmetros do cilindro e da esfera (ESUMI AND UENO, 1997)
- Figura 2.4 – (a) comparação esquemática do comprimento (em escala aproximada) associado com proteínas e polímeros (tanto na forma individual como na forma enovelada): D é o diâmetro da molécula de proteína; D_{pol} é o diâmetro do novelo polimérico e ξ_{pol} é o diâmetro do poro da rede polimérica; (b) comparação esquemática do comprimento (em escala aproximada) das micelas (tanto na forma individual como na forma enovelada): D é o diâmetro da molécula de proteína, $W_m=2R_o$ é o diâmetro da micela, D_m é comprimento médio de uma micela cilíndrica e ξ_m é o diâmetro do poro da rede micelar (NIKAS et al., 1992). Como exemplo tem-se que o raio hidrodinâmico de proteínas globulares elipsoidais variam de 15 a 50 Å, mais especificamente tem-se que o raio hidrodinâmico da glicose-6-fosfato desidrogenase é de 68 Å.
- Figura 2.5 - Esquema de separação de fases de uma solução micelar mista. Em cada uma das fases encontram-se micelas em diferentes concentrações. Nota-se, também, que as micelas presentes na fase superior estão em maior número que as da fase inferior.
- Figura 2.6 – Curva Binodal Experimental de uma solução aquosa do agente tensoativo $C_{10}E_4$ baseada no artigo de LIU et al., (1996). ϕ_B corresponde à fração volumétrica do agente tensoativo na fase inferior; ϕ_T corresponde à fração volumétrica do agente tensoativo na fase superior; V'_T corresponde ao comprimento do segmento-de-reta da linha de amarração compreendido entre ϕ_B e o valor da concentração total do tensoativo no sistema antes da separação das fases (neste caso o valor é de 4,12%) e cujo valor é proporcional ao volume da fase superior; V'_B corresponde ao comprimento do

segmento-de-reta da linha de amarração compreendido entre ϕ_T e o valor da concentração total do tensoativo no sistema antes da separação das fases (neste caso o valor é de 4,12%) e cujo valor é proporcional ao volume da fase inferior.

Figura 2.7 – Variação do tamanho e da forma de micelas em função de variáveis como temperatura, concentração de tensoativo e sais. Por exemplo, uma micela esférica pode crescer e se alongar após aumento de temperatura, aumento da concentração de tensoativo e adição de sais à solução.

Figura 2.8 – Possíveis localizações de biomoléculas em relação às micelas. As micelas podem proporcionar um ambiente com dupla função às biomoléculas. As biomoléculas hidrofílicas tendem a permanecer na parte externa das micelas enquanto que as de caráter hidrofóbico tendem a ser incorporadas ao núcleo micelar.

Figura 2.9 - Mistura de agentes tensoativos com ligantes específicos. Pode-se concentrar uma biomolécula na fase rica em micelas e aumentar a eficiência de separação.

Figura 2.10 – (A) Representação esquemática de uma micela esférica constituída pelo agente tensoativo não-iônico $C_{10}E_4$ ( ) e pelo tensoativo catiônico DTAB ( ); (B) Esquema de um modelo de hidratação de uma micela mista de DTAB e $C_{10}E_4$.

Figura 2.11 – Adsorção de agentes tensoativos em superfícies hidrofílicas na forma de mono (A) ou bicamadas (B), quando presentes em concentrações inferiores à CMC (SHAH, 1998).

Figura 2.12 – Adsorção de agentes tensoativos em superfícies hidrofílicas na forma de micelas esféricas ou cilíndricas (concentrações superiores à CMC) (SHAH, 1998).

Figura 2.13 - Separação das micelas e das biomoléculas hidrofílicas por processo de filtração.

Figura 2.14 - Esquema de Micela, Micela Reversa Vazia e Micela Reversa Contendo Proteína em seu Interior.

Figura 2.15 - Composição de uma Micela Reversa (Adaptado de SEOUD *et al.*, 1999).

Figura 2.16 - Estruturas que Formam o Sistema Genérico Tensoativo/Solvente/ H_2O (Adaptado de SEOUD *et al.*, 1999).

Figura 2.17 - Diagramas de Fases dos Agentes Tensoativos CTAB (I) e AOT (II).

Figura 2.18 - Representação Esquemática do Processo de Extração em Sistemas Micelares Reversos.

Figura 2.19 - Mecanismo de Formação de Micelas Reversas (Adaptado de DUNGAN *et al.*, 1991).

Figura 2.20 - Modelos de Proteínas Englobadas por Micelas Reversas (Adaptado de LUISI *et al.*, 1988).

- Figura 2.21 - Evolução da Formação de Estruturas no Sistema de Micelas Reversas (Adaptado de SEOUD *et al.*, 1999).
- Figura 2.22 - Via metabólica da redução de xilose a xilitol e da oxidação de xilitol a xilulose (ROSA, 1996)
- Figura 2.23. Reação envolvendo a enzima hexoquinase.
- Figura 2.24. Ilustração, em escala, da molécula de água, glicerol, glicose, e uma hexoquinase idealizada. Note os dois domínios na estrutura da hexoquinase (Figura-a), entre o qual o sítio ativo está localizado. A ligação da glicose induz uma mudança conformacional na hexoquinase. Os dois domínios estreitam ao mesmo tempo, criando um sítio catalítico (Figura-b). A área sombreada em (b) representa a presença do solvente que torna a região da fissura do sítio ativo inacessível quando a enzima se encontra no complexo enzima substrato. (GARRETT, GRISHAM, 1995).
- Figura 2.25 – Representação tridimensional da G6PDH
- Figura 2.26 – a) reação catalisada pela glicose-oxidase (GOD), b) regeneração do FAD.
- Figura 5.1 – Atividade da G6PDH em função do tempo frente a diferentes temperaturas de estocagem (RIBEIRO, 2000).
- Figura 5.2 – (A) Atividade da enzima G6PDH em função da sua concentração na presença de tampão citrato/fosfato pH 7,2 e do agente tensoativo não-iônico C₁₀E₄ e catiônico DTAB; (B) Atividade da enzima G6PDH em função da sua concentração na presença de tampão citrato/fosfato pH 7,2 e do agente tensoativo não-iônico C₁₀E₄ e catiônico DTAB, considerando-se os erros experimentais.
- Figura 5.3 – Atividade após 19 horas de estocagem da G6PDH nas temperaturas de 4 °C (—◆—) e 21°C (—■—) em função da concentração do agente tensoativo DTAB (0,1 a 12 mM).
- Figura 5.4 – Proporção ($R = V_T / V_I$) entre o volume da fase superior (V_T) e o volume da fase inferior (V_I) em função da temperatura do SMDFA contendo C₁₀E₄ (4,1272%) e DTAB (0,3199%), em tampão pH 7,2.
- Figura 5.5 – Proporção ($R = V_T / V_I$) entre o volume da fase superior (V_T) e o volume da fase inferior (V_I) em função da temperatura do SMDFA contendo somente C₁₀E₄ (4,1272%), em tampão pH 7,2.
- Figura 5.6 – Proporção ($R = V_T / V_I$) entre o volume da fase superior (V_T) e o volume da fase inferior (V_I) em função da temperatura do SMDFA contendo C₁₀E₄ (4,1272%) e DTAB (0,1600% —◆—; 0,1400% —●—; 0,1200% —■—), em tampão pH 7,2.
- Figura 5.7 – Curva Binodal Experimental de uma solução aquosa do agente tensoativo C₁₀E₄, copiada do artigo de LIU *et al.* (1996) (●), curva construída a partir dos dados de KAMEI (1998) (○) e curva binodal experimental (◆) desse mesmo tensoativo, construída neste trabalho. As condições de extração (■) que foram escolhidas para serem realizadas neste trabalho visavam testar o modelo matemático proposto por NIKAS *et al.* (1992) e que estão numericamente mostrados na Tabela 5.2. A diferença entre os tensoativos está no número do lote do reagente.
- Figura 5.8 - Valores de $K_{E,G6PDH}$ obtidos experimentalmente (—■—) e valores obtidos teoricamente (—◆—) de acordo com o modelo de exclusão

pelo volume, em função da temperatura, após extração por sistemas micelares mistos em duas fases aquosas utilizando o agente tensoativo não-iônico $C_{10}E_4$ (dados experimentais retirados da Tabela 5.3).

Figura 5.9 - Coeficientes de partição da G6PDH ($K_{E,G6PDH}$), Recuperação da Enzima na Fase Superior (%) e Balanço de Massa da Enzima (η_a) obtidos após extrações por SMDFA conduzidas com os agentes tensoativos $C_{10}E_4$ (4,1272%) em diferentes concentrações de DTAB (0,12000, 0,14000, 0,16000 e 0,3199%) e mantendo-se $R \cong 1$.

Figura 5.10 Recuperação da Enzima na Fase Superior (%), Balanço de Massa da Enzima (η_a) e Coeficientes de partição da G6PDH em função de diferentes valores de R (V_T/V_B), obtidos após extrações por SMDFA conduzidas com os agentes tensoativos $C_{10}E_4$ (4,1272%) e DTAB (0,14%

LISTA DE TABELAS

- Tabela 5.1 – Valores dos Coeficientes de partição da G6PDH ($K_{E,G6PDH}$), Balanço de Massa (η_a), obtidos após extrações por SMDFA, conduzidas em diferentes temperaturas, valores de R e com o agente tensoativo $C_{10}E_4$ a 4,1272%.
- Tabela 5.2 - Valores dos Coeficientes de partição da G6PDH ($K_{E,G6PDH}$), do Balanço de Massa (η_a) e da Recuperação da G6PDH na fase superior do sistema, obtidos após extrações por SMDFA conduzidas em diferentes temperaturas e concentrações do agente tensoativo não iônico $C_{10}E_4$.
- Tabela 5.3 – Valores de $K_{E,G6PDH}$, obtidos experimentalmente e valores obtidos teoricamente de acordo com o modelo de exclusão pelo volume.
- Tabela 5.4 – Coeficientes de partição da G6PDH ($K_{E,G6PDH}$), Recuperação da Enzima na Fase Superior e Balanço de Massa (η_a), obtidos após extrações por SMDFA conduzidas por diferentes períodos de tempo em diferentes temperaturas (e, conseqüentemente, diferentes valores de R) com os agentes tensoativos $C_{10}E_4$ (4,1272%) em diferentes concentrações de DTAB.
- Tabela 5.5 – Rendimentos de purificação da enzima G6PDH, obtidos em vários processos.

Apresentação

Este texto tem por objetivo sistematizar o trabalho científico do autor após o seu Doutorado, concatenando em um conjunto coerente tanto resultados originais como aqueles desenvolvidos em conjunto com seus orientados e co-orientados, evidenciando sua especialização no tópico "***Extração Líquido-Líquido de Enzimas***", tema relevante dentro da Enzimologia Industrial.

Trata-se de texto sistematizado na forma de uma retrospectiva em ordem cronológica da obtenção dos resultados. Neste texto, sumariza-se o conteúdo das dissertações de mestrado de Eliana Maria Gonçalves Rodrigues (concluída em julho de 1997), Ely Vieira Cortez (concluída em março de 1998), Silgia Aparecida da Costa (concluída em Julho de 1998), Francislene Andréa Hasmann (concluída em fevereiro de 1999), Daniel Pereira da Silva (concluída em agosto de 2000), Marcela Zanella Ribeiro (a ser concluída em fevereiro de 2001), Maria Aparecida de Souza (a ser concluída em março de 2001) e Luis Fernando Peffi (em andamento), além das teses de doutorado de Ely Vieira Cortez (em andamento). Alguns resultados inéditos, referentes à *Extração Líquido-Líquido em Sistemas Micelares em Duas Fases Aquosas* e à *Extração Líquido-Líquido em Sistemas Poliméricos de Duas Fases Aquosas*, foram obtidos pelo candidato e estão discutidos na parte final deste texto.

Sete diferentes enzimas foram utilizadas como modelo nos estudos sobre extração líquido-líquido, neste trabalho. São elas: xilanase, β -xilosidase, xilose redutase, xilitol desidrogenase, hexoquinase, glicose-6-fosfato desidrogenase e glicose oxidase. Porém, até o momento, nem todas as técnicas foram aplicadas a todas as enzimas. A extração líquido-líquido em sistemas poliméricos de duas fases aquosas (SDFA) foi aplicada para as enzimas xilanase, hexoquinase e glicose-6-fosfato desidrogenase, a extração líquido-líquido em sistemas micelares de duas fases aquosas (SMDFA) foi aplicada somente para a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase e a extração líquido-líquido em sistemas micelares reversos (SMR) foi utilizada para purificar as enzimas xilanase, β -xilosidase, xilose redutase, xilitol desidrogenase e glicose-oxidase.

A cada tipo de extração abordado, procurou-se situar os resultados obtidos dentro do contexto da linha de pesquisa, isto é, consideram-se os resultados

anteriores bem como as informações da literatura. Buscou-se, também, tornar o entendimento deste texto auto-suficiente, ou seja, evitar o estudo das dissertações anteriormente citadas. Por esse motivo, inclui-se, também, um capítulo de *Materiais e Métodos* para dar suporte aos resultados apresentados, além de uma *Revisão Bibliográfica* para situar o leitor no tema em questão.

1. Introdução

A viabilidade da comercialização e da produção em escala industrial de substâncias obtidas por meio da biotecnologia depende significativamente das técnicas empregadas na purificação do composto desejado. O produto pode estar dentro da célula, como constituinte de uma mistura muito complexa, no meio aquoso diluído, ou ainda distribuído entre os dois. A baixa concentração inicial dos produtos obtidos, sensibilidade térmica e a necessidade de preservar as principais propriedades dos compostos tornam os processos de recuperação onerosos para os custos globais de produção. Assim, a etapa de recuperação requer um método biocompatível e econômico (ATKINSON, SAINTER, 1982; BAUGHMAN, LUI, 1994; CHAUDHURI, 1995).

Para um produto biotecnológico em geral, sua recuperação, concentração e purificação necessitam de várias operações. Além disso, muitas operações padrões nos laboratórios tornam-se impraticáveis, ou dispendiosas, em processos industriais. Além disso, bioprodutos são freqüentemente compostos sensíveis, cujas estruturas ativas só podem ser preservadas sob condições limitadas de pH, temperatura e força iônica. Em função destas restrições não existem técnicas gerais, ou mesmo uma seqüência de operações que possa ser recomendada para recuperação e purificação de qualquer produto biotecnológico. Cada caso requer o estudo aprofundado para definição das operações unitárias ideais (GLATZ, 1990; SCAWEN, MELLING., 1985).

Mesmo sendo onerosas as operações necessárias para purificar diversos produtos biotecnológicos, há uma tendência crescente da demanda desses produtos na próxima década. Pesquisas recentes apontam um aumento médio anual de 12% nas vendas de produtos biotecnológicos nos Estados Unidos, partindo de US\$10,1 bilhões no ano de 1996, para uma previsão de US\$32,4 bilhões no ano de 2006. As enzimas fazem parte de um segmento de expressiva participação no contexto geral de produtos biotecnológicos, o qual deve saltar de US\$275 milhões em 1996 para US\$1,6 bilhão no ano de 2006, correspondendo a uma alta nas vendas de 19% ao ano, durante esse período (SHAMEL, KEOUGH, 1995).

A Figura 1.1 ilustra claramente a dependência do mercado interno brasileiro de enzimas importadas.

Figura 1.1 - Produção Nacional de Enzimas versus Importações (Adaptado de ENZITEC, 1999)

Para satisfazer a demanda destes produtos, várias são as técnicas de purificação empregadas, dentre as quais podem ser citadas a precipitação por sais, por polietilenoglicol, ou por solventes orgânicos, a ultrafiltração, a cromatografia, a extração em sistemas de duas fases aquosas e por micelas reversas, entre outras (PESSOA-JR, VITOLO, 1998^{a,b,c}; SILVA *et al.*, 1999; CORTEZ *et al.*, 1998; COSTA *et al.*, 1998; ASENJO, 1990).

Desenvolver técnicas de purificação eficientes, minimizando o número de operações necessárias para a recuperação desejada, é uma das preocupações atuais na área de biotecnologia, pois isto significa redução de custos bem como de perdas do produto (HUENUPI *et al.*, 1999). Além desses aspectos, deve-se considerar o desenvolvimento de técnicas de fácil ampliação de escala, já que os custos dos processos de purificação podem representar de 50 a 80% do custo total do produto (BELTER *et al.*, 1988, GUPTA, MATTIASSON 1994, HOTH, BONIK, 1997). A extração líquido-líquido é uma operação unitária que pode oferecer as vantagens necessárias para a produção de um bioproduto com essas características.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Extração Líquido-Líquido em Sistemas Poliméricos de Duas Fases Aquosas (SDFA)

Dentre as técnicas atualmente estudadas para separação e purificação de substâncias de origem biológica, especial ênfase tem sido dada à extração líquido-líquido em sistema de duas fases aquosas, por ser um método eficiente, versátil e de baixo custo (GUAN *et al.*, 1992; BERGGREN *et al.*, 1995; SINHA *et al.*, 1996). Estes sistemas são constituídos por duas fases aquosas parcialmente miscíveis que promovem a separação de produtos biotecnológicos em condições amenas e em um ambiente adequado, de forma a preservar suas principais características. Estes tipos de sistemas resultam da incompatibilidade, em soluções, de dois polímeros (por exemplo PEG e dextrana) ou entre um polímero e um sal apropriado (por exemplo: fosfato ou citrato) que ocorre em função da concentração destes compostos. A alta concentração de água (aprox. 65-90%) em tais sistemas favorece a estabilidade das proteínas durante a separação quando, comparado com sistemas de duas fases em solvente orgânico (HUSTEDT *et al.*, 1985a; SINHA *et al.*, 1996, LI *et al.*, 1997). Em um sistema PEG/Dextrana, a fase superior do sistema contém, além de água, principalmente PEG (5-15%), enquanto que a fase inferior contém dextrana (10-25%) e um pouco de PEG (0,2-2%) (HARRIS, 1992).

Diagramas de Fases

Em princípio, a maioria dos polímeros hidrofílicos, se não todos, naturais ou sintéticos miscíveis com a água, mostram separação de fase em uma mistura com um segundo polímero ou com sais. A Figura 2.1 mostra um exemplo representativo para tal comportamento em sistemas comumente empregados (KULA *et al.*, 1982; HUDDLESTON *et al.*, 1991).

Figura 2.1 – Diagrama de Fases para um sistema genérico (PEG/sal ou PEG/Dextrana) onde se tem a Curva Binodal (—) e a linha de Amarração (---). Acima da curva binodal o sistema é bifásico e abaixo dela o sistema é monofásico. Três sistemas (tubos em azul) pertencentes à mesma linha de amarração são mostrados. As composições das fases superiores e das fases inferiores são encontradas nas curvas binodais.

Na Figura 2.1 está representada uma curva binodal com uma linha de amarração para um sistema polietilenoglicol/fosfato. A curva que divide a região de duas fases da região de uma fase é chamada de curva binodal ou curva de equilíbrio. A região acima da curva binodal é chamada de bifásica e a abaixo, monofásica. Todos os sistemas que estão sobre o segmento de reta TMB (denominadas linhas de amarração: retas paralelas à tangente que passam pelo ponto crítico, neste caso o ponto C) possuem as composições químicas da fase superior (rica em PEG) e da fase inferior (rica em sal) idênticas, porém com os volumes destas fases diferentes (KULA *et al.*, 1982; BAMBERGER *et al.*, 1985; HUDDLESTON *et al.*, 1994). No ponto crítico, C, (ponto no qual a adição de uma pequena quantidade de água transforma um sistema bifásico numa solução homogênea), teoricamente, as duas fases têm composições e volumes idênticos e podem fornecer coeficientes de partição igual a 1 (KULA *et al.*, 1982, HUDDLESTON *et al.*, 1991; LAHORE *et al.*, 1996).

Segundo os dados de literatura as curvas binodais podem ser determinadas por três métodos diferentes. O primeiro método consiste em determinar a composição das fases que formam o sistema através da cromatografia (HPLC) (ALBERTSSON, 1986, PLANAS *et al.*, 1997). O segundo método citado baseia-se em um processo de titulação entre os componentes que formam os sistemas (PEG, tampão fosfato e água). A grande vantagem deste sistema de titulação é a simplicidade e rapidez, porém como o método baseia-se na observação visual de mudança das fases tem-se uma imprecisão quando as fases se alternam entre o sistema monofásico e o bifásico (BAMBERGER *et al.*, 1985, VERNAU, KULA, 1990). O terceiro método que pode ser utilizado consiste na combinação entre os dois métodos citados anteriormente. Este método baseia-se na preparação de vários sistemas de fases com composições diferentes. Em seguida, adiciona-se água em cada sistema sob agitação até as soluções tornarem-se transparentes. Finalmente determina-se a composição dos novos sistemas monofásicos e com isto obtêm-se os pontos da curva binodal (SEBASTIÃO *et al.*, 1997).

O Processo de Extração

A água e outros líquidos podem ser divididos em dois compartimentos fluidos ou duas fases (em contato direto um com o outro) através de seus usos como solventes do PEG junto com outro polímero. A incompatibilidade dos polímeros que provoca essa separação de fases tem como consequência o acúmulo dos polímeros ou sais em fases opostas. As diferenças nas estruturas e concentrações dos polímeros em cada fase pode causar uma significativa divergência nas propriedades de solvatação nos compostos de elevada massa molar quando presentes em baixas concentrações. Quando a água é utilizada como solvente, a partição de sais é equivalente entre as duas fases obtidas após a separação. Porém, quando se adiciona, por exemplo, proteínas a esse sistema, a partição dessas moléculas é desigual entre as fases. Essa característica de separação de fases entre dois polímeros, também, tem sido amplamente empregada para um sistema polímero/sal (HARRIS, 1992; SCHMIDT *et al.*, 1996).

A extração líquido-líquido de proteínas em sistema de duas fases aquosas é um método eficiente e versátil. Esses sistemas são constituídos por duas fases aquosas parcialmente miscíveis, obtidas pela adição de um polímero/polímero (PEG/dextrana, PEG/ficoll, PEG/polivinil álcool, dextrana/metil celulose, dextrana/ficoll e outros) ou um polímero e um sal (PEG/fosfato de potássio, sulfato de sódio, citratos e outros) (KULA, 1985; HUDDLESTON *et al.*, 1991; LU, TJERNELD, 1995; SCHMIDT *et al.*, 1996; SINHA *et al.*, 1996).

Quando comparada com outras técnicas de purificação de enzimas, essa técnica apresenta diversas vantagens, tais como: operação rápida e contínua, altos rendimentos, fácil ampliação de escala, baixo custo dos materiais, reciclagem dos polímeros, minimização da desnaturação de proteínas e facilidade de separar materiais particulados (LAMARCA *et al.*, 1990; CASONE *et al.* 1991; SCHMIDT *et al.*, 1996).

Poli(etilenoglicol)

O polietilenoglicol, $(\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})$, é um poliéter neutro, solúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos, e de grande importância comercial (GUAN *et al.*, 1992), produzido em grandes quantidades e com massas molares variando de poucas centenas a milhares de Dáltons. Apesar de sua aparente simplicidade, esta molécula é foco de grande interesse para a comunidade biotécnica e biomédica. Isso porque o PEG é eficiente na exclusão de outros polímeros quando em sua presença num ambiente aquoso. Essa propriedade se traduz na capacidade de rejeição (com possibilidade de precipitação) a proteínas, formação de sistemas de duas fases aquosas com outros polímeros e/ou sais e sua não imunogenicidade. Além disso o polímero não é tóxico e nem desnatura proteínas ou células ativas, embora ele interaja com membranas celulares. Ele é facilmente sujeito a modificações químicas e anexação a outras moléculas e superfícies. Dentre as principais propriedades têm-se que o PEG é solúvel em água, tolueno, cloreto de metileno e muitos outros solventes orgânicos; é insolúvel em etiléter, hexano e etilenoglicol; insolúvel em água a elevadas temperaturas; forma complexos com cátions metálicos; possui um grande volume de exclusão em água; pode ser usado para precipitar proteínas e ácidos nucleicos; forma sistemas de duas fases aquosas com outros polímeros ou sais; é atóxico; é aprovado pelo FDA (*food and drug administration*); e é fracamente imunogênico (HARRIS, 1992).

A designação PEG é usada para compostos de baixa massa molar (abaixo de 20.000 Da) e a designação PEO poli(óxido de etileno) é restrito para compostos de altas massas molares (maiores que 20.000 Da). O PEG é produzido pela polimerização do óxido de etileno com um catalisador solúvel ácido ou básico, enquanto que a produção de PEO envolve catálise heterogênea (HUSTEDT *et al.*, 1985b; ASENJO *et al.*, 1994; HARRIS, 1992).

Os PEGs com massas molares menores que 1.000 são fornecidos na forma de soluções incolores estáveis ou pastas. Os de massas molares elevadas, acima de 1.000 Da, são encontrados na forma de pó ou flocos brancos. Podem ser estocados à temperatura ambiente, embora a 4°C a

ocorrência de oxidação em soluções seja retardada. A oxidação do PEG é detectada pela diminuição do pH devido à liberação de grupos ácidos e pela alteração da coloração da solução para marrom (BAMBERGER *et al.*, 1985).

A utilização do PEG é de grande interesse na biotecnologia principalmente por excluir, em ambiente aquoso, outros polímeros de sua vizinhança, não se solubilizando com eles. Por serem compostos biodegradáveis e atóxicos, o descarte de PEG não é problemático (GUAN *et al.*, 1992; SINHA *et al.*, 1996).

Reciclagem dos Polímeros e Sais

A reciclagem das substâncias que constituem o sistema de duas fases aquosas pode reduzir os custos do processo pela redução dos gastos com produtos químicos e com o tratamento de águas de lavagem (LAMARCA *et al.*, 1990). Na verdade, a reciclagem dos polímeros significa, na prática, reciclagem do PEG da fase superior do sistema de duas fases aquosas. Em princípio, a reciclagem do PEG pode ser feita de várias maneiras: reutilização direta do PEG obtido no final do processo de extração em uma etapa inicial ou intermediária de um novo processo, utilização após ultrafiltração ou extração com solventes seguida de evaporação (BAMBERGER *et al.*, 1985).

A reutilização direta, parece ser o procedimento mais viável economicamente para um processo industrial (UMAKOSHI *et al.*, 1996). Um exemplo de reciclagem direta é o processo de purificação da enzima fumarase de *Brevibacterium ammoniagenes*, na qual a fase superior (rica em PEG) da segunda etapa de extração, sem um tratamento adicional, pode ser reciclada para a primeira etapa do processo. Segundo HUSTEDT *et al.*, (1985b) após três etapas de ciclo do PEG a atividade específica da fumarase reduziu de 10 a 15%.

A reciclagem dos sais também é possível. Um método plenamente usado é o resfriamento da fase contendo fosfato de sódio a temperaturas abaixo de 6°C. Este procedimento resulta na precipitação dos íons fosfato, e torna possível a sua reutilização. Outros métodos para a reciclagem dos sais como a

dessalinização das fases e a eletrodialise estão ainda em fases de estudo (COIMBRA, 1995).

Escolha dos Sistemas Aquosos Bifásicos

Em princípio, todos os tipos de sistemas aquosos bifásicos podem ser empregados na separação de biomoléculas. No aumento de escala, devem ser avaliados os critérios como custos, quantidade de reagentes, tempo de separação e reciclagem dos componentes envolvidos no processo (LAMARCA *et al.*, 1990; GUAN *et al.*, 1992). No entanto, é reduzido o número de sistemas polímero/polímero ou polímero/sal que podem ser utilizados em escala ampliada. Os sistemas PEG/dextrana ou PEG/sais são os mais utilizados por se encontrarem disponíveis no mercado em grandes quantidades, não serem tóxicos e apresentarem propriedades físicas adequadas, principalmente com relação às diferenças de densidade e de viscosidade (SINHA *et al.*, 1996). Além disso, a adição de PEG e dextrana em alimentos é permitida em muitos países, enquadrando-se na legislação para aplicação em produtos alimentícios e farmacêuticos. O mesmo pode ser dito para alguns tipos de sais de citratos, fosfatos e sulfatos (KULA *et al.*, 1982, GUAN *et al.*, 1992, CHUNG *et al.*, 1997).

Segundo KRONER *et al.*, (1984) os sistemas PEG/sal são mais econômicos quando comparados com os sistemas PEG/dextrana. A separação de fases é atingida mais rapidamente devido à diferença entre as viscosidades das fases. Isso facilita o uso de sistemas polímero/sal em aplicações industriais.

Fatores que Influenciam os Sistemas Aquosos Bifásicos

A partição de moléculas em sistemas de duas fases aquosas depende do tamanho e das propriedades da superfície da substância. Vários mecanismos diferentes podem atuar e influenciar na partição dessas moléculas. A composição iônica determina o potencial elétrico entre as fases e portanto a carga da substância a ser particionada terá uma grande influência no coeficiente de partição. Interações diretas entre as substâncias particionadas e

os polímeros que formam as fases do sistema podem contribuir significativamente para melhorar a eficiência da extração. Essas interações, e portanto o coeficiente de partição, podem ser influenciados pela concentração e massa molar dos polímeros e fatores como pH, temperatura, força iônica, dentre outros (HARRIS, 1992).

A proporção entre a concentração de biomoléculas na fase superior (“top”) e na fase inferior (“bottom”) define os coeficientes de partição (K) nos sistemas aquosos. As diferenças nos valores dos coeficientes de partição são o resultado das interações de fatores inerentes ao sistema. Estes fatores podem ser: massa molar dos polímeros, concentração dos polímeros e sais, composição iônica, pH e as características da proteína a ser separada, como massa molar, carga, hidrofobicidade e conformação (KULA *et al.*, 1982, SCHMIDT *et al.*, 1994; LAHORE *et al.*, 1996).

O coeficiente de partição da proteína depende das propriedades intrínsecas dessas moléculas e que podem ser divididas em grupos, como: hidrofobicidade da molécula de proteína, forças eletrostáticas, tamanho, conformação da partícula e bioespecificidade da molécula pelas fases. Nem todas essas propriedades são igualmente importantes, mas elas podem ser manipuladas para se encontrar uma melhor partição da proteína de interesse (CASCONI *et al.*, 1991; SCHMIDT *et al.*, 1994). Deve ser lembrado que os mecanismos que causam a distribuição irregular das biomoléculas ainda não são bem conhecidos. Apesar de existirem vários modelos teóricos descritos na literatura, nenhuma teoria conclusiva existe atualmente para guiar o esboço do sistema de separação de proteínas (LAHORE *et al.*, 1996; COIMBRA, 1995).

Massa Molar do PEG

A massa molar dos polímeros tem uma forte influência na partição de substâncias no SDFA (HARRIS, 1992).

A variação na massa molar dos polímeros em sistemas de duas fases aquosas se resume em dois efeitos principais: o primeiro efeito demonstra que à medida em que a massa molar dos polímeros é aumentada, menor será a concentração necessária para resultar na separação de fases. A massa molar

também influencia a partição do material biológico a ser purificado em consequência das interações desfavoráveis entre os polímeros. Ao se variar a massa molar de um polímero (ex: PEG) uma proteína particionada entre as duas fases vai se comportar como se existisse uma força de atração exercida pelo polímero sobre a proteína. Este efeito prevalece na partição de moléculas maiores e não é muito pronunciado para aminoácidos ou pequenas moléculas (ASENJO *et al.*, 1994; ANDREASEN, 1994; HUDDLESTON *et al.*, 1994; SCHMIDT *et al.*, 1996). As diferentes massas molares dos polímeros podem ser usadas para facilitar as separações de moléculas de proteínas de diferentes tamanhos. Isso pode ser melhor exemplificado através dos resultados descritos por ASENJO (1990), que comparou os coeficientes de partição da enzima β -galactosidase em sistemas contendo dextrana com massas molares de 40 e 500, sendo obtidos os valores de K de 0,24 e 1,59 , respectivamente.

Como um novo exemplo, pode-se citar o trabalho de SCHMIDT *et al.*, (1994) que utilizou um sistema PEG/fosfato para a recuperação de α -amilase. Foi observado que os maiores valores dos coeficientes de partição foram obtidos para as menores massas molares do PEG. Este efeito também ocorreu para o sistema PEG/dextrana. Esses autores também observaram que, o aumento da massa molar do PEG de 600 para 6000 não alterou significativamente a proporção de volume das fases formadas.

Segundo SCHMIDT *et al.* (1996) o PEG é capaz de precipitar as proteínas sem desnaturação de acordo com o aumento de sua massa molar. Em baixas concentrações de PEG, o efeito de precipitação é mais acentuado nas proteínas maiores. Para ilustrar esse efeito, os autores efetuaram uma comparação entre a separação da amiloglicosidade (97kDa) e o inibidor de tripsina (20kDa). Foi verificado que a molécula de amiloglicosidase possui uma baixa solubilidade na fase superior ($C_{top} = 0,2$ g/Kg) facilitando assim a sua precipitação. O mesmo efeito de precipitação não foi significativo sobre o inibidor de tripsina, que apresentou uma concentração muito maior na fase superior ($C_{top} > 11$ g/Kg) .

Nos estudos de separação da protease ácida obtida do *Mucor bacilliformis* utilizando um sistema PEG/fosfato, LAHORE *et al.* (1996) verificaram que o

coeficiente de partição da enzima foi fortemente influenciado pela variação da massa molar do PEG. Quando a massa molar do PEG foi aumentada de 600 para 20.000 foi constatado um decréscimo de 500 vezes no valor de K (de 50 para 0,10). Esses autores também verificaram que a utilização do PEG de massa molar 600 promove a partição das proteínas preferencialmente para a fase superior. O mesmo efeito não foi verificado com a utilização do PEG com massa molar de 20.000, onde as proteases ácidas e proteínas contaminantes migraram para a fase inferior.

Concentração dos Polímeros

A concentração de um polímero pertencente a um sistema de duas fases aquosas pode influenciar o coeficiente de partição de uma molécula. Segundo HARRIS (1992), para macromoléculas há uma correlação linear entre o logaritmo do coeficiente de partição ($\log K$) e a concentração do polímero.

Próximo do ponto crítico de um sistema de fases, as moléculas tais como as proteínas migram quase que igualmente entre as fases. Se a concentração dos polímeros (por exemplo: PEG, dextrana, metilcelulose, ficoll, polivinil álcool e outros) for aumentada, o valor de K poderá aumentar ou diminuir de acordo com o deslocamento do sistema. Como regra geral, o coeficiente de partição de um sistema de duas fases aquosas pode aumentar quando for feita a adição de um polímero, atingindo um valor máximo, e em seguida diminuir quando da adição de uma nova carga de polímero. Nos casos de sistemas contendo células fragmentadas, quando a concentração do polímero é aumentada os fragmentos tendem a se adsorver na interface do sistema. Desta forma, se os fragmentos estão na fase superior quando ocorre a aproximação do ponto crítico, eles poderão ser removidos desta fase para a interface ou para a fase inferior, de acordo com o aumento na concentração dos polímeros. Dependendo das propriedades da superfície dos fragmentos celulares, eles poderão ser removidos seletivamente para a fase superior (ALBERTSSON, 1986; ASENJO, 1990; LAHORE *et al.*, 1996).

Efeito do pH

A solubilidade das enzimas é afetada por diversos fatores ambientais, além de suas características intrínsecas. Sabe-se que a solubilidade dessas biomoléculas depende do pH das soluções, pois ele influencia a dissociação dos grupos ionizáveis das proteínas alterando as cargas da sua superfície e, conseqüentemente, o seu coeficiente de partição (LEHNINGER, 1995; HALL, 1996). Estudos feitos por SCHMIDT *et al.* (1994), usando α -amilase, revelaram que o aumento do pH de 5,3 ($K=0,7$) para 9,5 ($K=20,0$), aumentou o coeficiente de partição em 29 vezes. O aumento no coeficiente de partição com o aumento do pH tem sido observado para várias outras proteínas, como por exemplo: taumatina (CASCONI *et al.*, 1991), imunoglobulina-G, L-aspartase, fumarase, hemoglobina e ribonuclease (HUDDLESTON *et al.*, 1991). As proteínas carregadas mais negativamente (nos casos em que o pH é superior ao pI) migram preferencialmente para a fase superior ("top") do SDFA, que é rica em PEG. A presença de um número maior de cargas negativas, com o aumento do pH, promove as interações mais fortes entre a α -amilase e as subunidades do PEG.

Efeito dos Sais

A composição do sais que podem ser incluídos nos sistemas de duas fases aquosas são de suma importância para o sucesso da afinidade de partição de todas as espécies de moléculas e partículas celulares. Usualmente soluções tampão são adicionadas aos sistemas com a finalidade de manter o pH no valor desejado. Entretanto, quando é desejável a partição de determinados materiais presentes no sistema, outros tipos de sais podem ser utilizados visando uma boa partição, sem a necessidade de utilização de um ligante específico. Embora os sais se separem uniformemente entre as fases, existem diferenças significativas no coeficiente de partição que depende do tipo de sal utilizado. Isso significa que os íons têm diferentes afinidades pela duas fases (ASENJO, 1990; HARRIS *et al.*, 1994; UMAKOSHI *et al.*, 1996; LAHORE *et al.*, 1996). O sais de fosfato têm maior afinidade pela fase inferior do sistema

de duas fases, o lítio tem maior afinidade pela fase superior e o NaCl tem afinidade similar entre as duas fases. Portanto, os sais que possuem distribuição diferenciada entre as fases são importantes para o sistema, pois eles terão grande influência na diferença de potencial elétrico entre as fases. Por exemplo, a partição dos íons fosfato para a fase inferior cria um potencial elétrico com uma carga negativa nesta fase que força a partição das macromoléculas ou células carregadas negativamente para a fase superior. Com o aumento da concentração de NaCl, o efeito da distribuição desigual dos íons fosfato pode ser reduzido ou eliminado. Com isto, a mudança na composição iônica pode influenciar, e muito, o coeficiente de partição de uma molécula (HARRIS, 1992).

A adição de sais neutros, tais como NaCl, em um sistema PEG/dextrana diminuirá o coeficiente de partição das proteínas carregadas negativamente e aumentará o coeficiente de partição das proteínas carregadas positivamente. A magnitude do efeito aumenta na seguinte ordem: $\text{SO}_4^{-2} < \text{F}^- < \text{Cl}^- < \text{I}^-$ e $\text{NH}_4^+ < \text{Na}^+ < \text{K}^+$ (CASCONI *et al.*, 1991; HUDDLESTON *et al.*, 1991; SCHMIDT *et al.*, 1996).

Nos estudos de partição da vancomicina (um glicopeptídeo) em sistema de duas fases aquosas foi mostrado que o coeficiente de partição aumenta com a adição de sais. No sistema PEG/fosfato, o coeficiente de partição aumentou de 4 para 120 quando 8,8% de NaCl foi usado, enquanto que com a mesma concentração de NaCl em sistema PEG/dextrana, o coeficiente de partição aumentou de 1,6 para 5,0 (LEE *et al.*, 1990). Nos estudos realizados para a taumatina, o coeficiente de partição também foi aumentado através da adição de NaCl. Quando foi feita a adição de 8,8% de NaCl no sistema PEG6000/fosfato, o coeficiente de partição dessa proteína aumentou drasticamente ($K=0,5$ para $K=33,0$), gerando um acréscimo de aproximadamente 62 vezes no valor de K (CASCONI *et al.*, 1991). Segundo os estudos feitos por LAHORE *et al.* (1996) em experimentos utilizando um sistema PEG3350/fosfato, o valor de K aumentou de 1,1 para 35,0 quando foram adicionados 5,8% de NaCl. Para o sistema PEG-3350/sulfato a adição de 8,8% de NaCl promoveu um aumento no valor de K de 0,3 para 33,0.

Influência da Temperatura

As mudanças de temperatura podem afetar diretamente a formação do sistema de duas fases aquosas alterando a composição das fases e assim, a posição da curva binodal, bem como o comprimento das linhas de amarração. Geralmente para baixas temperaturas (menores que 20°C), a curva binodal desloca-se em direção às baixas concentrações dos componentes que formam as fases, resultando no aumento do comprimento das linhas de amarração. Os sistemas de fases próximos do ponto crítico podem ser mais influenciados pela mudança de temperatura devido à sua instabilidade, quando a curva binodal é deslocada, podendo, assim, os sistemas passarem facilmente para a região monofásica (BAMBERGER *et al.*, 1985; TJERNELD *et al.*, 1994).

O efeito da temperatura na separação das fases para um sistema polímero/polímero (Dextrana/PEG, Dextrana/polivinil álcool, polivinilpirolidona etc.) é diferente dos sistemas formados por polímero/sal (PEG/fosfato, PEG/sulfatos, PEG/citratos etc.). Para os sistemas formados por polímero/polímero constatou-se que com o aumento da temperatura foi necessária uma concentração maior dos polímeros para a separação das fases. Neste caso, para que a separação das fases seja favorecida, deve-se trabalhar em temperaturas inferiores à ambiente. Já para os sistemas constituídos por polímero/sal, ocorre o contrário, isto é, em temperaturas maiores ou próximas à ambiente, a separação das fases do sistema é facilitada. Foi também observado, para o sistema PEG/sal que o aumento da temperatura favorece o aumento da concentração de PEG na fase superior do sistema e, conseqüentemente, ocorre uma redução da concentração do polímero na fase inferior do sistema (BAMBERGER *et al.*, 1985; ZASLAVSKY, 1995).

2.2 Extração Líquido-Líquido em Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas (SMDFA)

O termo “micela” foi utilizado pela primeira vez por McBain, em 1913, para descrever os agregados de eletrólitos anfifílicos (substâncias que possuem uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica) em soluções aquosas.

O método de separação por *Sistemas Micelares Mistos em Duas Fases Aquosas* explora a característica que alguns sistemas micelares possuem, de que quando submetidos a determinadas condições, podem espontaneamente se separar em duas fases líquidas aquosas e imiscíveis (LIU *et al.*, 1998). Segundo QUINA, HINZE (1999) o SMDFA pode ser considerado um caso particular do SDFA.

Considerável interesse tem sido verificado na utilização de sistemas micelares mistos em duas fases aquosas (SMDFA) para purificar e concentrar compostos como BSA, bacteriófagos, antibióticos, colesterol oxidase, lisozima e outras enzimas, vitaminas lipossolúveis e compostos orgânicos (CHENG-KANG, WEN-DA, 1998; BORDIER, 1981; HOLM *et al.*, 1986; NIKAS *et al.*, 1992; PRYDE, 1986; RAMELMEIER *et al.*, 1991; SANCHES-FERRER *et al.*, 1994; LIU *et al.*, 1998; LEE, SU, 1999; SIVARS, TJERNELD, 2000; TANI *et al.*, 1998; CHIANG, 1999; QUINA, HINZE, 1999; SIRIMANNE *et al.*, 1998). Essa técnica tem sido também utilizada para separar contaminantes com características hidrofóbicas presentes em soluções enzimáticas. Por exemplo, NÚÑEZ-DELICADO *et al.*, (1996) utilizaram essa técnica para reduzir em 92% o teor de compostos fenólicos presentes em uma solução contendo a enzima tirosinase, sem afetar a estrutura da enzima. Essa redução na concentração de fenóis por SMDFA foi suficiente para evitar o escurecimento da solução enzimática, mesmo após vários ciclos de congelamento e descongelamento, ou após vários meses de estocagem a -20°C .

Esse tipo de sistema possui algumas vantagens em relação a outros tipos de purificação de biomoléculas por extração líquido-líquido, como:

- é uma alternativa aos métodos clássicos de extração, pois é viável e atóxico (QUINA, HINZE, 1999);

- proporciona um ambiente favorável e ameno aos materiais biológicos, pois, dependendo do tipo e concentração do tensoativo, a temperatura de extração é de aproximadamente 20°C e pode, portanto, ser utilizado para purificar e concentrar biomoléculas (BORDIER, 1981; LIU *et al.*, 1995; SIRIMANNE *et al.*, 1998);
- possui a habilidade de concentrar, além de proteínas, diferentes tipos de moléculas como íons metálicos, compostos orgânicos e bacteriófagos (SAITOH, HINZE, 1991; LIU *et al.*, 1998; QUINA, HINZE, 1999);
- é um método seguro, pois não utiliza compostos inflamáveis e explosivos (SAITOH, HINZE, 1991);
- possui baixo custo pois utiliza somente um composto químico para a separação das fases e em baixas concentrações (QUINA, HINZE, 1999; SIRIMANNE *et al.*, 1998);
- gera resíduos de fácil tratamento, pois agentes tensoativos não-iônicos podem ser queimados na presença de acetona e etanol (SAITOH, HINZE, 1991; SIRIMANNE *et al.*, 1998);
- pode-se controlar e otimizar sua eficiência em função das condições de extração empregadas (LIU *et al.*, 1995; NIKAS *et al.*, 1992);
- é de fácil ampliação de escala (LIU *et al.*, 1995; PRYDE, 1986);
- possibilita o controle e otimização da partição de biomoléculas pelo ajuste das características das micelas como tamanho e forma, através da variação da temperatura, concentração do tensoativo e adição de sais (LIU *et al.*, 1998);
- pode proporcionar uma nova e eficiente opção para separação de moléculas de solutos muito grandes (próximas ao diâmetro do poro da rede micelar, $\xi > 200 \text{ \AA}$). Isso pode, por exemplo, ser aplicado a partículas coloidais e células (NIKAS *et al.*, 1992);
- oferece ambientes hidrofóbicos e hidrofílicos aos solutos devido ao caráter anfifílico das micelas e pode, com isso, aumentar a seletividade do processo de purificação em função da hidrofobicidade das biomoléculas;
- pode ter a seletividade da partição melhorada com a utilização de uma mistura de micelas contendo ligantes de afinidade acoplados ao tensoativo

que pode ser específico à biomolécula-alvo ou pela mistura de agentes tensoativos iônicos com não-iônicos (LIU *et al.*, 1998);

- permite que a análise das amostras seja feita por diferentes técnicas, sem causar interferência, como: cromatografia líquida, eletroforese, testes do tipo ELISA (*enzyme linked immunoasorbent assay*), dentre outras (QUINA, HINZE, 1999; SIRIMANNE *et al.*, 1998);
- pode separar as biomoléculas das micelas, após a partição, por processos simples, como a ultrafiltração (BORDIER, 1981) (Figura 2.13).

Comparando-se o SMDFA com o SDFA, conclui-se, que:

- o SMDFA é um processo mais simples que o SDFA, pois para formá-lo é necessária a presença de somente dois componentes (sistema binário), água e agente tensoativo, e não um sistema ternário como os polímeros (polímero + sal + água ou polímero + polímero + água);
- os sistemas micelares possuem estruturas que podem ser facilmente alteradas com as condições dos meios, enquanto que os SDFA possuem polímeros que apresentam estruturas rígidas. Ou seja, a estrutura das micelas pode, por exemplo, mudar de esférica para cilíndrica com o aumento da temperatura ou com a adição de sais;
- a seletividade do processo de extração por SMDFA é mais facilmente compreendida que por SDFA, uma vez que a hidrofobicidade da molécula pode definir sua posição em uma das fases do sistema;
- no SMDFA o diâmetro dos poros das redes micelares ($\sim 200\text{-}300 \text{ \AA}$) (Figura 2.4b) é muito maior que os diâmetros das proteínas ($15\text{-}50 \text{ \AA}$) e isso faz com que a proteína ignore a existência da rede, ou seja, o poro não vai reter a proteína. No caso das extrações por SDFA o diâmetro dos poros dos polímeros (ξ_{pol}) (Figura 2.4.a) é comparável ao diâmetro da proteína (D), ou seja, a proteína pode interagir com a rede polimérica (NIKAS *et al.*, 1992);
- a partição de proteínas hidrofóbicas em solução polimérica (SDFA) é bem menor que em solução micelar, porque a interação entre um polímero hidrofílico e uma proteína é menos sensível à hidrofobicidade das proteínas, quando comparada às interações entre um tensoativo e uma proteína.

- os dois processos servem como uma etapa de pré-purificação de proteínas (QUINA, HINZE, 1999);
- o SDFA é superior ao SMDFA na separação de proteínas de diferentes tamanhos, devido ao tamanho dos poros das redes enoveladas.

O primeiro trabalho que mostrou a possibilidade de separar proteínas por extração em sistemas de duas fases aquosas com o auxílio de agentes tensoativos foi o de BORDIER (1981). Esse autor usou o agente tensoativo não-iônico Triton X-114 para separar uma mistura de proteínas, pois, quando presente em solução aquosa, esse composto forma uma mistura homogênea quando submetido à temperatura de 0°C e se separa em duas fases quando a temperatura é superior a 20°C. O trabalho desse autor mostrou que as proteínas hidrofílicas eram encontradas exclusivamente na fase pobre em micelas (fase inferior do sistema de duas fases aquosas micelares), enquanto que as proteínas com caráter hidrofóbico se encontravam na fase rica em micelas (fase superior do sistema). Em 1984, CLEMETSON *et al.* verificaram que esse método poderia ser aplicado a sistemas complexos como aqueles envolvendo células intactas. Nesse mesmo ano, ZHANG, HAGER concluíram que esse procedimento de purificação poderia ser aplicado, com sucesso, na purificação de lipases e proteases. QUINA, HINZE (1999) informam que esse processo não é usado somente para separar compostos protéicos, pois esse procedimento foi introduzido no Japão, em 1976, por MIURA *et al.*, na extração e separação de íons metálicos. Posteriormente, HINZE (1987) verificou que, além de íons metálicos, outros tipos de compostos, como determinadas moléculas orgânicas de baixa massa molar poderiam, também, ser purificadas por SMDFA. Como exemplo tem-se a purificação, por SMDFA, de compostos como estriol, progesterona, β -estradiol e estrona com recuperações de 90%, 88%, 96% e 96% e fatores de concentração de 26, 29, 35 e 35 vezes, respectivamente (SAITOH, HINZE, 1991). Mais recentemente, MINUTH, *et al.* (1996) realizaram a purificação da enzima colesterol oxidase em somente duas etapas, SMDFA seguida de cromatografia de troca-aniônica, e conseguiram um aumento de pureza de 160 vezes e uma recuperação total de 80% da enzima. Outros estudos realizados por MINUTH *et al.* (1997) mostraram que a técnica

de SMDFA foi mais efetiva que alguns métodos cromatográficos em termos de recuperação, preservação de atividade biológica, simplicidade, custo e, particularmente, adequação aos processos realizados em larga-escala. Essa técnica pode, também, ser uma importante alternativa na purificação de proteínas de plantas. Segundo SANCHEZ-FERRER *et al.* (1994), alguns compostos presentes em plantas como fenóis e clorofila, que interferem nas técnicas convencionais de extração, podem ser facilmente removidos por SMDFA.

Essas características apresentadas tornam o SMDFA um método conveniente e promissor para a separação, purificação e concentração de bioprodutos (LIU *et al.*, 1996).

Agentes Tensoativos e Micelas

Agentes tensoativos são, tipicamente, moléculas compostas por duas partes quimicamente distintas (Figura 2.2):

- 1) *porção hidrofílica*: região da molécula que possui afinidade pela água e que é denominada de "cabeça polar", ou simplesmente "cabeça" e;
- 2) *porção hidrofóbica*: região da molécula que não possui afinidade pela molécula de água e que é denominada de "cauda apolar", ou simplesmente "cauda".

Em função dessa estrutura química ambivalente, quando essas moléculas de agentes tensoativos são dissolvidas em água ocorre a formação espontânea de estruturas agregadas conhecidas como **micelas**. Tipicamente, a micelização ocorre acima de uma determinada concentração de tensoativo, conhecida como CMC (concentração micelar crítica). Abaixo da CMC as moléculas de agentes tensoativos estão predominantemente dispersas como monômeros e acima da CMC elas estão predominantemente na forma de micelas. Soluções micelares, quando estão em baixas concentrações (geralmente abaixo de 20% p/p) podem existir como uma fase líquida homogênea. Após a separação de fases, conseguida através da variação da temperatura, observa-se que as duas fases obtidas são, também líquidas e homogêneas (PUVVADA, BLANKSCHTEIN, 1990).

As micelas são compostos dinâmicos que estão contínua e reversivelmente trocando monômeros umas com as outras (Figura 2.2, 2.3 e 2.7) e são constituídas de dezenas a milhares de monômeros de moléculas de agentes tensoativos (PUVVADA, BLANKSCHTEIN, 1990). Em uma micela, as caudas hidrofóbicas se atraem para minimizar o contato desfavorável com a água, enquanto que as cabeças hidrofílicas permanecem na superfície externa da micela para maximizar esse contato (CHEVALIER, ZEMB, 1990; TANFORD, 1980).

A formação de micelas reflete um balanço complexo de várias forças intermoleculares, incluindo forças de van der Waals, atrações eletrostáticas e interações hidrofóbicas (TANFORD, 1980; ISRAELICHAVILI, 1991). Porém, as interações eletrostáticas e, conseqüentemente o pH, exercem pouca influência nas extrações realizadas com agentes tensoativos não-iônicos, como mostrado por TERSTAPPEN *et al.* (1993). Ao contrário dos polímeros, que são formados por ligações covalentes entre os seus constituintes monoméricos, as micelas são compostos sensíveis formados por ligações não covalentes entre as moléculas de agentes tensoativos. Sendo assim, a forma e o tamanho das micelas (Figura 2.7) podem ser controladas através de variações nas condições da solução como a concentração do agente tensoativo, temperatura, tipo e concentração de sal (LIU *et al.*, 1996; CHEVALIER, ZEMB, 1990; PUVVADA, BLANKSCHTEIN, 1990; TANFORD, 1980). Além disso, as micelas presentes em soluções aquosas não possuem necessariamente um tamanho uniforme, mas sim, uma ampla distribuição de tamanho que pode também ser controlado por variações nas condições da solução, como mencionado anteriormente. Estudos experimentais e teóricos mostraram que as soluções micelares do tensoativo não-iônico C₁₀E₄ e do tensoativo zwitteriônico C₈-lecitina apresentaram uma forte tendência de variarem em comprimento, flexibilidade e forma (cilíndrica ou esférica), em função da temperatura e da concentração de tensoativo (QUINA, HINZE, 1999) (Figura 2.3). Experimentos de extração em SMDFA da proteína ovoalbumina, utilizando o tensoativo não-iônico C₁₀E₄ na concentração de 1 a 8% (p/p), geraram micelas com um comprimento médio de $1,7 \cdot 10^3$ a $1,1 \cdot 10^4 \text{Å}$ (NIKAS *et al.*, 1992).

Figura 2.2 - Representação esquemática da formação de micelas. As moléculas de agentes tensoativos são constituídas por uma cabeça hidrofílica e uma cauda hidrofóbica. Nota-se que, como indicado pelas setas, as micelas e as moléculas de tensoativos que a constituem fazem parte de um equilíbrio termodinâmico reversível (SHAH, 1998).

Quando presentes em elevadas concentrações e temperaturas, as micelas se tornam suficientemente longas ao ponto de interagirem entre si e formarem uma rede de micelas com estruturas similares às redes de polímeros (no caso do SDFA) (Figura 2.4). Alguns estudos mostraram que há duas formas distintas de soluções micelares. Na primeira delas, denominada de **"regime diluído"**, as micelas estão isoladas umas das outras quando presentes em meio aquoso. Na outra forma, denominada de **"regime semi-diluído ou concentrado"**, as micelas apresentam-se enoveladas e, segundo QUINA, HINZE (1999), a fase líquida é altamente viscosa ($\eta \approx 20$ cP). A concentração e o tamanho das micelas nas duas fases são diferentes e podem ser alterados de acordo com a concentração do tensoativo, temperatura, força iônica e pH (NIKAS *et al.*, 1992).

Figura 2.3 – Representação esquemática de diferentes formas de micelas em solução aquosa diluída. As estruturas formadas incluem: (a) pequenas micelas esféricas; (b) micelas globulares ; (c) micelas esfero-cilíndricas - com possibilidade de diferentes diâmetros do cilindro e da esfera (ESUMI, UENO, 1997)

Separação de Fases

Uma solução aquosa micelar homogênea, quando mantida sob determinadas temperaturas e concentrações de agentes tensoativos, pode se separar em duas fases macroscópicas, causada pelo "aumento da temperatura". Após o processo de separação, uma das fases obtidas (fase superior) apresenta maior concentração de micelas (Figura 2.5), porém ambas contém teor de água superior a 90% p/p (LIU *et al.*, 1996). Soluções aquosas de vários sistemas micelares de agentes tensoativos não-iônicos, quando submetidos a esse "aumento de temperatura", ainda que pequeno, podem se turvar. Essa turvação é denominada de "cloud point" ou "ponto de névoa". Acima do ponto de névoa, tais soluções se separam em duas fases isotrópicas (SAITOH, HINZE, 1991).

Em 1981, BORDIER foi o primeiro autor a explicar que a separação de fases por SMDFA ocorria devido à baixa solubilidade e à agregação das micelas do agente tensoativo não-iônico Triton X-114 quando em condições de temperatura e concentração de tensoativo acima de seu ponto crítico. Segundo TERSTAPPEN *et al.* (1993), a razão pela qual o aumento da temperatura causa redução na solubilidade e crescimento das micelas foi atribuída à desidratação reversível da cabeça polar do tensoativo.

Figura 2.4 – (a) comparação esquemática do comprimento (em escala aproximada) associado com proteínas e polímeros (tanto na forma individual como na forma enovelada): D é o diâmetro da molécula de proteína; D_{pol} é o diâmetro do novelo polimérico e ξ_{pol} é o diâmetro do poro da rede polimérica; (b) comparação esquemática do comprimento (em escala aproximada) das micelas (tanto na forma individual como na forma enovelada): D é o diâmetro da molécula de proteína, $W_m=2R_o$ é o diâmetro da micela, D_m é comprimento médio de uma micela cilíndrica e ξ_m é o diâmetro do poro da rede micelar (NIKAS et al., 1992). Como exemplo tem-se que o raio hidrodinâmico de proteínas globulares elipsoidais variam de 15 a 50 Å, mais especificamente tem-se que o raio hidrodinâmico da glicose-6-fosfato desidrogenase é de 68 Å.

Esse processo de separação de fases, segundo BLANKSCHTEIN *et al.* (1986), é resultado da competição entre a entropia (que favorece a miscibilidade das micelas na água) e a entalpia (que favorece a separação das micelas da água) do sistema. Dependendo da variação dessas duas contribuições (entalpia e entropia), em função da temperatura, pode-se obter

um sistema mono ou bifásico. No caso do sistema bifásico, a separação física ocorre devido à diferença de densidade entre a fase diluída e a fase semi-diluída (QUINA, HINZE, 1999).

O fenômeno de separação de fases induzido pelo "aumento da temperatura" pode ser representado por uma curva em forma de sino, com concavidade para cima ou para baixo, dependendo do agente tensoativo, denominada de *curva binodal* ou *curva de coexistência*. A curva binodal é construída variando-se a concentração de tensoativo e a temperatura do meio (Figura 2.6), de acordo com a metodologia do "ponto de névoa (NIKAS *et al.*, 1992). A curva binodal representa, com isto, o limite de separação, em função da temperatura e da concentração de tensoativo, na qual a fase micelar se separa em duas fases macroscópicas. O sistema bifásico é representado pela parte interna da curva enquanto que o sistema monofásico é representado pelo lado externo. Quando a curva binodal apresenta concavidade para cima, tem-se que o ponto mínimo se refere ao "ponto crítico inferior" caracterizado pela temperatura crítica (T_c) e pela concentração crítica de agente tensoativo (X_c). Como se pode observar na Figura 2.6, para o $C_{10}E_4$ tem-se o valor de $T_c \approx 18.8^\circ\text{C}$ e de $X_c \approx 2\%$ (p/p). O diagrama de fases, construído com apenas um agente tensoativo não-iônico e água, possui suas linhas de amarração ("tie-lines") paralelas e acima da tangente traçada no ponto crítico. No caso do agente tensoativo $C_{10}E_4$, as linhas de amarração aumentam de tamanho à medida que se aumenta a temperatura do sistema. Elas podem ser caracterizadas pelo parâmetro R que corresponde à proporção entre o volume da fase superior (V_T) e o volume da fase inferior do sistema (V_B), ou seja, $R = V_T/V_B$. Para esse agente tensoativo, quando se aumenta a temperatura do sistema, o valor de R diminui e quando se está em temperaturas superiores a 20°C o valor de R varia somente em função do volume da fase inferior (V_B), uma vez que a curva binodal está praticamente paralela e muito próxima ao eixo das ordenadas.

Sabe-se, também, que algumas soluções micelares cedem à separação de fases quando se "reduz a temperatura". Nesse caso, a curva binodal apresenta "concavidade para baixo" e o ponto crítico é denominado de "ponto crítico superior". Segundo NIKAS *et al.* (1992), no ponto crítico o coeficiente de

partição de proteínas (K_p) tende a 1, pois as duas fases micelares nesse ponto possuem composições idênticas.

Figura 2.5 - Esquema de separação de fases de uma solução micelar mista. Em cada uma das fases encontram-se micelas em diferentes concentrações. Nota-se, também, que as micelas presentes na fase superior estão em maior número que as da fase inferior.

BLANKSCHTEIN *et al.* (1991) verificaram que as curvas binodais dos SMDFA sofrem grande influência de alguns tipos de sais. Após alguns estudos eles concluíram que os ânions monovalentes alteram a posição da curva binodal enquanto os cátions apresentam pouca influência. TERSTAPPEN *et al.* (1993) verificaram que a adição de sais de fosfato reduz a temperatura do ponto crítico do tensoativo Triton X-114 em 7°C para cada 100 mM de fosfato adicionado.

Separação de Biomoléculas por SMDFA

Embora os agentes tensoativos, em particular os iônicos, possam se ligar e desnaturar biomoléculas como as enzimas, existem tensoativos não-carregados (não-iônicos) que não se ligam de forma intensa a essas

biomoléculas e portanto não as desnaturam (HELENIUS, SIMON, 1972; MAKINO, 1979; MAKINO *et al.*, 1973). Os tensoativos iônicos interagem através de forças iônicas, num primeiro momento, com a superfície carregada das proteínas (Figura 2.11 e 2.12) e depois por interação hidrofóbica com a superfície hidrofóbica da proteína (Figuras 2.8, 2.11, 2.12).

Figura 2.6 – Curva Binodal Experimental de uma solução aquosa do agente tensoativo $C_{10}E_4$ baseada no artigo de LIU *et al.* (1996). ϕ_B corresponde à fração volumétrica do agente tensoativo na fase inferior; ϕ_T corresponde à fração volumétrica do agente tensoativo na fase superior; V_T corresponde ao comprimento do segmento-de-reta da linha de amarração compreendido entre ϕ_B e o valor da concentração total do tensoativo no sistema antes da separação das fases (neste caso o valor é de 4,12%) e cujo valor é proporcional ao volume da fase superior; V_B corresponde ao comprimento do segmento-de-reta da linha de amarração compreendido entre ϕ_T e o valor da concentração total do tensoativo no sistema antes da separação das fases e cujo valor é proporcional ao volume da fase inferior.

Os tensoativos carregados positivamente interagem com os grupos carboxílicos enquanto que os carregados negativamente interagem com os grupamentos amino. O efeito global é que ocorre uma neutralização da carga superficial das proteínas e, conseqüentemente, sob determinadas concentrações de tensoativos as proteínas podem ser desnaturadas devido ao desequilíbrio entre as forças hidrofóbicas e interações eletrostáticas. Foi observado, também, que a adição de tensoativos não-iônicos pode aumentar a estabilidade térmica de algumas enzimas. Portanto, os sistemas micelares mistos em duas fases aquosas constituídos por agentes tensoativos não-iônicos podem proporcionar um ambiente ameno e compatível com biomoléculas (GAIKAR *et al.*, 1996).

Com relação ao efeito dos agentes tensoativos iônicos sobre a estabilidade das enzimas, encontram-se na literatura informações de que determinadas enzimas, quando colocadas na presença de alguns tensoativos iônicos (CTAB: 0-0,15% p/p; TDDAO: 0-1.5%p/p) não foram desnaturadas (GAIKAR *et al.*, 1996). Segundo QUINA, HINZE (1999), a adição de agentes tensoativos iônicos ao SMDFA em associação com um agente tensoativo não-iônico, presente em maior concentração, pode favorecer a transferência de enzimas para a fase micelar semi-diluída e, portanto, atuarem como ligantes não-específicos. LIU *et al.* (1998) e SIVARS, TJERNELD (2000) também propõem a mistura de agentes tensoativos iônicos aos não-iônicos (Figura 2.10) que atuariam como ligantes de afinidade, para aumentar a seletividade da extração, ou a adição de ligantes em função da característica de cada molécula a ser purificada (Figura 2.9). Essa proposta é promissora e indica a possibilidade de se realizar extrações por SMDFA utilizando-se, também agentes tensoativos iônicos.

Figura 2.7 – Variação do tamanho e da forma de micelas em função de variáveis como temperatura, concentração de tensoativo e sais. Por exemplo, uma micela esférica pode crescer e se alongar após aumento de temperatura, aumento da concentração de tensoativo e adição de sais à solução.

Figura 2.8 – Possíveis localizações de biomoléculas em relação às micelas. As micelas podem proporcionar um ambiente com dupla função às biomoléculas. As biomoléculas hidrofílicas tendem a permanecer na parte externa das micelas enquanto que as de caráter hidrofóbico tendem a ser incorporadas ao núcleo micelar.

Figura 2.9 - Mistura de agentes tensoativos com ligantes específicos. Pode-se concentrar uma biomolécula na fase rica em micelas e aumentar a eficiência de separação.

Figura 2.10 – (A) Representação esquemática de uma micela esférica constituída pelo agente tensoativo não-iônico C_{10}E_4 (—●—) e pelo tensoativo catiônico DTAB (—●+—); (B) Esquema de um modelo de hidratação de uma micela mista de DTAB e C_{10}E_4 .

Figura 2.11 – Adsorção de agentes tensoativos em superfícies hidrofílicas na forma de mono (A) ou bicamadas (B), quando presentes em concentrações inferiores à CMC (SHAH, 1998).

Figura 2.12 – Adsorção de agentes tensoativos em superfícies hidrofílicas na forma de micelas esféricas ou cilíndricas (concentrações superiores à CMC) (SHAH, 1998).

Figura 2.13 - Separação das micelas e das biomoléculas hidrofílicas por processo de filtração.

Conclui-se, portanto, que o SMDFA pode ser uma alternativa importante para a purificação de biomoléculas. Conseqüentemente, torna-se importante estudar como certas biomoléculas, por exemplo as enzimas, particionam entre as duas fases micelares formadas e assim identificar e caracterizar as principais forças motrizes e os princípios físico-químicos básicos responsáveis pela partição observada.

TERSTAPPEN *et al.* (1993) verificaram que o aumento do comprimento da cauda hidrofóbica do tensoativo não-iônico, ou da temperatura, aumenta a partição do tensoativo para a fase rica em micelas e, conseqüentemente, aumenta também a partição de proteínas hidrofóbicas. Esses autores verificaram que há uma correlação positiva entre a hidrofobicidade da proteína e a sua partição para a fase rica em micelas. BORDIER (1981) verificou que as proteínas hidrofílicas possuem pouca ou nenhuma interação com tensoativos não-iônicos e que suas propriedades físico-químicas não são influenciadas com a presença desses tensoativos. Estudos conduzidos por PRYDE, PHILLIPS (1986) também mostraram que é possível separar proteínas por SMDFA baseado nas suas hidrofobicidades relativas. Esses autores estudaram a extração das enzimas dopamina- β -hidroxilase, ATPase e citocromo b561.

NIKAS *et al.* (1992) apresentaram uma formulação teórica para descrever e prever a partição de proteínas hidrossolúveis em SMDFA contendo micelas cilíndricas e não-carregadas. Para isso esses autores assumiram que:

- as micelas devem ser esféricas ou cilíndricas, penetráveis e polidispersas;
- o solvente deve ser tratado como um meio contínuo;
- as proteínas devem ser hidrofílicas e globulares;
- as proteínas devem ser consideradas como esferas rígidas,
- não considerar a presença de monômeros de tensoativos na solução porque suas concentrações são aproximadamente as mesmas nas duas fases e não influenciam o valor de K_p ;
- a concentração salina no meio deve ser baixa.

A teoria de NIKAS *et al.* (1992) se baseou no fato de que a partição de uma proteína se dá pelo princípio de "volume de exclusão" entre as proteínas globulares hidrofílicas e as micelas cilíndricas não-carregadas. De acordo com

essa teoria, as micelas são capazes de crescer em microestruturas longas e cilíndricas em função da variação da temperatura e/ou da concentração de tensoativo e, portanto, serem de diferentes tamanhos. Diversos experimentos realizados por LIU *et al.* (1996) mostraram haver uma boa correlação entre essa teoria proposta e os dados experimentais obtidos com a extração de diversas biomoléculas como o citocromo C, inibidor de tripsina de soja, ovoalbumina, albumina de soro bovino e catalase, utilizando como agente tensoativo não-iônico o óxido de n-decil-tetraetileno (C₁₀E₄). Essa boa correlação encontrada entre a proposta teórica e os dados experimentais reforçou a hipótese de que as interações do tipo "volume de exclusão" entre micelas cilíndricas não-carregadas e proteínas globulares hidrofílicas são o fator dominante na partição de biomoléculas por SMDFA.

Os modelos propostos estão representados pelas Equações 2.1 e 2.2

$$K_{pc} = \exp[-(\phi_T - \phi_B)(1 + R_p/R_o)^2] \quad \text{Eq. 2.1}$$

Sendo:

- K_{pc} = Coeficiente de partição das proteínas, considerando micelas cilíndricas;
- ϕ_T = Fração volumétrica do tensoativo, sem considerar a superfície de hidratação, na fase superior ("top");
- ϕ_B = Fração volumétrica do tensoativo, sem considerar a superfície de hidratação, na fase inferior ("bottom");
- R_p = Raio hidrodinâmico da proteína;
- R_o = Raio de corte transversal das micelas cilíndricas (é, na verdade, o comprimento da própria molécula de agente tensoativo – soma do comprimento da cauda de hidrocarboneto com o comprimento da cabeça polar).

$$K_{pe} = \exp[-(\phi_T - \phi_B)(1 + R_p/R_o)^3] \quad \text{Eq. 2.2}$$

Sendo:

- K_{pe} = Coeficiente de partição das proteínas, considerando micelas esféricas;
- ϕ_T = Fração volumétrica do tensoativo, sem considerar a superfície de hidratação, na fase superior ("top");
- ϕ_B = Fração volumétrica do tensoativo, sem considerar a superfície de hidratação, na fase inferior ("bottom");
- R_p = Raio hidrodinâmico da proteína;
- R_o = Raio de corte transversal das micelas cilíndricas.

Como se pode ver nas Equações 2.1 e 2.2, o valor de K_p depende somente das concentrações dos agentes tensoativos nas fases do sistema, da forma e tamanho da micela e do tamanho da molécula de proteína. Porém os segundos termos das equações $(1+R_p/R_o)$ são os que maior influência têm sobre o K_p e, portanto, uma atenção especial deve ser dada aos valores desses dois raios.

O primeiros termos das equações $(\phi_T-\phi_B)$ são facilmente obtidos dos diagramas de fases de cada agente tensoativo. Como se pode observar nesses diagramas (Figura 2.6), o aumento da diferença entre a temperatura de extração (T) e a temperatura crítica (T_c) causa aumento na diferença entre ϕ_T (concentração de tensoativo na fase superior) e ϕ_B (concentração de tensoativo na fase inferior) e conseqüente redução no valor de K_p . Esse fato sugere que a expulsão das proteínas hidrofílicas da fase superior (rica em micelas) pode estar relacionada ao decréscimo de espaço acessível a elas naquela fase, à medida que a temperatura de extração aumenta, ou seja, aplica-se aqui o chamado "efeito de exclusão". Segundo NIKAS *et al.* (1992), a extração por SMDFA não deve ser feita a temperaturas muito superiores à temperatura do ponto crítico, pois nesse caso a viscosidade da fase micelar torna-se muito elevada (devido à elevada concentração de agente tensoativo) e faz com que o tempo exigido para se obter o equilíbrio das fases seja muito longo e os resultados não sejam reprodutíveis. Conclui-se, portanto, que quanto menor a temperatura de extração, maior o coeficiente de partição. Porém, as extrações não devem ser feitas em temperaturas muito próximas ao ponto crítico, pois a tensão interfacial entre as duas fases torna-se extremamente baixa podendo, inclusive, desaparecer e gerar uma interface muito difusa. Além disso, a retirada de amostras nas proximidades de T_c pode causar mistura das fases.

LIU *et al.* (1996) verificaram ainda que o aumento da massa molar da proteína provocava redução no valor de K_p , ou seja, as proteínas eram deslocadas para a fase com maior volume livre. Os resultados experimentais obtidos para essas três proteínas mostraram uma boa correlação com os valores previstos pelo modelo matemático. As pequenas diferenças entre os valores experimentais e os previstos pelo modelo foram atribuídas às

características específicas de cada proteína, como a hidrofobicidade e cargas dos resíduos e não somente à massa molar, como prevê o modelo.

2.3 Extração Líquido-Líquido em Sistemas Micelares Reversos (SMR)

Quando em meio apolar as micelas, ao contrário do que foi apresentado no item 2.2, apresentam orientação inversa em relação à formação da estrutura micelar em água, sendo esta formação denominada micela reversa. Ela contém água em seu núcleo interno e fica dispersa num meio com solvente orgânico (KREI, HUSTEDT, 1989). A Figura 2.14 mostra a diferença entre as micelas tradicionais e as micelas reversas. Portanto, micelas reversas são agregados de moléculas de agentes tensoativos contidos em um solvente orgânico apolar.

Figura 2.14 - Esquema de Micela, Micela Reversa Vazia e Micela Reversa Contendo Proteína em seu Interior.

Os sistemas micelares representados na Figura 2.14 apresentam formas aproximadamente esféricas. No entanto, micelas reversas podem ser elípticas com os diâmetros que podem atingir 200 Å (KREI, HUSTEDT, 1989). Tanto a forma e o tamanho, quanto a transferência de enzimas presentes numa fase aquosa para a pseudofase micelar dependem da natureza do solvente e do co-solvente, do tipo de tensoativo, da temperatura, da força iônica e do pH, dentre outros (KILIKIAN *et al.* 2000; RODRIGUES *et al.*, 1999^{a,b}; ZAMARRO *et al.*, 1996; KADAM, 1986).

Tipos de Solventes

Para que haja a formação das micelas reversas é necessário que o solvente e a água sejam imiscíveis. Dos diversos solventes que podem ser usados nos sistemas de micelas reversas, os mais comuns são hidrocarbonetos alifáticos, como o isooctano, o n-octano, o n-heptano e o ciclo hexano (RODRIGUES *et al.*, 1999^a; CHANG, CHEN, 1996; LUISI *et al.*, 1988).

O tipo de solvente pode influenciar no tamanho da micela reversa. Sistemas com hexano, isooctano, octano e querosene formam micelas reversas com diâmetros maiores que sistemas com ciclohexano, xileno e clorofórmio (CHANG, CHEN, 1996; KADAM, 1986). A diminuição da concentração do solvente ocasiona a redução na transferência de proteínas para o interior da micela reversa, prejudicando o processo de extração (KREI, HUSTEDT, 1992).

Co-solventes

Os co-solventes são utilizados como auxiliares em sistemas de micelas reversas de tensoativos catiônicos para aumentar o seu tamanho, pois micelas formadas por estas substâncias são muito pequenas. O co-solvente assemelha-se a uma solução tampão que provoca uma forte repulsão entre as interações íon-íon dos núcleos do tensoativo, permitindo a formação do núcleo interno da micela reversa (LUISI *et al.*, 1988). Geralmente utilizam-se, como co-solventes, álcoois de cadeias não muito curtas como hexanol, n-butanol e octanol (KREI, HUSTEDT, 1992; CHANG, CHEN, 1996; PIRES *et al.*, 1996).

Os co-solventes também podem ter influência sobre as estruturas das micelas reversas, como é o caso da água solubilizada na micela reversa de TOMAC, que sofre variação em função da quantidade de co-solvente do meio (CHANG, CHEN, 1996). Também a extração de α -amilase, utilizando Aliquat 336 mostrou-se sensível às variações no tipo de co-solvente utilizado no sistema (HILHORST *et al.*, 1995).

Agentes Tensoativos

Estes compostos são classificados de acordo com a carga de sua parte polar, como: neutros, aniônicos e catiônicos (MEYER, 1992; KREI, HUSTEDT, 1989). De acordo com a literatura, o agente tensoativo aniônico AOT, tem sido amplamente utilizado (PATEL *et al.*, 1996; REGALADO *et al.*, 1996; ZAMARRO *et al.*, 1996; HUANG, LEE, 1994; HENTSCH *et al.*, 1992; AIRES-BARROS *et al.*, 1991) e mostra-se adequado para separação de proteínas de elevado ponto isoelétrico. Para proteínas de baixo ponto isoelétrico, são recomendados agentes tensoativos catiônicos como o BDBAC, CTAB ou TOMAC. No entanto, tais tensoativos formam micelas reversas pequenas, tornando-se necessária a adição de um co-solvente ou, ainda, de um outro tensoativo não iônico, para obtenção de micelas maiores (HILHORST *et al.*, 1995).

Apesar da existência de inúmeros tensoativos diferentes, os mais utilizados para a formação de micelas reversas são: 1) catiônicos: brometo de cetiltrimetil amônio – CTAB, cloreto de benzil dodecil bis(hidroxietil) amônio – BDBAC, cloreto de trioctilmetil amônio – TOMAC, brometo de cetil piridínio – CPB, brometo de didodecil dimetil amônio – DDAB; b) aniônico: bis(2-etilhexil) sulfosuccinato de sódio – AOT, bis(2-etilhexil) fosfato de sódio – NaDEHP; c) neutros: lecitina de soja; lecitina de clara de ovo; Rewopal HV5; Tergitol NP-4.

Parâmetro W_o

A quantidade de água nas micelas reversas, definida pelo parâmetro W_o (“water-in-oil”), pode ser obtida pela Equação 2.3, que exprime a relação entre a concentração molar de água e de tensoativo (LUISI *et al.*, 1988). Este é um parâmetro de suma importância no sistema, pois determina, principalmente, a estrutura e o tamanho das micelas reversas (CASTRO, CABRAL, 1988; AIRES-BARROS, 1991). Assumindo a hipótese de que as micelas reversas sejam esféricas e que existe uma distribuição monodispersa dos raios dos núcleos aquosos, o raio micelar (R_m) pode ser equacionado pela Equação 2.4.

$$W_o = [H_2O]/[tens.] \quad \text{Equação 2.3}$$

$$R_m (\text{\AA}) = 1,64 W_o$$

Equação 2.4

O tamanho das micelas reversas pode ser determinado também através de métodos experimentais como ressonância magnética e técnicas de dispersão de luz (SEOUD *et al.*, 1999).

Composição das Micelas Reversas

A micela reversa é formada por três regiões: uma primeira região formada pelas caudas hidrofóbicas das moléculas do tensoativo que fica em contato direto com o solvente apolar; a segunda região é a periferia micelar onde as moléculas de água estão fortemente ligadas aos núcleos polares do tensoativo e, por fim, a terceira região, o centro micelar, formado pela água contida no interior da micela, que está ligada ao tensoativo ou água livre (AIRES-BARROS, 1991). A Figura 2.15 ilustra a composição de uma micela reversa.

A água que fica na periferia micelar possui propriedades físico-químicas diferentes da água em solução, principalmente em micelas de diâmetro pequeno, uma vez que suas moléculas se ligam fortemente ao tensoativo, alterando a estrutura e viscosidade.

Normalmente, a cada molécula de tensoativo aniônico, encontra-se de 4 a 10 moléculas de água ligadas ao seu núcleo polar. Em tensoativos catiônicos, esse número se reduz para uma molécula de água (AIRES-BARROS, 1991). Por outro lado, a água do centro micelar tem propriedades semelhantes às da água, pois essa está livre e portanto não teve sua estrutura modificada. Tal característica é importante visto que a água do centro micelar entra em contato com a biomolécula a ser extraída (LUISI *et al.*, 1988; KADAM, 1986).

Figura 2.15 - Composição de uma Micela Reversa
(Adaptado de SEOUD *et al.*, 1999).

Sistemas Micelares Reversos

No preparo de sistemas contendo agente tensoativo, solvente e água é necessário definir as proporções entre os componentes de modo que ocorra a formação de micelas reversas. Para tanto pode-se utilizar diagramas de fases específicos para cada sistema. O diagrama de fases para os sistemas de micelas reversas são, no geral, do tipo triangular, ou seja, ternários, semelhantemente aos diagramas tradicionais, onde cada componente ocupa um vértice do triângulo (no caso, tensoativo, solvente e água). Os diagramas são compostos de diferentes regiões (Figura 2.16): regiões de cristais líquidos hexagonais, solução micelar aquosa e solução micelar reversa (SEOUD *et al.*, 1999).

Figura 2.16 - Estruturas que Formam o Sistema Genérico Tensoativo/Solvente/ H_2O (Adaptado de SEOUD *et al.*, 1999).

Através do diagrama de fases, é possível prever e identificar quantas e quais fases estão presentes no sistema. A determinação de tais diagramas é difícil devido à existência de regiões muito distintas e são, portanto, pouco encontrados na literatura.

Figura 2.17 - Diagramas de Fases dos Agentes Tensoativos CTAB (I) e AOT (II).

Após a determinação dos componentes responsáveis pela formação dos sistemas micelares, deve-se definir as condições de extração, tais como: pH, força iônica e temperatura. Existem três maneiras de serem preparados os sistemas de micelas reversas: a primeira delas consiste da adição de pequena quantidade de solução aquosa, contendo a proteína, à solução contendo o solvente orgânico e o tensoativo (microemulsão). Após a agitação, formar-se-á uma solução límpida de micelas reversas contendo proteína. Na segunda (aplicável a proteínas de baixa solubilidade ou insolúveis em água) usa-se a proteína na forma de pó, injetando-a diretamente na microemulsão. Na terceira, denominada transferência de fases, misturam-se volumes iguais de solução aquosa contendo a proteína e de microemulsão (RODRIGUES, *et al.*, 1999^{a,b}; PESSOA-JR, VITOLO, 1997; LUISI *et al.*, 1988).

A extração de uma proteína de um caldo fermentado, visando sua separação e purificação, é feita em duas etapas: a primeira delas, denominada de extração, visa transferir a proteína que está na fase aquosa para a fase micelar; a segunda etapa consiste da reextração da proteína para uma nova fase aquosa. A Figura 2.18 ilustra o processo de extração descrito.

A escolha do tensoativo (catiônico ou aniônico) é fundamental no processo de separação e purificação de proteínas por sistemas micelares reversos. Para que o tensoativo exerça atração sobre a proteína é necessário que tenham cargas líquidas totais opostas. No que se refere à proteína, a carga líquida total é determinada pelo pH da fase aquosa. Assim, tensoativos aniônicos são indicados para processos de separação em que a proteína desejada possua pI elevado, pois desta forma, a diferença entre o pI e o pH também será alta (LUISI *et al.*, 1988).

Outro fator que merece atenção é a força iônica da fase aquosa. Esta não deve ser elevada o suficiente para prejudicar a eletroneutralidade necessária para que ocorram as interações eletrostáticas entre a proteína e o tensoativo (HATTON, 1987).

Assim, para que se obtenham condições, as mais favoráveis possíveis, para extração de proteínas por micelas reversas, deve-se usar baixa força iônica, $\text{pH} < \text{pI}$ para tensoativos aniônicos e $\text{pH} > \text{pI}$ para tensoativos catiônicos. No entanto, para a etapa de reextração, a situação se inverte, uma vez que se

deseja que a proteína seja “expulsa” da micela. Portanto usa-se alta força iônica, $\text{pH} > \text{pI}$ para tensoativos aniônicos e $\text{pH} < \text{pI}$ para tensoativos catiônicos.

Mecanismo de Formação de Micelas Reversas

O mecanismo de formação das micelas reversas não está totalmente elucidado. No entanto, a teoria mais aceita descreve a formação da micela reversa como um mecanismo cooperativo entre proteína e tensoativo: a interface entre as duas fases (aquosa e micelar) se deforma em torno da proteína, formando a micela e transferindo-a para a fase orgânica, conforme ilustrado na Figura 2.19 (DUNGAN, *et al.*, 1991). Um dos fatores que causam a deformação da interface seria a interação eletrostática provocada pela ação da força iônica e pH.

Figura 2.18 - Representação Esquemática do Processo de Extração em Sistemas Micelares Reversos.

Figura 2.19 - Mecanismo de Formação de Micelas Reversas (Adaptado de DUNGAN *et al.*, 1991).

A velocidade de agitação durante a mistura do sistema micelar pode afetar a separação da proteína, pois interfere no transporte de massa e nas resistências existentes na interface entre as fases aquosa e orgânica. Quando a proteína está sendo transferida da fase aquosa para a micelar, ela encontra a resistência difusional, associada ao transporte do soluto de dentro da solução para a interface e vice-versa. Com o aumento da velocidade de agitação entre as duas fases, ocorre a diminuição drástica da resistência ao englobamento da proteína devido à redução da camada limite entre as duas regiões. No entanto, conforme relatado por DUNGAN *et al.* (1991), quando o valor do pH e a concentração de sais são elevados, a partição da proteína independe da velocidade de agitação, pois nessas condições a força iônica predomina sobre a resistência na interface.

Modelos de Absorção de Biomoléculas

A localização da proteína no interior da micela reversa depende de sua natureza e do tipo de tensoativo. Existem inúmeros possíveis modelos que visam ilustrar a absorção de proteínas pelas micelas reversas e diferentes situações são descritas a seguir e ilustradas na Figura 2.20 (LUISE *et al.*, 1988):

- Situação I - proteínas hidrofílicas estariam localizadas no centro micelar;
- Situação II - molécula de proteína ativa, pode interagir fortemente com a parede da micela reversa;
- Situação III - proteínas hidrofílicas localizadas no centro micelar solubilizadas juntamente com outras proteínas contaminantes;
- Situação IV - grande número de micelas reversas solubilizando uma proteína com caráter predominantemente hidrofóbico (proteínas localizadas em contato com a cauda do tensoativo e até mesmo com o solvente);
- Situação V - várias micelas reversas englobando diversas proteínas.

Figura 2.20 - Modelos de Proteínas Englobadas por Micelas Reversas (Adaptado de LUISI *et al.*, 1988).

Fatores que Afetam a Extração de Proteínas

Existem alguns fatores que afetam a transferência da proteína da fase aquosa para a pseudofase micelar e também sua reextração. Dentre eles, destacam-se: pH, força iônica, tipo de íon, tipo da proteína, temperatura, tipo e concentração do tensoativo do solvente e co-solvente, tamanho da micela e velocidade de agitação. Cada um dos fatores serão discutidos a seguir.

pH

Esta variável determina a rede de cargas da proteína, influenciando o estado de ionização dos grupos eletricamente carregados em sua superfície. A transferência de proteínas para o interior da micela reversa é favorecida por interações eletrostáticas entre os núcleos do tensoativo e a superfície da proteína, que ocorrem quando a carga líquida total da proteína é oposta à carga do tensoativo. Assim, quando se usa agente tensoativo aniônico, em processos de extração líquido-líquido por micelas reversas, deve-se trabalhar com valores de pH inferiores ao do ponto isoelétrico, pois desta forma a proteína apresentará carga líquida positiva, condição que favorece a atração eletrostática entre a proteína e o agente tensoativo. De modo oposto, para tensoativos catiônicos, a transferência da proteína seria favorecida em valores de pH acima do ponto isoelétrico da proteína.

No entanto, tal comportamento pode não ser observado. Por exemplo, PIRES *et al.* (1996) em trabalhos de extração de α -quimiotripsina (que possui pI = 8,3) e pepsina (pI < 1,1) utilizando em ambos os casos TOMAC (tensoativo catiônico), observaram que o pH não influenciou a extração para ambas as proteínas. A explicação para tal fato foi que outra variável, a força iônica, exerceu maior influência que o pH de extração (PIRES *et al.*, 1996, CASTRO, CABRAL, 1988, DEKKER *et al.*, 1989).

Via de regra, para proteínas de elevada massa molar, a diferença entre o pH da fase aquosa e o seu pI deve ser suficiente para obter uma transferência

de massa satisfatória. ANDREWS *et al.* (1994) verificaram que uma ou duas unidades de pH abaixo do pI é suficiente para transferência de praticamente 100% da proteína. Para proteínas com menores massas molares não existe esta necessidade, uma vez que serão solubilizadas mesmo quando o valor do pH estiver próximo ao do pI da enzima. O pH influi na transferência da proteína em função da sua massa molar pois, para proteínas de massas molares elevadas, são necessárias micelas reversas maiores que a micela vazia, tornando o processo energeticamente desfavorável. Para viabilizá-lo, deve-se favorecer as interações eletrostáticas (entre proteína e tensoativo) através do aumento da densidade de cargas da proteína, o que ocorre com o aumento da diferença entre o pH e o pI. Assim, para proteínas menores, o tamanho necessário da micela também é menor, portanto não há a necessidade de uma diferença grande entre o pH e o pI.

No entanto, deve-se dar atenção especial ao valor de pH empregado, uma vez que valores muito elevados podem levar à desnaturação da proteína.

Força iônica e tipo de íon

A transferência das proteínas para as micelas reversas depende, como já citado, das interações eletrostáticas entre a proteína e o núcleo do tensoativo. Portanto, a força iônica e o tipo de íon da fase aquosa são muito importantes, devido às cargas presentes na solução (HASMANN, 2000).

A força iônica, que pode ser expressa em termos de condutividade elétrica, controla a solubilização de proteínas no sistema micelar, pois o alcance da força eletrostática da micela depende da força iônica do meio. O aumento da concentração de íons no meio ocasiona uma redução na eficiência de transferência de proteínas pela micela, seguida de um enfraquecimento das trocas eletrostáticas entre as proteínas e as porções polares dos tensoativos, e conseqüente diminuição da solubilidade das proteínas na micela. Também as enzimas de maior massa molar presentes na micela tornam-se menos solúveis em decorrência do aumento da força iônica (KREI, HUSTEDT, 1989; HATTON, 1987).

ANDREWS *et al.* (1994) verificaram que a força iônica pode afetar o tamanho da micela, pois os grupamentos polares dos agentes tensoativos

repelem-se, e com isso micelas maiores são formadas quando submetidas à baixa força iônica. Esse fato está relacionado com a teoria de Debye (HATTON, 1987), segundo a qual a capacidade de aproximação da proteína e dos grupamentos polares do tensoativo é inversamente proporcional à raiz quadrada da força iônica do meio. Desta forma, à medida que a força iônica da solução que contém a proteína aumenta, as interações entre a proteína e o agente tensoativo diminuem, devido à redução do efeito repulsivo entre os grupos polares do tensoativo. Esse fato leva a um decréscimo do transporte de água ou outras moléculas e, conseqüentemente, à formação de menos e menores micelas reversas.

O tipo de íon pode afetar significativamente a transferência de proteínas para o interior das micelas reversas. Em estudos visando analisar o efeito do tipo de íon sobre a extração da ribonuclease A e da taumatina, ANDREWS, HAYWOOD (1994) verificaram que na presença de íons maiores, como o K^+ , a solubilização da proteína é diminuída, devido provavelmente à formação de um campo eletrostático que reduz as interações entre a proteína e o tensoativo. No entanto, com íons menores como Na^+ , esse efeito não é verificado. Ainda, ao utilizarem $MgCl_2$, verificaram um aumento na transferência da enzima, confirmando a influência do tamanho do íon sobre a extração da enzima, pois o raio atômico do Mg^{2+} é inferior ao dos dois cátions anteriores.

Também na etapa de reextração foi analisada a influência do tipo de íon empregado. MARCOZZI *et al.* (1991) verificaram que a adição de $CaCl_2$ ao tampão fosfato 20mM pH 7,5 torna a reextração de α -quimiotripsina mais eficiente que quando usados os sais NaCl, KCl e LiCl.

Tipo de proteína

Outro fator importante nos processos de extração em sistemas de micelas reversas é a natureza da proteína, devido principalmente às interações que podem ocorrer entre ela e o tensoativo (CASTRO, CABRAL, 1988).

As interações podem até permitir a solubilização de proteínas maiores que o espaço interno das micelas reversas, não sendo encontrados dados literários que permitam definir o tamanho máximo da molécula a ser

encapsulada por elas. O caráter hidrofílico das proteínas de alta massa molar é relevante na formação das micelas reversas, pois favorece a formação de uma camada de tensoativo ao seu redor e possibilita a sua transferência para o interior da micela (CASTRO, CABRAL, 1988).

Por outro lado, a proteína pode apresentar caráter hidrofóbico. Neste caso, as interações predominantes são as hidrofóbicas. Tais proteínas não obedecem ao mesmo comportamento observado para as hidrofílicas e podem, inclusive, ser extraídas em pH, tanto acima quanto abaixo do pI com força iônica elevada (PIRES *et al.*, 1996). Como por exemplo pode-se citar a taumatina que apresenta 100% de transferência pelo sistema AOT/isooctano mesmo em valores de pH acima do pI e força iônica entre 0,3 e 0,8 M (ANDREWS *et al.*, 1994).

Com relação à reextração de proteínas hidrofóbicas, podem surgir problemas com a recuperação, pois o processo pode tornar-se irreversível, uma vez que essa característica da molécula possui afinidade com a cauda do agente tensoativo. Nesse caso, o uso de um álcool polar, como por exemplo o etanol, surge como alternativa para auxiliar no rompimento das interações hidrofóbicas entre a proteína e o tensoativo (PIRES *et al.*, 1996).

Temperatura

A temperatura também é um fator de importância na absorção de proteínas pela micela, pois sua capacidade máxima de absorção depende dessa variável. Dentro de uma determinada faixa de temperatura, as micelas reversas são formações estáveis, o que favorece a absorção de moléculas. Segundo LUISI *et al.* (1988), a presença de enzimas no interior da micela a temperaturas mais elevadas vai depender mais da sua termoestabilidade do que da capacidade de absorção da micela. Em temperaturas inferiores a uma faixa ótima, as micelas encolhem e perdem sua capacidade de absorção. PESSOA-JR. VITOLO (1998^b), em trabalhos de extração da enzima inulinase, constataram que o tamanho da micela reversa é dependente da temperatura e que na faixa de 5 a 45°C as micelas reversas são formações estáveis e podem favorecer a absorção desta enzima. Os autores verificaram, ainda, que acima

de 45°C a micela reversa continuou estável e com capacidade de englobamento, porém a enzima foi desnaturada.

Tensoativo

O tipo de tensoativo influencia na transferência da proteína para o interior das micelas reversas devido, principalmente, às interações eletrostáticas entre o seu núcleo e a proteína. Influi também no tamanho das micelas reversas e na energia necessária para o encapsulamento de uma proteína de maior tamanho quando existe uma força de atração ou repulsão elevada entre os núcleos do tensoativo (AIRES-BARROS, CABRAL, 1991). Estes autores, em estudos de extração de amiloglicosidase utilizando o sistema micelar TOMAC/isooctano/1-octanol, alcançaram resultados de recuperação que variaram entre 20 e 30% após a reextração da enzima. No entanto, quando o sistema foi substituído por CTAB/isooctano/hexanol/butanol, os resultados chegaram a 90%.

Outro fator que afeta a recuperação de proteínas é a adição de um tensoativo não iônico em um tensoativo iônico. Um exemplo é a partição da α -amilase onde foi adicionado um tensoativo neutro ao TOMAC em isooctano (DEKKER *et al.*, 1989). Um aumento na transferência da enzima foi observado por estes autores, com o aumento na proporção do tensoativo neutro. Tal comportamento foi verificado devido à não-influência deste tensoativo na densidade de cargas das micelas reversas que possibilitou o aumento da concentração de tensoativo no sistema, e conseqüentemente no tamanho das micelas reversas, sem que houvesse aumento da sua carga total.

A concentração do tensoativo é, ainda, um fator importante no uso de sistemas de micelas reversas, por influenciar a formação destas. Existe uma concentração mínima de tensoativo necessária para formá-las, chamada *concentração micelar crítica* (CMC), e que depende de fatores como: temperatura, pressão, solvente e estrutura química do tensoativo. Os valores de CMC podem ser obtidos através das propriedades do sistema, tais como: tensão superficial, turbidez e pressão osmótica (SEOUD *et al.*, 1999). No entanto, como não são precisos, os valores de CMC podem ser expressos

através de intervalos (CASTRO, CABRAL, 1988; KADAM, 1986). A Figura 2.21, ilustra a evolução do sistema formado por tensoativo e solventes (ROH), levando à formação de sistemas de micelas reversas.

Figura 2.21 - Evolução da Formação de Estruturas no Sistema de Micelas Reversas (Adaptado de SEOUD *et al.*, 1999).

O aumento da concentração de tensoativo provoca o aumento no tamanho das micelas, aumentando a transferência de proteínas para o interior destas. Estudos de extração de α -amilase tiveram os resultados de recuperação melhorados com o aumento da concentração de tensoativo (TOMAC) de 0,01 para 0,04 M. As hipóteses levantadas para explicar esse aumento na recuperação da enzima foram que o aumento da concentração de tensoativo pode alterar tanto o número como o tamanho das micelas reversas formadas (BRANDANI *et al.*, 1993; AIRES-BARROS, 1991). Existe no entanto, um limite para a concentração de tensoativo no sistema; concentrações muito elevadas dificultam a etapa de reextração da proteína, pois fortes interações eletrostáticas entre a proteína e o tensoativo provocam redução nos valores de recuperação.

Tamanho das micelas

O parâmetro que melhor expressa o tamanho das micelas reversas e as propriedades físico-químicas da água solubilizada no seu interior é o W_o ("water in oil"). Esta variável, que exprime a relação entre a concentração molar de água e a concentração de tensoativo (LUISI *et al.*, 1988), é de suma importância no sistema, pois determina o tamanho das micelas reversas e também o número de moléculas de tensoativo por micela reversa (CASTRO, CABRAL, 1988; AIRES-BARROS, 1991).

Mudanças no valor de W_o podem influenciar a partição de proteínas, uma vez que a quantidade de água no interior das micelas reversas interfere nas interações eletrostáticas entre proteína e tensoativo. Além disso, afeta a estabilidade da proteína quando a quantidade de água é pequena, pois as propriedades e densidades de cargas desta água são alteradas, podendo ocasionar modificações na proteína e influenciando em seu desempenho (KRIEGER, 1995; KADAM, 1986).

O valor do W_o pode ser maior, quanto maior for a concentração de proteínas, pois a quantidade de proteína extraída é proporcional à quantidade

de água solubilizada. Se o valor de W_0 diminui, a fração de micelas reversas menores que a proteína aumenta, o que minimiza a solubilização das moléculas de proteína. Com o aumento de W_0 essa fração aumenta e com isso o sistema é capaz de armazenar proteínas maiores (ISHIKAWA *et al.*, 1992).

2.4 Enzimas

As enzimas são proteínas que catalisam com grande eficiência diversas reações. Elas desempenham um importante papel funcional em alimentos e medicamentos, assim como em sistemas biológicos. O uso crescente desses catalisadores em processos industriais deve-se à alta sensibilidade e especificidade de suas reações químicas, bem como ao avanço das pesquisas em genética, somada à tecnologia de processos fermentativos, na área de produção de enzimas (HALL, 1996). Segundo VITOLO, ROCHA (1998), a utilização de enzimas em escala industrial é de fundamental importância, devendo ser analisada, no entanto, a relação custo/benefício.

Dentre as inúmeras enzimas de interesse industrial algumas foram selecionadas para a realização dos estudos de extração líquido-líquido e que fazem parte deste trabalho. São elas: xilanase, β -xilosidase, xilose redutase e xilitol desidrogenase, hexoquinase, glicose-6-fosfato desidrogenase, glicose oxidase. A seguir é apresentada uma breve revisão sobre cada uma das enzimas deste trabalho.

Enzimas Xilanolíticas: Xilanase e β -Xilosidase

As xilanases têm como substratos naturais as hemiceluloses, geralmente localizadas na lamela média das plantas em toda a extensão da fibra, intimamente associadas à celulose (SUNNA, ANTRANIKIAN, 1997; DEKKER, 1985; WOODWARD, 1984; JANES, 1969). A forma estrutural de hemicelulose mais comumente encontrada na parede celular de plantas terrestres é a xilana, representando mais de 30% de seu peso seco (JOSELEAU *et al.*, 1992). As xilanas são compostas de resíduos de ligações $\beta(1-4)$ -D-xilopiranosídicas, sendo que a maioria se apresenta na forma de

heteropolissacarídeos, contendo diferentes grupos substituintes nas cadeias centrais e laterais. Os substituintes mais comuns encontrados na cadeia central das xilanas são os grupos acetil, arabinosil e glucuronosil. Homoxilanas, por outro lado, consistem exclusivamente de resíduos de xilosil e não são muito comuns na natureza, mas foram isoladas de gramíneas e talos de tabaco (PULS, POUNTANEN, 1989; BIELY, 1985).

A estrutura da hemicelulose determina a composição do sistema xilanolítico necessário para sua total hidrólise (COUGHLAN, HAZLEWOOD, 1993). Por exemplo, as xilanases hidrolisam hemiceluloses do tipo xilana enquanto que mananases hidrolisam hemiceluloses do tipo manana (galactomanana ou glicomanana). O sistema enzimático necessário para degradação de xilanas consiste de uma mistura de endo e exo enzimas, sendo:

- a) endo- β -1,4-D-xilanases: enzimas que atuam hidrolisando as ligações glicosídicas do tipo β -(1,4) dentro da cadeia de hemicelulose e produzindo grandes quantidades de xilo-oligossacarídeos substituídos e não substituídos de diversos tamanhos;
- b) exo- β -1,4-D-xilanases: enzimas que atuam removendo somente unidades de xilose a partir das extremidades não redutoras da cadeia de xilana;
- c) β -xilosidases: enzimas que degradam os oligossacarídeos liberados na hidrólise das ligações glicosídicas pelas endo-enzimas (BIELY, 1985).

As xilanases podem ser utilizadas na indústria de alimentos na clarificação de sucos e vinhos (BIELY, 1985), na fabricação de pães, visando aumentar seu volume e melhorar a textura da casca e do miolo (MUTSAERS, 1991) e na etapa de filtração da cerveja, rompendo sólidos em suspensão (VAN DER BROECK *et al.*, 1990). Xilanases adicionadas à ração para aves e suínos, aumentam sua digestibilidade (BRICE, MORRISON, 1991). Há também o interesse em utilizá-las para produção de xilose, xilobiose e xilo-oligômeros que podem ser empregados como insumos para obtenção de xilitol, ácido láctico ou proteína microbiana, por via fermentativa (PESSOA JR. *et al.* 1997; GILBERT *et al.*, 1992; WONG *et al.*, 1988). Atualmente, a aplicação mais promissora de

xilanases é na indústria de papel e celulose na etapa de branqueamento de polpas de celulose (VIKARI *et al.*, 1994). Isso possibilita a redução de 20 a 30% da quantidade de agentes clorados, diminuindo a agressão ao ambiente causada por tais agentes (MILAGRES, DURAN, 1992). Constitui uma alternativa para remoção da lignina residual que confere à polpa uma cor escura.

A poluição do meio ambiente tornou-se assunto de grande interesse público em todo o mundo, pois tanto países desenvolvidos quanto aqueles em desenvolvimento vêm sendo afetados por problemas ambientais resultantes do crescimento econômico acelerado, em consequência da exploração dos recursos naturais. É inegável a urgência de se adotarem medidas de prevenção e controle da poluição, a fim de que sejam evitados danos cada vez maiores e, possivelmente irreparáveis. Tais medidas, freqüentemente são definidas em termos da melhor tecnologia disponível, cuja determinação depende de dois fatores essenciais: informação disponível e condições econômicas. Dentro deste contexto, as enzimas xilanolíticas exercem papel de destaque.

Xilose Redutase e Xilitol Desidrogenase

A xilose redutase e a xilitol desidrogenase são as enzimas-chave na produção de xilitol por leveduras, ou por processos enzimáticos, e a via metabólica que as envolve está representada na Figura 2.22. Ambas requerem cofator (NADPH, NADH, NAD^+ e NADP^+), e exibem diferentes especificidades com relação a estes, sendo que as reações iniciais do metabolismo de xilose por leveduras são limitadas em diferentes graus devido à dupla especificidade da xilose redutase por NADPH e NADH (BRUINENBERG *et al.*, 1984, ROSA, 1996).

Figura 2.22 - Via metabólica da redução de xilose a xilitol e da oxidação de xilitol a xilulose (ROSA, 1996)

O xilitol, adoçante não cariogênico, açúcar alternativo para diabéticos e obesos vem sendo comercialmente produzido por via química na Finlândia, a partir de materiais lignocelulósicos ricos em xilose (HYVÖNEN *et al.*, 1982, MAKINEN, 1976, EMODI, 1978, PEPPER, OLINGER, 1988). A sua lenta absorção e entrada nas vias metabólicas, independentemente da presença de insulina e sem a flutuação rápida do nível de glicose, garante ao xilitol o uso como adoçante para diabéticos (BÄR, 1986). Neste aspecto, esse açúcar-álcool é comparável ao sorbitol e outros carboidratos que são absorvidos lentamente. Extensivas experiências clínicas e laboratoriais têm mostrado que o único efeito colateral do xilitol é a possibilidade de uma diarreia osmótica depois de doses orais relativamente altas (20 a 30 g) em indivíduos não adaptados (EMODI, 1978).

O principal interesse em xilitol, portanto, centra-se no seu uso potencial como adoçante alternativo. Em contraste a outros adoçantes alternativos não calóricos, tal como a sacarina, o xilitol possui muitas propriedades similares às da sacarose. Dissolve facilmente em água, é tão doce quanto a sacarose, aproximadamente duas vezes mais doce que o sorbitol e aproximadamente três vezes mais doce que o manitol (PEPPER, OLINGER, 1988).

A utilização de xilitol na profilaxia de cáries dentárias vem sendo amplamente estudada nas últimas décadas. A queda do pH na superfície dos dentes, uma das condições concorrentes para o aparecimento de cáries, não acontece após lavagem bucal com solução de xilitol a 10%, enquanto que, com solução de sacarose na mesma concentração, o pH cai de 6,3 para 4,0. Não foi verificada a presença de microrganismos causadores de cáries (*Streptococci*) na saliva e na placa dentária, quando o xilitol foi fornecido como único adoçante para voluntários (MANZ *et al.*, 1973).

Além da baixa cariogenicidade, a ocorrência de remineralização de cáries já existentes foi verificada por MAKINEN (1979) em indivíduos que se alimentaram exclusivamente de xilitol como açúcar. O aumento do fluxo de saliva e a manutenção de seu pH entre 7,2 e 7,8, decorrentes da dieta a que foram submetidos os voluntários, foram apontados como fatores contribuintes para que os mecanismos naturais de defesa da saliva pudessem reparar as áreas em princípio de desmineralização (MANZ *et al.*, 1973).

Estudos do papel do xilitol como **substituto** do açúcar em dietas de emagrecimento apontam para uma série de fatores que indicam a sua eficácia nesta função. Sua comprovada propriedade de causar uma liberação mínima de insulina, em comparação com outros carboidratos, diminuindo, assim, a sensação de fome, é um destes fatores. Alguns trabalhos indicaram, ainda, que o xilitol reduz o nível de ácidos graxos livres no sangue e contribui menos para a formação de tecido gorduroso quando comparada com uma quantidade equivalente, em poder adoçante, de sacarose (MANZ *et al.*, 1973).

O Xilitol pode, portanto, ser aplicado como única fonte adoçante ou em conjunto com outros adoçantes no preparo de produtos de confeitaria para crianças e diabéticos (YLIKAHRI, 1979). Pode ser usado também em produtos farmacêuticos e higiene oral (PEPPER, OLINGER, 1988).

Enzima Hexoquinase

As enzimas que catalisam a fosforilação da glicose tiveram seu estudo enfatizado a partir de 1927 quando Meyerhof obteve, a partir de extratos de levedura, um ativador capaz de restaurar a capacidade de fermentar D-glicose nos extratos de músculo envelhecidos (RODRIGUES, 1987). VON EULER, ADLER e LUTWAK MANN, MANN, citados por RODRIGUES (1987), esclareceram esse problema ao descobrir em extrato de levedura uma enzima capaz de transferir fosfato de adenosina trifosfato (ATP) para hexoses. Essa enzima foi então inicialmente denominada "heterofosfatase" e, posteriormente, hexoquinase (HK).

A enzima glicolítica hexoquinase (ATP: D-hexose 6-fosfotransferase, E.C. 2.7.1.1) é uma enzima chave no metabolismo de carboidratos, sendo classificada bioquimicamente como uma transferase, catalisando a conversão de hexoses, tais como: D-glicose, D-frutose e D-manose em hexose 6-fosfato (BERGMEYER, 1983; STRYER, 1992), conforme reação mostrada na Figura 2.23.

Figura 2.23. Reação envolvendo a enzima hexoquinase.

Na reação apresentada na Figura 2.23 é necessária a presença de íons bivalentes como cofatores metálicos da HK, sendo o íon de maior eficiência para esta catálise o Mg^{2+} (BERGER *et al.*, 1946; KUNITZ, Mc DONALD, 1946).

A enzima HK é de fundamental importância no controle da repressão catabólica (ENTIAN, ZIMMERMANN, 1980; BAILEY, WOODWORD, 1984), assim como no mecanismo de transporte da glicose através da membrana citoplasmática (TAKEDA, 1981; BISSON, FRAENKEL, 1983) e é encontrada, em leveduras, predominantemente solubilizada no citoplasma (KOVÁK *et al.*, 1986).

Hexoquinases de diferentes fontes (microrganismo, plantas e animais) vêm sendo estudadas e dessas, as mais bem caracterizadas foram as de leveduras e as de mamíferos. Porém, independentemente de suas origens, as hexoquinases catalisam a mesma reação com propriedades cinéticas e estruturais características, apresentando diferentes especificidades com relação aos carboidratos que fosforilam e divergindo quanto à afinidade e à velocidade de fosforilação (FROMM, ZEWE, 1962).

Em leveduras, existem três isoenzimas que fosforilam hexoses na posição 6, denominadas: hexoquinase P-I, também conhecida como hexoquinase a; hexoquinase P-II, ou hexoquinase b (COLOWICK, 1973); e glicoquinase (MAITRA, 1985). Estas enzimas apresentam especificidades diferentes quanto às hexoses que utilizam como substrato.

Tanto a hexoquinase P-I como P-II podem utilizar grande variedade de hexoses, diferenciando quanto à utilização de certos substratos específicos, como frutose. Diferem quanto à mobilidade eletroforética, sendo também sorologicamente distintas (COLOWICK, 1973). A glicoquinase de levedura já é

mais específica, utilizando preferencialmente substratos como a manose e a glicose (MAITRA, 1985).

As hexoquinases P-I e P-II foram descritas como dímeros, embora ambas sejam prontamente dissociadas em monômeros de aproximadamente 50 kDa pela adição de glicose, ou pela elevação do pH ou da força iônica (COLOWICK, 1973). A glicoquinase de levedura é um dímero, com massa molar aproximada de 51 kDa por subunidade (MAITRA, 1985).

Como apresentado na Figura 2.24, a estrutura da HK de levedura é uma cadeia polipeptídica enrolada como uma estrutura bilobular com uma fenda em seu meio. Acredita-se que a cinética da enzima obedeça a um mecanismo randômico, mas as maiores evidências indicam que o mecanismo é ordenado, onde a ligação da glicose resulta em um estreitamento desta fenda, permitindo a interação do MgATP no sítio ativo, com liberação do ADP e da glicose-6-fosfato (MAITY, JARORI, 1997; PURICH *et al.*, 1973).

Figura 2.24. Ilustração, em escala, da molécula de água, glicerol, glicose, e uma hexoquinase idealizada. Note os dois domínios na estrutura da hexoquinase (Figura-a), entre o qual o sítio ativo está localizado. A ligação da glicose induz uma mudança conformacional na hexoquinase. Os dois domínios estreitam ao mesmo tempo, criando um sítio catalítico (Figura-b). A área sombreada em (b) representa a presença do solvente que torna a região da fissura do sítio ativo inacessível quando a enzima se encontra no complexo enzima substrato. (GARRETT, GRISHAM, 1995).

Além da importância em estudos bioquímicos, a hexoquinase é utilizada em métodos analíticos para medida dos teores de glicose, frutose, manose,

ATP (BOROSS *et al.*, 1987) e da atividade enzimática da creatina-quinase (BERGMEYER, 1983). Como a HK possibilita a determinação de teores de glicose na presença de frutose, torna-se por isso uma importante ferramenta em indústria de vinho e suco de frutas para a detecção de açúcares ilegais adicionados nos produtos finais (WHITAKER, 1991). Outra aplicação de grande importância tecnológica é a rápida determinação da concentração de frutose em amostras com glicose utilizando eletrodo condutivo contendo HK imobilizada (AKAD. WISS. DDR, 1990).

Glicose 6-Fosfato Desidrogenase

A enzima G6PDH (Figura 2.25) é a primeira enzima do processo oxidativo da via pentose-fosfato convertendo a glicose-6-fosfato a 6-fosfogliconato, sendo classificada bioquimicamente como oxidoredutase. Esta enzima é de grande importância para a sobrevivência das células uma vez que é responsável pela manutenção de um nível adequado da coenzima reduzida NADPH (SEVERO, 1979) e participa da regulação do ciclo das pentoses. A necessidade celular por G6PDH está relacionada ao fornecimento de NADPH e ribose-5-fosfato. O NADPH é usado em biossínteses redutoras, enquanto que a ribose-5-fosfato é usada na síntese de DNA e RNA. Esta enzima é amplamente encontrada na natureza, estando presente em quase todos os tecidos animais e microrganismos.

A deficiência de G6PDH resulta de diferentes pontos de mutações no gene que a codifica e é a enzimopatia mais comum em humanos, pois afeta 400 milhões de pessoas no mundo. Em Hong Kong e no sul da China, 4-6% da população masculina são deficientes em G6PDH. A deficiência da enzima causa anemia hemolítica crônica e algumas doenças em recém nascidos (ROWLAND *et al.*, 1994; COSGROVE *et al.*, 1998; AU *et al.*, 2000; BERGMEYER, 1983; STRYER, 1992).

Esta enzima pode ser usada de forma eficiente e precisa para identificar e quantificar moléculas de glicose liberadas após hidrólise do amido em sucos, mesmo na presença de pedaços de frutas, compostos coloridos, elevadas concentrações de sacarose e outros tipos de polissacarídeos (CHATEL *et al.* 1996). Além disso a G6PDH pode ser empregada para a determinação de

glicose em sistema de reator em fluxo contínuo, pois o NADPH formado pela reação enzimática pode ser facilmente detectado espectrofotometricamente ou fluorometricamente (MORI *et al.*, 1999; FREY *et al.*, 1999). Essa enzima pode, ainda, detectar baixíssimos níveis de estreptavidina e biotina por ensaios de bioluminescência em reações de hibridização de DNA, sem perda da atividade enzimática (TEROUANNE *et al.*, 1989; BALAGUER *et al.*, 1989). Como biossensor, a G6PDH pode monitorar rapidamente a concentração de G6P no sangue com menor custo e consumo de tempo do que os métodos tradicionais como cromatografia e espectroscopia. Esse monitoramento é importante porque ele pode refletir diretamente a atividade relativa da G6PDH na via metabólica e tem sido utilizado por possibilitar o controle de G6PDH em eritrócitos humanos e em células de fígado de ratos (BASSI *et al.*, 1999).

De acordo com alguns catálogos comerciais, por exemplo a SIGMA®, a G6PDH pode ser obtida de diversas fontes como levedura de panificação, *Torula*, *Bacillus stearothermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides*, adrenais de bovinos e eritrócitos humanos (LEVY, 1988).

A massa molar da G6PDH de *Leuconostoc mesenteroides* é de aproximadamente 104.000 Da e é composta por dois monômeros de aproximadamente 55.000 Daltons. O pH ótimo de atividade da enzima é 7,8 e o ponto isoelétrico é 4.6 (OLIVE, LEVY, 1975; ISHAQUE *et al.* 1974; ROWLAND *et al.*, 1994; COSGROVE *et al.*, 1998). Em leveduras, a massa molar da sub-unidade molecular está em torno de 56 kDa e é altamente específica para NADP+.

Figura 2.25 – Representação tridimensional da G6PDH

A G6PDH foi purificada com auxílio de coluna cromatográfica com dietilaminoetil celulose, gel de fosfato de cálcio, dietilamino etil Sephadex e carboximetil Sephadex, conseguindo um rendimento de 50%. A massa molar da enzima purificada foi relatada como sendo 240.000 Da e na ausência de NADP⁺, a G6PDH dissocia-se em sub-unidades ativas de menor tamanho. A enzima nativa pura é estável durante muitas semanas tanto a 0°C como a 20°C. Pode, ainda, ser deixada por muitas horas a 40°C, sem apreciável perda de atividade.

Glicose-oxidase

A glicose-oxidase (E.C.1.1.3.4) é uma das enzimas que pertence à classe das oxirredutases. Essa enzima pode ser obtida do cultivo de fungos como os *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. e, normalmente, contém como impurezas as enzimas catalase, invertase, maltase, amilase, fosfatase e celulase. Catalisa a reação de oxidação da glicose a ácido glicônico e peróxido de hidrogênio (TREVISAN, 1993).

Figura 2.26 – a) reação catalisada pela glicose-oxidase (GOD),
b) regeneração do FAD.

A glicose-oxidase de *Aspergillus niger* contém dois moles de FAD (adenina dinucleotídeo flavina) ligados covalentemente à proteína e sua massa molar varia de 150 a 160 kDa. A enzima consiste de duas subunidades de cadeias polipeptídicas idênticas (80kDa cada uma) covalentemente ligadas por pontes de dissulfeto. Cada subunidade contém um mol de íon ferro e um mol de FAD (flavina adenina dinucleotídeo). A molécula apresenta cerca de 74% (p/p) de proteína, 16% (p/p) de açúcares neutros e 2% (p/p) de aminopolissacarídeos (WORTHINGTON BIOCHEMICAL CORPORATION, 1999).

A glicose-oxidase pode ser usada na proteção de alimentos, pois atua como anti-oxidante uma vez que remove oxigênio de refrigerantes, vinhos, molhos, alimentos desidratados e enlatados em geral. Ela pode ser usada para

a remoção de glicose de ovos antes da desidratação, de forma a impedir o escurecimento e sabor desagradável e quando misturada à catalase, aumenta a estabilidade de frutos do mar e peixes pois o ácido glicônico formado diminui o pH do meio e inibe o crescimento microbiano (BAILEY, OLLIS, 1986). Essa enzima pode ser empregada, por processos enzimáticos, para produzir ácido glicônico, que pode ser utilizado como complexante de íons metálicos em alimentos. A enzima pode, também, ser utilizada na fabricação de papéis de teste para controle de diabetes e testes de fertilidade, na análise automatizada de glicose através de medida espectrofotométrica ou através de um sensor de oxigênio (TREVISAN, 1993). A análise da concentração de glicose, com o auxílio da glicose oxidase, em amostras de sangue para detecção de diabetes é um dos ensaios mais freqüentemente realizados em laboratórios clínicos.

Na literatura foi encontrado que o pH ótimo de atividade da glicose-oxidase de *Aspergillus niger* encontra-se em 5,5 e o ponto isoelétrico em 4,2 (PAZUR, 1966). O pH de estabilidade máxima da enzima encontra-se entre 4,0 e 6,0, porém podem ser encontradas preparações estabilizadas para utilização em pH 2,5. A glicose-oxidase é muito instável acima de 50°C, e perde totalmente a atividade em poucos minutos a 65°C. Substâncias inorgânicas como os sais de metais pesados como Ag^+ , Hg^+ e Cu^{2+} são inibidores e o FAD, que é um cofator da enzima, é inibido por vários dinucleotídeos. Substâncias orgânicas, como p-cloromercuriobenzoato e D-arabinose, também inibem a glicose-oxidase (TREVISAN, 1993).

3 Retrospectiva dos Trabalhos Realizados

A seguir serão apresentados os principais resultados obtidos por alunos de Mestrado e Doutorado que estudaram, ou que ainda estão estudando, os processos de Extração Líquido-Líquido de Enzimas. Alguns resultados importantes para melhor compreensão dos estudos de extração, obtidos por alunos que não trabalharam diretamente com esse processo de purificação de enzimas, também estão sendo aqui apresentados.

Nesta retrospectiva está sendo dada uma ênfase especial aos resultados obtidos por esses alunos aproveitados pelos trabalhos seguintes e que, conseqüentemente contribuíram para que fossem aplicados ao maior número possível de enzimas. No item "Conclusões e Considerações" estão sendo apresentadas as conclusões desta retrospectiva em conjunto com os resultados obtidos pelo autor com os estudos de Extração Líquido-Líquido em Sistemas Micelares.

Os itens deste capítulo foram divididos, primeiramente, em função do processo de extração e, dentro de cada processo, houve a sub-divisão por ordem cronológica de execução dos trabalhos. Sendo assim, a disposição é a seguinte:

1) ***Extração Líquido-Líquido em Sistemas Poliméricos de Duas Fases Aquosas:*** Sílvia Aparecida da Costa (Mestrado de 03/1996 a 07/1998), Daniel Pereira da Silva (Mestrado de 07/1998 a 08/2000), Marcela Zanella Ribeiro (Mestrado de 03/1999 com previsão de defesa para 03/2001); e Maria Aparecida de Souza (Mestrado de 03/1999 com previsão de defesa para 03/2001);

2) ***Extração Líquido-Líquido em Sistemas Micelares Reversos:*** Eliana Maria Gonçalves Rodrigues (Mestrado de 03/1995 a 07/1997), Ely Vieira Cortez (Mestrado de 03/1996 a 02/1998), Francislene Andréia Hasmann (Mestrado de 07/1996 a 02/1999), Ely Vieira Cortez (Doutorado de 03/1998 com previsão de defesa para 02/2002), Francislene Andréia Hasmann (Doutorado de 03/1999 com previsão de defesa para 02/2003), Luis Fernando Peffi Ferreira (Mestrado de 03/2000 com previsão de defesa para 02/2002).

Extração Líquido-Líquido em Sistemas Poliméricos de Duas Fases Aquosas

3.1 Sílvia Aparecida da Costa

Neste trabalho de mestrado utilizou-se o SDFA para extrair a **enzima extracelular** xilanase produzida pelo **fungo** *Penicillium janthinellum* utilizando o sistema **PEG/fosfato** com auxílio de **planejamento estatístico**.

Por ser este o primeiro de um conjunto de trabalhos sobre extração líquido-líquido em sistemas poliméricos de duas fases aquosas foi necessário, inicialmente, traçar as curvas binodais dos diagramas de fases do sistema PEG/água/fosfato para os sistemas previstos a serem utilizados, ou seja, para diferentes massas molares de PEG e valores de pH. As curvas foram traçadas nas condições apresentadas na Tabela 3.1.1.

Tabela 3.1.1 – Condições utilizadas na construção das curvas binodais do SDFA utilizando PEG/água/fosfato.

pH	Massa Molar do PEG			
	600	1500	4000	6000
5,0			X	X
6,0		X		
6,5	X	X	X	X
7,0	X	X	X	X
8,0	X	X	X	X
9,0	X	X		X

Através das curvas binodais pôde-se verificar que o pH e a massa molar do PEG eram variáveis importantes na formação dos sistemas de duas fases aquosas, pois influenciavam a *posição dessas curvas*. Através desses estudos foi possível verificar que com a diminuição do valor do pH e com o aumento da massa molar do PEG havia deslocamento das curvas binodais para a esquerda em sentido às baixas concentrações de PEG e de fosfato de potássio. As curvas binodais deste trabalho foram similares às descritas na literatura que

foram obtidas por diferentes métodos (ALBERTSSON, 1986; VERNAU, KULA, 1990). Isso indicou que o método da titulação empregado neste trabalho para traçar as curvas binodais foi eficiente.

Para complementar esse estudo foram traçadas, também, curvas binodais utilizando o meio fermentado contendo o complexo xilanolítico produzido pelo fungo *Penicillium janthinellum*, em substituição à água do sistema. As curvas binodais assim obtidas permaneceram deslocadas para a esquerda em relação ao sistema contendo água. Isso possibilitou a separação de fases, e, conseqüentemente, a extração de enzimas em concentrações de PEG e fosfato menores que os sistemas compostos por água.

Na Figura 3.1.1 apresenta-se um exemplo de curvas binodais construídas com PEG/água/fosfato em diferentes massas molares de PEG e na Figura 3.1.2 um exemplo comparativo entre curvas binodais construídas com PEG/meio fermentado/fosfato e com PEG/água/fosfato.

Figura 3.1.1 - Curvas binodais de sistemas com massas molares 600, 1500, 4000 e 6000 em pH 8,0.

Figura 3.1.2. Curvas binodais para o sistema de duas fases aquosas contendo PEG/água/fosfato (A) e para o sistema contendo PEG/meio fermentado/fosfato utilizando PEG 6000 em pH= 8,0.

As curvas binodais obtidas neste trabalho foram utilizadas por todos os trabalhos sobre SDFA realizados posteriormente. Além disso, a constatação de que a substituição da água por um meio contendo enzimas desloca a curva binodal em sentido de menores concentrações de PEG e sal foram úteis para interpretar os resultados de algumas extrações realizadas neste e em trabalhos posteriores. Em síntese, as curvas binodais obtidas neste trabalho foram úteis para os trabalhos seguintes, na medida em que foram utilizadas como uma aproximação e não como curvas reais.

Após a etapa de construção das curvas binodais, iniciaram-se os estudos para serem definidas as melhores condições de extração e purificação da enzima xilanase por SDFA. Para isso utilizou-se um *Planejamento Experimental Estatístico* para otimizar o processo uma vez que havia muitas variáveis que simultaneamente interferiam na extração. De acordo com esse procedimento estatístico foi possível avaliar como as variáveis independentes (pH, massa molar e concentração do PEG, concentração de fosfato, e concentração de

NaCl) e suas interações governavam o coeficiente de partição (K) da xilanase e das proteínas totais no processo de extração líquido-líquido em sistemas de duas fases aquosas. A escolha dos níveis das variáveis do planejamento estatístico foi feita com base nos dados de literatura sobre a extração líquido-líquido em SDFA e sobre a estabilidade da enzima em função do pH.

Os estudos estatísticos mostraram que a concentração de PEG (%PEG) e concentração de NaCl (%NaCl) foram as variáveis que mais afetaram o valor de K. Com isso foi possível estabelecer um modelo matemático empírico polinomial de segunda ordem (Equação 3.1.1) que expressasse a variação do valor de K em função dessas variáveis significativas e, ainda, que construísse uma superfície de resposta (Figura 3.1.3).

$$Y = 2,18 - 0,18X_3 + 0,08 X_5 - 0,11X_3^2 \quad (\text{Eq. 3.1.1})$$

Sendo: Y = K (coeficiente de partição)

X_5 = %NaCl

X_3 = % PEG

Através da Figura 3.1.3, pode-se verificar o contorno tridimensional da superfície de resposta referente ao modelo representado pela Equação 3.1.1 mostrando os valores de K como uma função da variável X_5 (%NaCl) e X_3 (% PEG).

O modelo matemático obtido foi testado experimentalmente utilizando-se as condições ótimas de extração (PEG 4000 a 8,83%, pH=7,0, 10% de fosfato de potássio e NaCl = 6,02%) indicada pelo planejamento estatístico. O coeficiente de partição (K) obtido experimentalmente foi igual a 2,21 enquanto que o valor previsto pelo modelo foi igual a 2,33. Esses resultados indicaram que o modelo previsto foi adequado ao processo uma vez que o valor do coeficiente de partição previsto pelo modelo foi próximo ao obtido experimentalmente

A extração por SDFA realizada no ponto ótimo previsto pelo modelo proporcionou uma recuperação da enzima xilanase de 80% na fase superior do sistema com um aumento de pureza de 1,34 vezes. A eletroforese feita de amostras retiradas das duas fases obtidas mostrou que as moléculas de proteínas de elevadas massas molares (60 a 100 kDa) permaneceram

totalmente na fase inferior do sistema, enquanto que as proteínas de baixas massas molares (14 a 24 kDa), como é o caso da xilanase, permaneceram na fase superior do sistema (Figura 3.1.4).

Figura 3.1.3 - Superfície de resposta para o coeficiente de partição K da xilanase em função das variáveis X_3 (%PEG) e X_5 (%NaCl) nas seguintes condições: PEG 4000, pH=7,0 e 10% de fosfato de potássio.

	1	2	3	4	5
116 kDa	—		—		—
97 kDa	—		—		—
66 kDa	—	—	—		—
45 kDa	—	—	—		
36 kDa		—			
29 kDa	—	—	—		
24 kDa		—	—	—	
20 kDa		—	—	—	
14 kDa		—	—	—	

Figura 3.1.4 - Eletroforese (SDS-PAGE) para a condição otimizada de extração líquido-líquido da xilanase em sistemas de duas fases aquosas. Linha 1 - marcadores de massas molares (116 kDa, 97 kDa, 66 kDa, 45 kDa); linha 2 - marcadores de baixas massas molares (66 KDa, 45 kDa, 36 kDa, 24 kDa e 20,1 kDa, 14 kDa); linha 3 - Caldo fermentado inicial; linha 4 - fase superior do sistema; linha 5 - fase inferior do sistema.

Os resultados obtidos nessa dissertação de mestrado mostraram que o planejamento estatístico pode ser uma importante ferramenta na definição das condições ótimas de extração e purificação por SDFA de enzimas extracelulares produzidas por um fungo. Porém, esse procedimento mostrou algumas limitações que passaram a ser consideradas em estudos posteriores de extração por SDFA. A limitação mais visível foi de que as condições propostas para a extração, como aquelas que combinam as variáveis em seus valores máximos e mínimos, proporcionaram, muitas vezes, sistemas monofásicos (no caso de baixas concentrações de PEG e de fosfato, além de baixas massas molares de PEG) ou sistemas saturados (no caso de elevadas concentrações de PEG e de fosfato associadas a elevadas massas molares de PEG). Para se contornar esse problema, nos estudos de extração que se seguiram com outras enzimas, estudaram-se, inicialmente, as concentrações mínimas e máximas de PEG e fosfato, para diferentes valores de pH e de massas molares de PEG, que deveriam ser consideradas no planejamento, antes de se iniciarem os estudos de extração.

Trabalhos publicados por Sílvia Aparecida da Costa

1. COSTA, S.A.; PESSOA JR, A.; ROBERTO, I.C. Xylanase Recovery: Effect of Extraction Conditions on the Aqueous Two-Phase System Using Experimental Design. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 70-72:629-639, 1998.
2. COSTA, S.A.; PESSOA JR, A.; ROBERTO, I.C. Partition of Xylanolytic Complex from *Penicillium janthinellum* by Aqueous Two-Phase System (atps). **Journal of Chromatography B**, 743:239-348, 2000.
3. COSTA, S.A.; PESSOA JR, A.; MILAGRES, A.M.F.; ROBERTO, I.C. Xylanase Recovery: Effect of Extraction Conditions on the Aqueous Two-Phase System Using Experimental Design. In: **NINETEENTH SYMPOSIUM ON BIOTECHNOLOGY FOR FUELS AND CHEMICALS**, Colorado-Springs/Colorado, 04-08 May 1997. *Program and Abstracts*.
4. CARNEIRO, H.A.; COSTA, S.M.; PESSOA JR, A. Diagramas de fases para o processo de separação em sistemas de duas fases aquosas. In. 3º

SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA FAENQUIL, Lorena/SP, 02-06/Set.96, *Programas e Resumos*, Lorena, FAENQUIL, 1996, p.24.

5. COSTA, S.A.; ROBERTO, I.C.; PESSOA JR, A. Effect of PEG, NaCl and Potassium Phosphate on the Soluble Lignin Removal of Rice Straw Hemicellulose Hydrolyzate. In: **FIFTH BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNINS AND OTHER WOOD COMPONENTS**, Curitiba, Ago-Set/97, *Programas e Resumos*, Curitiba.
6. COSTA, S. A. **Extração Líquido-Líquido de Xilanases em Sistema de Duas Fases Aquosas**. Lorena/FAENQUIL, Dissertação de Mestrado, 1998.
7. COSTA, S.A.; PESSOA JR, A.; ROBERTO, I.C. Partition of Xylanolytic Complex from *Penicillium janthinellum* by Aqueous Two-Phase System (ATPS). In: **11th INTERNATIONAL CONFERENCE ON PARTITIONING IN AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS**, 11, Golf Shores, Alabama, USA, June 27-July 2, 1999.
8. COSTA, S.A. **Recuperação de Xilanase por Extração Líquido-Líquido em Sistemas de Duas Fases**. Dissertação de Mestrado. FAENQUIL, 1998.

3.2 Daniel Pereira da Silva

Neste trabalho de mestrado utilizou-se o SDFA para extrairrem-se as **enzimas intracelulares** hexoquinase e glicose-6-fosfato desidrogenase produzida pela **levedura** *Saccharomyces cerevisiae* utilizando o sistema **PEG/fosfato**. Os estudos foram conduzidos sem auxílio de planejamento experimental, ou seja, da forma seriada.

Em função da experiência adquirida no trabalho anterior (item 3.1) e, também, pelo fato de a extração por SDFA não ter sido o objetivo principal dessa dissertação, este trabalho foi utilizado para serem obtidos alguns dados iniciais de extração das duas enzimas intracelulares anteriormente citadas e que são sensíveis a diversas variações das condições ambientais, como temperatura e pH.

Após uma ampla revisão bibliográfica, considerou-se relevante avaliar a influência duas variáveis no coeficiente de partição das enzimas: pH e massa

molar do PEG. O pH teve um destaque especial, pois o processo de extração seria aplicado para purificar duas enzimas presentes no mesmo meio, porém com diferentes pontos isoelétricos e estabilidades. A massa molar do PEG também foi escolhida para ser avaliada nesta etapa, pois havia a possibilidade de utilizar essa variável para separar uma enzima da outra e de outros contaminantes (proteínas, ácidos nucleicos, fragmentos celulares, etc...) presentes no homogeneizado celular.

Efeito da Massa Molar do PEG no coeficiente de Partição de Enzimas

De acordo com a Tabela 3.2.1 pode-se observar que para os PEGs com menores massas molares (p.ex. PEG 300 e 400 g/mol) obteve-se um valor de $K = \infty$, ou seja, 100 % das enzimas foram transferidas para a fase superior do sistema e que, para a maior massa molar (PEG 4000 g/mol), obteve-se um valor de $K \approx 0$, ou seja, ~100 % das enzimas foram transferidas para a fase inferior do sistema. No entanto, ao se extraírem-se as enzimas com auxílio de PEG 1500, o valor de K foi de 2,55 e 0,80 para a enzima HK e G6PDH, respectivamente, enquanto que o PEG 1000 proporcionou um valor de $K = \infty$ para a enzima HK e $K = 19,10$ para a G6PDH. Estes resultados confirmaram dados da literatura onde se considera que, para a maioria das proteínas, as extrações conduzidas com PEG de baixas massas molares os valores de K são mais elevados do que aqueles conduzidos com polímeros de elevadas massas molares (ALBERTSSON, 1986; LAHORE *et al.* 1996). Considerando que as outras condições de extração utilizadas nesses experimentos (pH, temperatura, concentração dos componentes, etc...) foram idênticas, supõe-se que a interação das enzimas com os diferentes PEGs é variável. De acordo com alguns autores (ATHA, INGHAM, 1981 e POLSON *et al.*, 1964 apud SARUBBO, 2000), a solubilidade de proteínas em solução de PEG pode ser interpretada em termos dos *efeitos do volume de exclusão do polímero*, ou seja, as solubilidades das proteínas são proporcionais ao volume disponível de solvente. Desse modo, quanto maior for o volume de exclusão do PEG, menor é o volume de solvente disponível para solubilizar a proteína, o que implica a diminuição de sua solubilidade na fase rica em polímero (fase superior) e

conseqüentemente uma diminuição do coeficiente de partição. Portanto, devido ao efeito do volume de exclusão, a tendência é de aumento nos coeficientes de partição com a diminuição da massa molar do PEG ou com a diminuição da massa molar da proteína. Essa propriedade do sistema pode ser aproveitada para separar enzimas de massas molares diferentes.

Tabela 3.2.1. Coeficiente de partição das enzimas HK e G6PDH (SIGMA®) obtido para diferentes massas molares de PEG.

MM PEG	Coeficiente de Partição (K)	
	HK	G6PDH
300	∞	∞
400	∞	∞
1000	∞	19,10
1500	2,55	0,80
4000	0,07	-

Efeito pH no coeficiente de Partição de Enzimas

Os coeficientes de partição (K) das enzimas HK e G6PDH, e das proteínas totais, obtidos após as extrações realizadas com células rompidas em diferentes valores de pH (3,8 a 8,8) e em diferentes sistemas (formados PEG 400, PEG 1500 e fosfato) estão apresentados na Tabela 3.2.2. Como se pode observar, o aumento do pH mostrou uma clara tendência em aumentar os coeficientes de partição das enzimas e das proteínas totais. Este fato já foi observado para várias outras proteínas, como por exemplo: α -amilase (SCHMIDT *et al.*, 1994), taumatina (CASCONI *et al.*, 1991), L-aspartase, fumarase (HUDDLESTON *et al.*, 1991). Porém, como pode também ser observado na Tabela 3.2.2, o coeficiente de partição das duas enzimas aqui testadas varia em função do pH. Isso ocorre, porque o pH influencia na carga líquida global das proteínas, fato esse que proporciona diferentes forças de interação delas com a fase superior do sistema de duas fases aquosas. É

importante ressaltar que essa propriedade do sistema também pode ser usada para, seletivamente, separar proteínas com diferentes pontos isoelétricos.

Tabela 3.2.2. Coeficientes de partição da HK e G6PDH, e de proteínas totais, obtidos após as extrações realizadas com células rompidas em função de diferentes valores de pH.

pH	PEG 400 15% Fosfato e 17,5%			PEG 1500 17,5 % Fosfato e 20 %		
	HK	G6PDH	Prot. totais	HK	G6PDH	Prot. totais
3,8	NP	NP	NP	4,7	0,49	2,7
5,0	49,9	309,6	10,5	4,7	0,47	2,5
6,0	65,4	320,4	18,9	5,1	0,46	0,7
7,0	808,0	510,0	23,6	5,8	0,45	1,2
8,0	1125,4	580,5	31,2	12,9	0,48	1,9
8,8	1310,5	690,1	31,7	65,3	0,58	2,8

NP = não houve partição entre as fases

Foi também verificado neste trabalho que as células rompidas de *Saccharomyces cerevisiae* proporcionavam um volume significativo de fragmentos que não migravam para qualquer uma das fases, ou seja, permaneciam na "interface" do sistema. Foi feito, então, um estudo para melhor compreender essa característica que era conferida pelos fragmentos celulares ao sistema de duas fases aquosas. Para isso foram feitas algumas extrações e os resultados estão apresentados na Tabela 3.2.3.

O fato de os fragmentos celulares permanecerem na interface, ou seja, não migragem junto com as enzimas para a fase superior ou inferior, proporciona a essa técnica de recuperação de enzimas a vantagem tecnológica de isolar, em uma nova região, os fragmentos celulares que precisariam, de

alguma forma, ser separados das enzimas-alvo por um outro tipo de operação unitária, tal como a filtração ou a centrifugação.

Outra importante observação foi que a formação de interface ocorreu em todos os valores de pH testados (pH de 3,8 a 8,8) e mostrou que a carga líquida total do sistema não interfere na sua formação, mas somente em seu volume.

Tabela 3.2.3. Volumes das fases (mL) obtidas após as extrações, realizadas com homogeneizado de *S. cerevisiae*, em função de diferentes valores de pH.

pH	15% Fosfato e 17,5% PEG 400			17,5 % Fosfato e 20 % PEG 1500		
	Superior	Interface	Inferior	Superior	Interface	Inferior
3,8	NP	NP	NP	3,2	1,6	3,5
5,0	5,5	0,7	2,4	2,9	1,7	3,7
6,0	5,4	1,6	1,6	3,7	0,9	3,7
7,0	5,3	1,7	1,6	3,8	0,9	3,7
8,0	5,2	1,7	1,6	3,6	1,1	3,7
8,8	5,2	1,7	1,7	3,6	1,2	3,6

NP = não houve partição entre as fases

Trabalhos publicados por Daniel Pereira da Silva

- 1 SILVA, D. P.; PESSOA-JR, A.; VITOLO, M. Effect of agitation and aeration on the production of hexokinase by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 91-93, 2001 (no prelo).
- 2 LOJUDICE, F. H.; SILVA, D. P.; ZANCHIN, N. I. T.; OLIVEIRA, C.C.; PESSOA-JR, A. Overexpression of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) in Genetically Modified *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 91-93, 2001 (no prelo)
- 3 SILVA, D.P.; PESSOA JR, A.; VITOLO, M. Influence of KLa on Hexokinase Production by *Saccharomyces cerevisiae*. In. VI SHEB - SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, Maringá/PR, *Programas e Resumos*, 06-10/Dez.99, 1999.

- 4 SILVA, D.P.; RIBEIRO, M.Z.; SOUZA, M.A.; VITOLO, M.; PESSOA-JR, A. Avaliação de Inibidores de Proteases na Estabilidade da Hexoquinase. In: **XX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**, 24-28/10/99. Salvador/BA.
- 5 SOUZA, M. A.; RIBEIRO, M. Z.; SILVA, D. P.; VITOLO, M.; PESSOA JR., A. Influência do pH na Estabilidade de Estocagem das Enzimas Hexoquinase e Glicose-6-fosfato-desidrogenase. In: **XX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**, 24-28/10/99. Salvador/BA.
- 6 RIBEIRO, M. Z.; SILVA, D. P.; PESSOA-JR, A.; VITOLO, M. Estabilidade da Glicose-6-fosfato Desidrogenase na Presença de Inibidores de Protease. In: **XX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**, 24-28/10/99. Salvador/BA.
- 7 SILVA, D.P.; VITOLO, M.; PESSOA-JR, A. Influência do Coeficiente Volumétrico de Transferência de Oxigênio (K_La) nas Características Cinéticas do Processo Fermentativo para Obtenção de Hexoquinase a Partir de *Saccharomyces cerevisiae*. In: SEMANA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA FCF/USP. 18-22/10/99, São Paulo/SP. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.35, supl.1, p.97, 1999.
- 8 SILVA, D. P. **Obtenção da Enzima Hexoquinase por Processo Fermentativo utilizando *Saccharomyces cerevisiae***. Dissertação de Mestrado. FCF/USP. 2000.

3.3 Marcela Zanella Ribeiro

Neste trabalho de mestrado utilizou-se o SDFA para extrair a **enzima intracelular** glicose-6-fosfato desidrogenase a partir de três diferentes fontes: adquirida comercialmente da SIGMA® (na forma purificada); da levedura *Saccharomyces cerevisiae* adquirida comercialmente (fermento *Fleischmann*) e da levedura *Saccharomyces cerevisiae* obtida por fermentação em condições pré-estabelecidas em nosso laboratório por SILVA (2000). Para todos os estudos foi utilizado o sistema **PEG/fosfato**.

Após a realização dos estudos anteriores, verificou-se que, constantemente, os balanços de massa do processo de extração, tanto aqueles referentes às enzimas quanto aqueles referentes às proteínas totais, não fechava em 100%. Em alguns casos esse balanço era muito superior ou inferior a esse valor e indicava a ocorrência das seguintes situações: 1) desnaturação ou inibição da enzima; 2) ativação da enzima; 3) emprego de metodologias inadequadas. Em função disso, iniciou-se este trabalho avaliando-se a estabilidade à estocagem da enzima G6PDH frente a diversas variáveis, como: pH, temperatura, tampão fosfato e PEG. Em seguida, extraiu-se a enzima pura adquirida da SIGMA® para, posteriormente, estudar-se a eficiência do processo de extração utilizando-se a fonte mais complexa da enzima, ou seja, a levedura *S. cerevisiae* rompida mecanicamente.

A partir deste trabalho começou-se, também, a utilizar-se um método indireto de avaliação da integridade da enzima após o processo de extração. Para isso determinaram-se as constantes cinéticas (K_M e V_m) e termodinâmicas (ΔG , ΔH , ΔS , E_a) da enzima antes e após a extração. Passou-se a assumir que a modificação significativa nos valores desses parâmetros indicaria que a extração estaria provocando algum tipo de alteração conformacional na enzima.

Avaliação da Estabilidade da G6PDH Frente ao pH, Temperatura, Fosfato e PEG

A Tabela 3.3.1 mostra os tempos máximos recomendados para estocagem da enzima G6PDH obtida de homogeneizado celular em diferentes condições de pH, temperatura, fosfato, PEG e inibidores de proteases. Tais resultados são positivos para o manuseio da enzima durante todo trabalho de extração em sistemas de duas fases aquosas, uma vez que a condução desse processo ocorre, em geral, em tempos inferiores a 12 horas. Observa-se, ainda, que na presença de um coquetel de inibidores de proteases e em valores de pH entre 4,5 a 9,5 pode-se estocar a enzima por até 24 horas a 26°C. Esse dado possibilita o desenvolvimento de trabalhos com essa enzima por um período de tempo suficiente pelo exigido no processo de extração. Além disso, se o

processo for conduzido sob refrigeração a 4°C, o período de estabilidade à estocagem da enzima pode, ainda, se estender para 50 horas.

Tabela 3.3.1 – Tempo de estocagem máximo recomendado para enzima G6PDH obtida de homogeneizado celular em diferentes condições de pH, temperatura, fosfato, PEG e inibidores de proteases.

Condições de Estocagem	Tempo
T = 26°C, tampão pH = 7,5, coquetel de inibidores de proteases	24 horas
T = 4°C, pH = 5,0 a 9,5, coquetel de inibidores de proteases	50 horas
T = 4°C, pH = 4,5, coquetel de inibidores de proteases	24 horas
T = 4°C, pH = 4,0, coquetel de inibidores de proteases	8 horas
T = 4°C, pH = 7,5, Fosfato a 15%, coquetel de inibidores de proteases	50 horas
T = 26°C, pH = 7,5, Fosfato a 15%, coquetel de inibidores de proteases	24 horas
T = 4°C, pH = 7,5, PEG 300, 400, 600, 1000 e 1500 a 20%, coquetel de inibidores de proteases	50 horas
T = 26°C, pH = 7,5, PEG 300, 400, 600, 1000 e 1500 a 20%, coquetel de inibidores de proteases	24 horas
T = 4°C, pH = 7,5, ácido aminocapróico	20 horas
T = 4°C, pH = 7,5, EDTA	20 horas
T = 4°C, pH = 7,5, β-mercaptoetanol	20 horas

Extração da G6PDH pura da SIGMA® por SDFA

Foi estudada a extração da enzima na forma pura para que se pudesse conhecer seu comportamento frente ao processo de extração, sem a influência de interferentes com propriedades desconhecidas, como fragmentos celulares e enzimas proteolíticas (ambos presentes no homogeneizado celular). Para isso, auxiliou-se de um planejamento experimental estatístico, que foi útil para avaliar a influência isolada de cada variável e das suas interações sobre o coeficiente de partição da enzima. O planejamento experimental foi do tipo completo 2^3

com 3 repetições no ponto central para verificar a influência da massa molar do PEG (1500, 4000 e 6000 g/mol), concentração de PEG (12,0 16,0 e 20,0 %p/p), da concentração de tampão fosfato (9,0, 12,0 e 15,0% p/p) na extração da enzima G6PDH. Fixou-se em 7,5 o valor de todas as extrações. Essas condições de extrações proporcionaram baixos coeficientes de partição da enzima, porém indicaram a importante tendência de que melhores resultados poderiam ser obtidos com a redução da massa molar do PEG. Em função disso, um novo planejamento experimental foi proposto no qual as massas molares do PEG passaram a ser de 400, 1000 e 1500 g/mol. Essa redução na massa molar do PEG exigiu a elevação das concentrações de PEG e de fosfato para que o sistema permanecesse na região bifásica do diagrama de fases. Com isso as concentrações de PEG passaram a ser de 16,0, 20,0 e 24,0 % (p/p) e de fosfato de 12,0 15,0 e 18,0% (p/p). Com esse novo planejamento experimental foi possível determinar a região ótima de extração da enzima pura, além de se definir um modelo estatístico (Equação 3.3.1) que explica a variação de K em função das variáveis significativas (concentração de PEG e concentração de fosfato) da extração e, ainda, construir uma superfície de resposta (Figura 3.3.1).

$$Y = 10,35 + 1,18.X_1 - 3,86.X_1.X_2 - 3,93.X_1^2 - 3,55.X_2^2$$

Equação 3.3.1

Sendo: Y = coeficiente de partição da enzima (K);
 X_1 = concentração de PEG;
 X_2 = concentração de tampão fosfato.

Figura 3.3.1 - Superfície de Resposta Descrita pelo Modelo da Equação 3.3.1, que Representa a Extração Líquido-Líquido em Condições Otimizadas de G6PDH pura da SIGMA® em Sistema de Duas Fases Aquosas.

O máximo valor do coeficiente de partição (K) da G6PDH, 10,5, previsto pelo modelo matemático, corresponde ao ponto definido pela concentração de PEG 400 a 24,84% e concentração de tampão fosfato de 17,58%. Ensaios foram feitos, nessas condições, com o intuito de se validar o modelo. O valor médio experimental do coeficiente de partição foi de 12,3, enquanto que o valor previsto pelo modelo de 10,5. Essa diferença foi de ~14% e, por estar dentro do erro experimental, considerou-se o modelo válido.

Após esses estudos de extração com a enzima G6PDH pura da SIGMA®, iniciaram-se os estudos de extração utilizando o homogeneizado de *S. cerevisiae*, rompido mecanicamente. As condições iniciais de extração com esse meio complexo foram aquelas otimizadas para a enzima pura.

Extração da G6PDH de Homogeneizado de S. cerevisiae por SDFA

Após terem sido feitas as primeiras extrações da enzima G6PDH com células rompidas de *S. cerevisiae* foi verificado que o sistema polimérico de duas fases aquosas apresentava alguns problemas. Dentre eles, o mais visível era a formação de um grande volume de "interface" no sistema. Em função disso, alguns estudos foram feitos para verificar a influência, no volume das interfaces, da "forma" e do "tempo" de agitação dos componentes do sistema (PEG/Sal/fragmentos) e do tempo de repouso antes da coleta das amostras obtidas após a centrifugação para separação das fases.

Analisando-se os resultados da Tabela 3.3.2 verifica-se que quando a agitação foi realizada em vórtice houve uma grande influência da massa molar do PEG no volume da interface, ou seja, para PEG 1500 o volume da interface era da ordem de 6,5 mL, enquanto que para PEG 400 o volume era de aproximadamente 1,7 mL. Porém, pôde-se verificar que, praticamente, não há variação do volume da interface entre o sistema por PEG 400 e PEG 1500 quando a agitação para mistura dos componentes foi por rotação a 8 RPM.

Na Tabela 3.3.3 estão mostrados os volumes das interfaces obtidas quando se variou o tempo de agitação (por rotação a 8 RPM) para mistura dos componentes das fases do sistema PEG 400 e 1500/Fosfato. Como se pode verificar, o volume da interface permanece constante após 20 minutos de agitação para os dois casos avaliados. Em função disso, o tempo de agitação para a mistura dos componentes do sistema passou a ser fixado em 20 min.

Após a análise dos resultados apresentados na Tabela 3.3.2, pôde-se concluir que a agitação pelo sistema de rotação a 8 RPM proporciona menores volumes de interface quando comparado com a agitação em vórtice. Portanto, essa forma de agitação passou a ser utilizada nos experimentos de extração, além do que as coletas das amostras passaram a ser feitas 1 hora após a centrifugação.

Para efeito de padronização, passou-se a utilizar essa forma e tempo de agitação e de coleta de amostras, também, para as extrações com a enzima pura da SIGMA®.

Tabela 3.3.2 - Influência do tempo de repouso, após a etapa de centrifugação para separação das fases do sistema PEG 400 e PEG 1500/Fosfato, no volume da interface. Condições de extração: 1) agitação em vórtice por 1 min à 4°C e posterior centrifugação por 15min/4°C/405g; 2) agitação rotativa a 8 RPM/20 min a 4°C e posterior centrifugação por 15min/4°C/405g. Tempo de repouso para retirada das fases: 0 a 7 horas após a centrifugação. Realizou-se uma extração diferente para cada tempo de repouso.

Tempo de repouso (h)	Volume da Interface (mL)			
	agitação em vórtice por 1 min		agitação rotativa a 8 RPM/20 min	
	PEG 400	PEG 1500	PEG 400	PEG 1500
0	1,8	6,1	1,8	1,0
1	1,8	6,2	1,8	1,1
3	1,4	6,5	1,4	1,3
5	1,7	6,6	1,9	1,3
7	1,9	6,8	1,8	1,4

Tabela 3.3.3 - Influência do tempo de agitação por rotação a 8 RPM no volume da interface do sistema PEG 400 e PEG 1500/Fosfato. Condições de extração: temperatura de agitação 4°C; centrifugação por 15min/4°C/405g; tempo de repouso para retirada das fases 3 horas.

Tempo de agitação (min)	Volume da Interface (mL)	
	PEG 400	PEG 1500
10	2,5	2,5
20	2,0	2,0
30	2,0	2,0

Extração da enzima G6PDH do Homogeneizado Celular – Utilização de Planejamento Experimental no Sistema PEG 400/Fosfato

Foi proposto um planejamento fatorial do tipo 2^2 com 02 repetições no ponto central para verificar a influência da concentração de PEG 400 (%p/p) e da concentração de fosfato (%p/p) na extração da G6PDH. Os resultados da análise estatística mostraram que a % de PEG e a %fosfato, assim como a interação entre essas variáveis, não apresentaram efeito significativo sobre o coeficiente de partição da enzima, ao nível de 90% de confiança, na região analisada. Sendo assim, definiu-se como sendo a condição ótima de extração aquela que proporcionou o maior valor de coeficiente de partição ($K = 351$). As condições foram PEG 400 a 17,5 % (p/p) e fosfato 15,0 % (p/p). A extração conduzida nessas condições proporcionou um aumento de pureza na fase superior de 2,28 vezes para a enzima extraída (em relação ao meio inicial, ou seja, o homogeneizado celular), e uma recuperação de 97,7% da G6PDH nessa fase.

Estudo dos Parâmetros Cinéticos e Termodinâmicos antes e após a Extração

Os parâmetros cinéticos e termodinâmicos foram determinados antes e após a extração da enzima G6PDH. Observou-se que o valor de K_M foi o mesmo para a enzima na forma pura da SIGMA® e para a enzima presente no homogeneizado celular. Este resultado indicou que o método de rompimento celular empregado (por moinho de bolas) não afetou a estrutura macromolecular da enzima. Observou-se, ainda, que a energia livre da reação, calculada à temperatura e pressão constantes não variou significativamente com o grau de pureza da enzima, ou seja, a especificidade da G6PDH pela G-6-P e NADP⁺ permaneceu inalterada. Observou-se, também, uma acentuada diminuição nos valores de E_a e ΔH para a G6PDH no homogeneizado, quando comparados com a G6PDH da SIGMA® dissolvida em solução tamponada e livre de quaisquer contaminantes. Uma E_a menor poderia resultar do fato de que no homogeneizado, onde existiriam G-6-P ou NADP⁺ de origem endógena, pré-existiria o complexo enzima-substrato, no caso a G6PDH-G6P. Neste caso,

o sistema necessitaria de menos energia para alcançar o estado de transição quando a atividade da enzima fosse medida.

Trabalhos publicados por Marcela Zanella Ribeiro

- 1 RIBEIRO, M. Z.; SOUZA, M.A.; PESSOA JR, A; VITOLO, M. Influence of Agitation on Hexokinase and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Extraction by Aqueous Two-Phases Systems. In: **VI SHEB - SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS**, Maringá/PR, *Programas e Resumos*, 06-10/Dez.99, 1999.
- 2 SILVA, D.P; RIBEIRO, M.Z.; SOUZA, M.A.; VITOLO, M.; PESSOA-JR, A. Avaliação de Inibidores de Proteases na Estabilidade da Hexoquinase. In: **XX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**, 24-28/10/99. Salvador/BA.
- 3 SOUZA, M. A.; RIBEIRO, M. Z.; SILVA, D. P.; VITOLO, M.; PESSOA JR., A. Influência do pH na Estabilidade de Estocagem das Enzimas Hexoquinase e Glicose-6-fosfato-desidrogenase. In: **XX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**, 24-28/10/99. Salvador/BA.
- 4 RIBEIRO, M. Z.; SILVA, D. P.; PESSOA-JR, A.; VITOLO, M. Estabilidade da Glicose-6-fosfato Desidrogenase na Presença de Inibidores de Protease. In: **XX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**, 24-28/10/99. Salvador/BA.
- 5 RIBEIRO, M.Z.; SOUZA, M.A.; VITOLO, M.; PESSOA-JR, A. Extração Líquido-Líquido em Sistemas de Duas Fases Aquosas (SDFA): Avaliação do Equilíbrio de Fases Utilizando Enzimas Intracelulares de *Saccharomyces cerevisiae*. In: SEMANA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA FCF/USP. 18-22/10/99, São Paulo/SP. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.35, supl.1, p.96, 1999.
- 6 SOUZA, M.A.; RIBEIRO, M.Z.; VITOLO, M.; PESSOA-JR, A. Determinação da energia livre (ΔG) da enzima hexoquinase com diferentes graus de pureza. In: SEMANA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA FCF/USP. 16-20/10/00, São

Paulo/SP. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. vol. 26, supl. 1, p.78, 2000.

- 7 RIBEIRO, M.Z.; SOUZA, M.A.; ROBERTO, I.C.; VITOLO, M.; PESSOA-JR, A. Estudo da influência da massa molar do PEG, concentração de PEG, concentração de tampão fosfato na extração da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase em sistema s de duas fases aquosas. In: SEMANA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA FCF/USP. 16-20/10/00, São Paulo/SP. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. vol. 26, supl. 1, p.84, 2000.

3.4 Maria Aparecida de Souza

Este trabalho teve um desenvolvimento similar ao do item 3.3. A principal diferença foi que, aqui, utilizou-se o SDFA para extrair a **enzima intracelular** hexoquinase. As fontes da enzima foram: adquirida na forma purificada da SIGMA® e da levedura *Saccharomyces cerevisiae* adquirida comercialmente (fermento *Fleischmann*). Para todos os estudos foi utilizado o sistema **PEG/fosfato**. Também avaliou-se a estabilidade da enzima-alvo (hexoquinase) frente ao pH, temperatura, tampão fosfato e PEG. Em seguida, procedeu-se às extrações utilizando a enzima pura adquirida da SIGMA® para, posteriormente, estudar a extração utilizando o homogeneizado celular. As constantes cinéticas e termodinâmicas da enzima antes e após a extração também foram utilizadas para verificar alterações conformacionais na enzima.

Avaliação da Estabilidade da HK Frente ao pH, Temperatura, Fosfato e PEG

A Tabela 3.4.1 mostra os tempos máximos recomendados para estocagem da enzima HK obtida de homogeneizado celular em diferentes condições de pH, temperatura, fosfato, PEG e inibidores de proteases. Assim como verificado anteriormente para a enzima G6PDH, tais resultados são

positivos para o manuseio da enzima HK durante todo o trabalho de extração em sistemas de duas fases aquosas, uma vez que a condução desse processo ocorre, em geral, em tempos inferiores a 12 horas. Observa-se, ainda, que na presença do coquetel de inibidores de proteases e em valores de pH entre 4,5 a 8,5 pode-se estocar a enzima por até 50 horas a 4°C. Comparando a estabilidade da HK com a da G6PDH pode-se concluir que ambas têm perfis semelhantes frente ao pH, temperatura, PEG e fosfato.

Tabela 3.4.1 – Tempo de estocagem máximo recomendado para enzima HK obtida de homogeneizado celular em diferentes condições de pH, temperatura, fosfato, PEG e inibidores de proteases.

Condições de Estocagem	Tempo
T = 4°C, pH = 4,5 a 8,5, coquetel de inibidores de proteases	50 horas
T = 4°C, pH = 4,0, 9,0 e 9,5, coquetel de inibidores de proteases	12 horas
T = 4°C, pH = 7,5, Fosfato a 15%, coquetel de inibidores de proteases	50 horas
T = 26°C, pH = 7,5, Fosfato a 15%, coquetel de inibidores de proteases	24 horas
T = 4°C, pH = 7,5, PEG 300, 400, 600, 1000 e 1500 a 20%, coquetel de inibidores de proteases	50 horas
T = 26°C, pH = 7,5, PEG 300, 400, 600, 1000 e 1500 a 20%, coquetel de inibidores de proteases	24 horas
T = 4°C, pH = 7,5, ácido aminocaprílico	4 horas
T = 4°C, pH = 7,5, EDTA	4 horas
T = 4°C, pH = 7,5, β-mercaptoetanol	4 horas

Extração da HK pura da SIGMA® por SDFA

Os motivos que levaram a estudar a extração da HK na forma pura foram os mesmos dados à G6PDH. Neste caso, também, auxiliou-se de um planejamento estatístico para a análise dos resultados.

Foi executado um planejamento experimental completo do tipo 2³ com 3 repetições no ponto central para verificar a influência da massa molar do PEG, concentração de PEG (%p/p), e da concentração de tampão fosfato (% p/p) na

extração da enzima G6PDH. O pH de todas as extrações foi mantido em 7,5 e a temperatura em 4°C.

O primeiro conjunto de experimentos foi feito com PEGs de massas molares iguais a 1500, 4000 e 6000 g/mol. Porém os coeficientes de partição obtidos foram muito baixos. Isso levou à execução de um novo planejamento em que as massas molares passaram a ser iguais a 400, 1000 e 1500 g/mol. Nessas novas condições experimentais obtiveram-se melhores valores de coeficientes de partição e ficou evidenciado que o estudo de otimização do processo de extração poderia ser iniciado.

Após análise estatística dos resultados verificou-se que, dentro dos limites estabelecidos no planejamento experimental, a única variável significativa ao nível de 95% de probabilidade na extração da HK na forma pura da SIGMA[®] foi a massa molar do PEG. Essa análise indicou, ainda, que a otimização da extração deveria ser feita utilizando-se a estratégia de passo ascendente para as outras variáveis do processo (aumento simultâneo das concentrações de PEG e de fosfato), porém mantendo-se a variável massa molar do PEG fixa em 400 g/mol. Os resultados obtidos mostraram que essa estratégia foi adequada, uma vez que se obteve aumento significativo do coeficiente de partição da enzima.

Assim como para a enzima G6PDH verificou-se que a massa molar do PEG foi a variável de maior importância para o aumento do coeficiente de partição da HK. Há na literatura diversos exemplos similares aos obtidos nesses trabalhos.

Extração da HK de Homogeneizado de S. cerevisiae por SDFA

Assim como para a enzima G6PDH, foi necessário definir as melhores condições de mistura do sistema de duas fases aquosas para minimizar o efeito da interface e melhorar o equilíbrio do sistema. Os resultados obtidos para a enzima HK foram similares aos obtidos anteriormente para a G6PDH. Portanto, concluiu-se que a agitação pelo sistema de rotação a 8 RPM por 20 minutos e espera de 1 hora para coleta das amostras após a centrifugação (Tabelas 3.4.2

e 3.4.3) seriam adotadas para todas as extrações que fossem conduzidas tanto com homogeneizado celular como com a enzima pura da SIGMA®.

Tabela 3.4.2 - Influência do tempo de repouso, após a etapa de centrifugação para separação das fases do sistema PEG 400 e PEG 1500/Fosfato no volume da interface. Condições de extração: 1) agitação em vórtice por 1 min a 4°C e posterior centrifugação por 15min/4°C/405g; 2) agitação rotativa a 8 RPM/20 min a 4°C e posterior centrifugação por 15min/4°C/405g Tempo de repouso para retirada das fases: 0 a 7 horas após a centrifugação. Realizou-se uma extração diferente para cada tempo de repouso.

Tempo de repouso (h)	Volume da Interface (mL)			
	agitação em vórtice por 1 min		agitação rotativa: 8 RPM/20 min	
	PEG 400	PEG 1500	PEG 400	PEG 1500
0	1,8	6,1	1,0	1,8
1	1,8	6,2	1,1	1,6
3	1,4	6,8	1,3	1,4
5	1,7	6,7	1,3	1,8
7	1,9	7,0	1,4	1,7

Tabela 3.4.3 - Influência do tempo de agitação por rotação a 8 RPM no volume da interface do sistema PEG 400 e PEG 1500/Fosfato. Condições de extração: temperatura de agitação a 4°C; centrifugação por 15min/4°C/405g; tempo de repouso para retirada das fases 3 horas.

Tempo de agitação (min)	Volume da Interface (mL)	
	PEG 400	PEG 1500
10	2,5	2,5
20	2,0	2,0
30	2,0	2,0

Após definidas as condições de mistura e separação das fases do SDFA iniciaram-se as extrações da HK presente em homogeneizado celular, com auxílio de planejamento experimental. Apesar de ter sido verificado, durante a extração da enzima pura, que o PEG de massa molar igual a 400 g/mol proporcionava melhores coeficientes de partição, resolveu-se avaliar a eficiência de extração da HK do homogeneizado com auxílio do PEG 1500 g/mol, pois ele também proporcionou bons coeficientes de partição. Foram feitos dois planejamentos estatísticos, um para cada massa molar de PEG, e estudou-se, inicialmente, a influência de 3 variáveis (concentração e massa molar do PEG e concentração de NaCl) no coeficiente de partição da enzima. Porém, com o excesso de sólidos no meio, houve saturação do sistema. Decidiu-se, então, eliminar do planejamento a variável concentração de NaCl e estudá-la, isoladamente, numa fase posterior. Portanto o planejamento experimental foi do tipo fatorial completo 2^2 com duas repetições no ponto central.

Após otimização do processo de extração, verificou-se que o maior valor do coeficiente de partição ($K= 90,1$) para o PEG 1500 foi obtido com o polímero na concentração de 17,5 % (p/p) e com fosfato a 22,5 % (p/p), mantendo-se o pH em 7,5 e a temperatura a 4°C. Para o PEG 400, o maior valor de K foi de 369,3 com o polímero na concentração de 22,5 % (p/p) e com fosfato a 17,9 % (p/p).

Estudo dos Parâmetros Cinéticos e Termodinâmicos antes e após a Extração

Conhecendo-se as características cinéticas e termodinâmicas da enzima antes e após a extração, é possível verificar se houve alguma transformação estrutural durante o processo.

Após extração da enzima observou-se um decréscimo no valor de K_M e $V_{m\acute{a}x}$, o que sugere que a presença de fragmentos no homogeneizado celular influenciou os valores determinados para as constantes cinéticas antes da extração. Essa suposição pode ser confirmada quando se verifica que o valor de K_M obtido para hexoquinase após extração é praticamente o mesmo citado

por ENTIAN, SCÜLLER (1997), e indicou que a extração por SDFA não alterou as características cinéticas da enzima HK.

Quando se determinou o parâmetro termodinâmico ΔG , antes e após a extração, verificou-se que eles foram similares. Isso indicou que esse parâmetro termodinâmico não foi influenciado pelos fragmentos celulares presentes no homogeneizado celular nem pelo PEG presente na fase superior do sistema após a extração.

Baseado nos parâmetros cinéticos e termodinâmicos conclui-se que o processo de extração por SDFA pouco interfere na estrutura da enzima.

Trabalhos publicados por Maria Aparecida de Souza

- 1 SOUZA, M.A.; SILVA, M.A.; VITOLO, M.; PESSOA-JR, A. Influência do pH na Estabilidade de Estocagem da Enzima Hexoquinase. In: **SEMANA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA FCF/USP**. 18-22/10/99, São Paulo/SP. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.35, supl.1, p.100, 1999.
- 2 RIBEIRO, M. Z.; SOUZA, M.A.; PESSOA JR, A; VITOLO, M. Influence of Agitation on Hexokinase and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Extraction by Aqueous Two-Phases Systems. In. **VI SHEB - SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS**, Maringá/PR, *Programas e Resumos*, 06-10/Dez.99, 1999.
- 3 SILVA, D. P; RIBEIRO, M.Z.; SOUZA, M.A.; VITOLO, M.; PESSOA-JR, A. Avaliação de Inibidores de Proteases na Estabilidade da Hexoquinase. In: **XX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**, 24-28/10/99. Salvador/BA.
- 4 SOUZA, M. A.; RIBEIRO, M. Z.; SILVA, D. P.; VITOLO, M.; PESSOA JR., A. Influência do pH na Estabilidade de Estocagem das Enzimas Hexoquinase e Glicose-6-fosfato-desidrogenase. In: **XX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**, 24-28/10/99. Salvador/BA.
- 5 RIBEIRO, M.Z.; SOUZA, M.A.; VITOLO, M.; PESSOA-JR, A. Extração Líquido-Líquido em Sistemas de Duas Fases Aquosas (SDFA): Avaliação

- do Equilíbrio de Fases Utilizando Enzimas Intracelulares de *Saccharomyces cerevisiae*. In: **SEMANA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA FCF/USP**. 18-22/10/99, São Paulo/SP. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.35, supl.1, p.96, 1999.
- 6 SOUZA, M.A.; RIBEIRO, M.Z.; VITOLO, M.; PESSOA-JR, A. Determinação da energia livre (ΔG) da enzima hexoquinase com diferentes graus de pureza. In: SEMANA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA FCF/USP. 16-20/10/00, São Paulo/SP. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. vol. 26, supl. 1, p.78, 2000.
- 7 RIBEIRO, M.Z.; SOUZA, M.A.; ROBERTO, I.C.; VITOLO, M.; PESSOA-JR, A. Estudo da influência da massa molar do PEG, concentração de PEG, concentração de tampão fosfato na extração da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase em sistemas de duas fases aquosas. In: SEMANA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA FCF/USP. 16-20/10/00, São Paulo/SP. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. vol. 26, supl. 1, p.84, 2000.

Extração Líquido-Líquido em Sistemas Micelares Reversos (SMR)

3.5 Eliana Maria Gonçalves Rodrigues

Neste trabalho de mestrado utilizou-se o SMR para extrair a **enzima extracelular** xilanase produzida pelo **fungo** *Penicillium janthinellum* utilizando o agente tensoativo aniônico AOT e o catiônico BDBAC com auxílio de **planejamento estatístico**.

Otimização da Extração de Xilanase por Micela Reversa Usando um Agente Tensoativo Aniônico (AOT)

As variáveis pH, temperatura, concentração de AOT e de tampão foram selecionadas para o estudo de seus efeitos sobre o rendimento de extração, expresso em atividade da enzima. A escolha dos níveis das variáveis experimentais foi baseada nas características bioquímicas de uma endoxilanase produzida por *P. janthinellum* em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. Outras xilanases estavam presentes no extrato de cultivo de *P. janthinellum*, mas suas características não foram levadas em conta para o processo de separação por micela reversa. Os valores de estabilidade ao pH e à temperatura também foram usados como referência para a escolha dos níveis das variáveis do planejamento fatorial completo do tipo 2^4 com 4 ensaios no ponto central para a determinação do erro experimental. As variáveis aqui testadas foram: pH, concentração de AOT, concentração de tampão e temperatura.

Após a realização da primeira etapa do planejamento experimental, verificou-se que o maior rendimento obtido, expresso em atividade da xilanase recuperada após reextração, foi de 3,1%. Esse valor de rendimento foi considerado baixo, porém encontrou-se na literatura (ZAMARRO *et al.*, 1996) resultados similares (2,8%) na recuperação de xilanase usando AOT. Em função disso, resolveu-se continuar os estudos de extração da enzima usando esse tensoativo aniônico. Para isso propôs-se um novo planejamento fatorial

completo do tipo 2^3 para estudar somente a influência das variáveis que foram significativas no planejamento anterior: pH, temperatura e concentração de AOT. Após otimização da extração, obteve-se um modelo estatístico (Equação 3.5.1) que previu um rendimento de extração de 10,2% e uma superfície de resposta (Figura 3.5.1) que correlacionava o rendimento de extração em função das variáveis mais significativas: pH e temperatura. Experimentalmente, a porcentagem de xilanase recuperada nessas condições ótimas (pH = 6,3, temperatura = 46,8 °C e AOT = 0,57 M) foi de 9,1%. A diferença entre o rendimento obtido experimentalmente e o previsto pelo modelo foi considerada adequada, pois estava dentro do erro previsto pelo modelo.

$$Y = 8,75 - 4,31.X_1^2 - 3,13.X_2^2$$

Equação 3.5.1

Sendo: X_1 = pH
 X_2 = temperatura

Figura 3.5.1 Superfície de resposta e curvas de nível descritas pelo modelo da Equação 3.5.1, que representa a extração de xilanase por micela reversa utilizando o agente tensoativo aniônico AOT.

Otimização da Extração de Xilanase por Micela Reversa Usando um Agente Tensoativo Catiônico (BDBAC)

Uma das conclusões para o fato da extração feita com o tensoativo aniônico AOT ter proporcionado um rendimento muito baixo foi o fato de que o pH dos experimentos (pH 6,3) estava muito próximo do ponto isoelétrico da enzima (pI entre 6,0 e 6,5) e com isso ela estava pouco carregada eletricamente. Resolveu-se, então, estudar a extração com auxílio do agente tensoativo catiônico BDBAC.

As micelas reversas formadas por agentes tensoativos catiônicos possuem menores diâmetros que as formadas pelos aniônicos. Em função disso é necessário adicionar, pelo menos, um co-solvente ao sistema para favorecer o aumento das micelas. Dessa forma, o número de variáveis envolvidas no rendimento de extração foi ampliado. Portanto, foram selecionadas 7 variáveis (pH, temperatura, concentração de BDBAC, concentração do co-solvente hexanol, concentração do tampão, condutividade elétrica e tempo de agitação para mistura do sistema). Para estudo de seus efeitos sobre o rendimento em atividade da enzima e para que o número de extrações não fosse excessivo, optou-se por realizar um planejamento fatorial fracionário do tipo 2^{7-3} . A análise estatística dos resultados deste planejamento, mostrou que 5 das 7 variáveis (pH, condutividade elétrica, concentração de BDBAC, concentração de tampão e porcentagem de hexanol) apresentaram efeitos significativos no rendimento de extração. Foi, então, realizado um novo planejamento sem os fatores não-significativos no planejamento inicial, ou seja, os fatores temperatura e tempo de agitação. A análise estatística dos novos resultados mostrou que as variáveis concentração de BDBAC e concentração de hexanol foram significativas e o modelo matemático obtido para representar a recuperação da enzima no processo, foi expresso pela Equação 3.5.2.

$$Y = 4,32 + 5,1.X_1 + 2,64.X_2 + 0,83.X_1^2 + 1,46.X_2 \quad (\text{Equação 3.5.2})$$

sendo: Y = recuperação da xilanase (%)
 X_1 = concentração de BDBAC (mol/L)
 X_2 = hexanol (%v/v).

As curvas de nível e a superfície de resposta correspondentes ao modelo estão representadas na Figura 3.5.2. O rendimento na condição ótima de extração (pH 8,1, BDBAC = 0,38 M, hexanol 8,6%, 1 minuto de agitação, tampão a 0,03M e condutividade elétrica de 7 mS/cm) previsto pelo modelo foi de 27%, porém, experimentalmente foi possível recuperar 29,4% de xilanase para o interior da micela reversa e, ainda, obter um aumento de pureza de 2,3 vezes. O modelo foi considerado adequado.

Figura 3.5.2 Superfície de resposta e curvas de nível descritas pelo modelo da Equação 3.5.2, que representa a extração de xilanase por micela reversa utilizando o agente tensoativo catiônico BDBAC.

Os rendimentos de extração apresentados até este ponto referem-se à enzima que foi transferida para o interior da micela reversa e, posteriormente, transferida para o tampão de reextração, ou seja, recuperação da enzima na fase aquosa II. Porém, analisando-se a atividade enzimática e o teor de proteínas totais na fase aquosa I, ou seja, a fase aquosa remanescente após a extração por micelas reversas, verificou-se um fato surpreendente: a xilanase foi purificada em 7 vezes com um rendimento de 73,1%. Da fase aquosa I fez-se uma eletroforese em gel de poliacrilamida e uma focalização isoelétrica em gel bidimensional da enzima purificada (Figura 3.5.3). Os resultados

apresentados mostraram haver somente uma banda na eletroforese em gel de poliacrilamida e duas bandas na focalização isoelétrica, indicando a presença de duas proteínas de mesma massa molar, porém com pontos isoelétricos ligeiramente diferentes; 6,0 e 6,5. Estes valores sugeriram que, ao se trabalhar em pH 7,0, houve apenas uma pequena variação entre o pH (8,1) de extração em relação ao pI, não possibilitando com isso uma significativa interação eletrostática entre a proteína e a cabeça positivamente carregada do tensoativo catiônico BDBAC, desfavorecendo com isso, a transferência da enzima para o interior da micela e explicando a baixa recuperação da enzima na fase aquosa II. Porém, a observação mais importante deste trabalho é a de que a enzima foi quase totalmente purificada na fase aquosa I após extração líquido-líquido por sistema micelar reverso, uma vez que a eletroforese em gel de poliacrilamida mostrou somente uma banda e que a focalização isoelétrica demonstrou, posteriormente, ser duas proteínas com mesma massa molar, porém com uma pequena diferença (0,5 ponto) no ponto isoelétrico.

Figura 3.5.3 Focalização isoelétrica da enzima purificada por extração líquido-líquido por micela reversa na fase aquosa I.

É importante ressaltar nesses estudos de extração que o fato do modelo estatístico contemplar somente as variáveis mais significativas do processo utilizado, não significa que as outras variáveis do processo não sejam importantes. O que varia é o peso atribuído a cada uma delas.

Trabalhos publicados pela aluna Eliana Maria Gonçalves Rodrigues.

- 1 RODRIGUES, E.M.G. **Extração Líquido-Líquido de Xilanase por Micela Reversa**. Lorena. Dissertação de Mestrado. 1997.
- 2 RODRIGUES, E. M. G.; MILAGRES, A. M. F; PESSOA JR., A. Xylanase Recovery: Effect of Extraction Conditions on the AOT-Reversed Micellar Systems Using Experimental Design. **Process Biochemistry**, 34(2), 121-125 1999.
- 3 RODRIGUES, E. M. G.; PESSOA JR., A.; MILAGRES, A. M. F. Screening of Variables in Xylanase Recovery Using BDBAC Reversed Micelles. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 77-79, 779-788, 1999.
- 4 RODRIGUES, E. M. G.; MILAGRES, A. M. F; PESSOA JR., A. Selective Recovery of Xylanase from *Penicillium Janthinellum* Using BDBAC Reversed Micelles. **Acta Biotechnologica**. (19)2:157-161, 1999.
- 5 KILIKIAN, B.V.; BASTAZIN, M.R.; MINAMI, N.M.; GONÇALVES, E.M.R., PESSOA JR, A. Liquid-Liquid Extraction by Reversed Micelles in Biotechnological Process. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. 17(1):29-38, 2000.
- 6 RODRIGUES, E. M. G.; MILAGRES, A. M. F.; PESSOA JR., A. Recuperação Seletiva de Xilanase de *Penicillium janthinellum* Usando BDBAC em Micela Reversa. ANAIS in: **ENZITEC 97 - 3º SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA**, Rio de Janeiro, Out/97.
- 7 RODRIGUES, E. M. G.; MILAGRES, A. M. F.; PESSOA JR, A. Screening of Variables in Xylanase Recovery Using BDBAC Reversed Micelles. In: **TWENTIETH SYMPOSIUM ON BIOTECHNOLOGY FOR FUELS AND CHEMICALS**, Gatlinburg/Tennessee, May 1998.
- 8 PESSOA JR, A.; KILIKIAN, B. V.; MILAGRES, A.M.F.; RODRIGUES, E.M.G.; COSTA, S. A.; CORTEZ, E. V. Comparação de Diferentes Técnicas para Separação de Xilanases. ANAIS in: **ENZITEC 97 3º SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA**, Rio de Janeiro, Out/97.

3.6 Francislene Andréia Hasmann

Neste trabalho de mestrado utilizou-se o SMR para extrair a **enzima extracelular** β -xilosidase produzida pelo **fungo** *Penicillium janthinellum*, previamente precipitada com etanol, utilizando os agentes tensoativos catiônicos BDBAC e CTAB com auxílio de **planejamento estatístico**. Testou-se, também, a extração com o agente tensoativo aniônico AOT, porém os rendimentos de extração foram nulos.

Os estudos anteriormente conduzidos por RODRIGUES (1997) mostraram que, além da xilanase (na verdade uma endo-xilanase) purificada por micelas reversas, o complexo xilanolítico possuía diversas outras enzimas. No mesmo período em que RODRIGUES (1997) conduziu seus trabalhos de purificação de xilanase por micelas reversas, CORTEZ (1998) estudou, em sua Dissertação de Mestrado, a purificação das enzimas desse complexo xilanolítico, por precipitação. Seus estudos mostraram que, por precipitação fracionada com etanol, era possível separar, seletivamente, a enzima β -xilosidase (uma exo-xilanase) de diversas outras enzimas do complexo xilanolítico. O principal motivo pelo qual foi possível purificar por precipitação fracionada com etanol em 2 etapas (concentrações de 20 e 60% v/v) deveu-se a que a β -xilosidase possui elevada massa molar (~110 kDa) quando comparada com as outras enzimas do complexo xilanolítico (as massas molares das endo-xilanases variam de 14 a 31 kDa). Essa grande diferença entre as massas molares das enzimas possibilitou a separação entre elas por precipitação fracionada com etanol.

Extração de β -xilosidase por Micela Reversa Usando um Agente Tensoativo Catiônico (BDBAC)

A extração da β -xilosidase por micelas reversas foi feita após precipitação fracionada com etanol, como citado anteriormente. O principal objetivo dessa sucessão de etapas era chegar a um processo global no qual

em cada etapa se separasse uma enzima do complexo xilanolítico. Além disso, considerava-se importante estudar o comportamento da β -xilosidase ao longo de todas essas etapas de purificação que envolviam diversos solventes.

A extração da enzima β -xilosidase por micelas reversas do agente tensoativo BDBAC realizou-se conforme o planejamento fracionário do tipo 2^{5-1} . As variáveis avaliadas foram: pH, condutividade elétrica, concentração de hexanol, concentração de BDBAC e temperatura.

Os resultados obtidos mostraram que diferentes combinações das variáveis interferiam nos resultados de recuperação, o que dificultava uma análise direta dos efeitos destas variáveis. Dessa forma, os efeitos principais das variáveis pH, condutividade elétrica, concentração de BDBAC, concentração de hexanol e temperatura, bem como os efeitos interativos entre elas, puderam ser melhor avaliados empregando-se a análise estatística. Dentre os 05 fatores estudados, apresentaram significância em ordem decrescente os seguintes fatores: pH>temperatura>concentração de BDBAC. Os maiores efeitos foram causados pela influência negativa do pH e positiva da temperatura. Isso equivale dizer que os valores para a variável resposta são aumentados quando o fator pH é utilizado no seu nível inferior (3,0) e temperatura no superior (26 °C). Dessa forma, com o objetivo de se otimizar o processo de extração, estudou-se a influência do binômio pH e temperatura sobre o processo.

A análise estatística dos resultados gerou um modelo matemático que descreveu a recuperação de β -xilosidase por micelas reversas de BDBAC (em isooctano e hexanol) e que foi expresso pela Equação 3.6.1 e uma superfície de resposta (Figura 3.6.1).

Equação 3.6.1

$$Y = 36,89 + 10,83X_1 - 12,17X_2 - 6,00X_1.X_2 - 17,24 X_1^2 - 13,24X_2^2$$

sendo: Y =recuperação da enzima (%),

X_1 = pH

X_2 = temperatura (°C)

A máxima recuperação de enzima prevista pelo modelo no ponto ótimo (pH=3,4, T=24°C. condutividade elétrica=4,0 mS/cm, concentração de

BDBAC=0,2M e concentração de hexanol=10% v/v) foi de 42%. Experimentalmente o valor obtido foi de 43%. Esse resultado confirmou a previsão feita pelo modelo. Nessas condições de extração o aumento de pureza obtido para a enzima foi de 2,0 vezes.

Figura 3.6.1 - Superfície de Resposta Descrita pelo Modelo da Equação 3.6.1, que Representa a Extração em Condições Otimizadas de β -xilosidase por Micelas Reversas do Agente Tensoativo Catiônico BDBAC em Isooctano e Hexanol.

Tensoativos catiônicos, tais como o BDBAC, normalmente favorecem o transporte de enzimas para o interior da micela quando essas possuem carga elétrica negativa, o que é alcançado com o uso de valores de pH superiores ao pI da enzima. O ponto isoelétrico da β -xilosidase de diferentes microorganismos encontra-se entre 4,9 e 6,0, segundo dados encontrados na literatura (DESHPAND *et al.* 1994; SULYSTIO *et al.*, 1995) e portanto é esperado que, com o uso de agentes tensoativos catiônicos, a enzima migre para o interior das micelas reversas quando o pH do meio é superior ao seu pI. Todavia, neste trabalho, a situação foi oposta, ou seja, maiores valores de recuperação da enzima foram obtidos em pH inferior ao pI da enzima, sugerindo que a transferência da enzima para a fase micelar fosse governada

por interações hidrofóbicas entre a proteína e o tensoativo como pode ser observado na Figura 3.6.2 e proposto por LUISI *et al.* (1988).

Figura 3.6.2 - Extração de uma Proteína por Micelas Reversas Considerando a Existência de Forças Hidrofóbicas de Interação (Adaptado de LUISI, et al., 1988).

Extração da Enzima β -xilosidase por Sistema Micelar Reverso Formado a partir do Agente Tensoativo Catiônico CTAB

Decidiu-se estudar a extração da enzima com auxílio de outro agente tensoativo catiônico para aumentar as opções de trabalho e comparar os resultados com o BDBAC. Esta extração também foi feita após precipitação fracionada com etanol. Como o agente tensoativo CTAB exige o uso de dois co-solventes (hexanol e butanol) para a formação das micelas reversas, foi proposto um planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} com 03 repetições no ponto central, pois seria possível detectar as diferentes combinações de variáveis que interfeririam no processo de extração. As variáveis avaliadas foram: pH, condutividade elétrica, concentração de hexanol, concentração de butanol, concentração de CTAB e temperatura.

Após análise estatística dos resultados verificou-se que as variáveis mais significativas na extração da enzima eram a concentração do CTAB e concentração de butanol. As outras variáveis do processo puderam ser fixadas sem que afetasse significativamente o rendimento de extração. Sendo assim, otimizou-se a extração por SMR, mantendo-se o valor do pH em 8,0, a

condutividade elétrica em 4mS/cm, a concentração de hexanol em 5% e de butanol em 20%.

A otimização da extração (CTAB = 0,26 M e butanol a 29,4%) indicou que o processo poderia ser representado por um modelo matemático como apresentado na Equação 3.6.2 e por uma superfície de resposta como mostrada na Figura 3.6.3. Nas condições ótimas, o rendimento da extração previsto pelo modelo foi de 43%, enquanto que o valor obtido experimentalmente foi de 44,3%. O aumento de pureza da enzima ficou em 5,34 vezes.

Equação 3.6.2

$$Y = 42,35 - 3,07.X_1 + 5,79.X_2 + 5,67.X_1.X_2 - 18,72.X_1^2 - 13,32.X_2^2$$

sendo: Y = recuperação da enzima (%);
X₁ = concentração de CTAB (M);
X₂ = concentração de Butanol (% v/v).

Figura 3.6.3 - Superfície de Resposta Descrita pelo Modelo da Equação 3.6.2, que Representa a Extração em Condições Otimizadas de β -xilosidase por Micelas Reversas do Agente Tensoativo Catiônico CTAB em Isooctano, Hexanol e Butanol.

A purificação da enzima β -xilosidase por sistemas micelares reversos mostrou que, dependendo do agente tensoativo utilizado, o mecanismo de extração pode ser regido por interações hidrofóbicas (no caso do BDBAC) ou por interações eletrostáticas (no caso do CTAB).

Trabalhos publicados pela aluna Francislene Andréia Hasmann e Ely V. Cortez

- 1- HASMANN, F.A. **Recuperação de β -xilosidase por Extração Líquido-Líquido por Micelas Reversas**. Dissertação de Mestrado, FAENQUIL, 1999.
- 2- CORTEZ, E.V. **Recuperação de Xilanase por Precipitação**. Dissertação de Mestrado, FAENQUIL, 1998.
- 3- HASMANN, F. A.; PESSOA JR, A.; ROBERTO, I.C. Optimization of pH and Temperature for β -Xylosidase Recovery by Reversed Micelles. **Biotechnology Techniques**. **13**(4):239-242, 1999.
- 4- HASMANN, F. A.; PESSOA JR. A.; ROBERTO, I.C. β -Xylosidase Recovery by Reversed Micelles: Use of Cationic Surfactant. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. **84-86**:1101-1111, 2000.
- 5- CORTEZ, E. V.; PESSOA JR, A. Xylanase and β -xylosidase separation by fractional precipitation. **Process Biochemistry**. **35**:277-283, 1999.
- 6- CORTEZ, E.V.; PESSOA JR., A. Recuperação de Enzimas Xilanolíticas Produzidas pelo Fungo *Penicillium janthinellum* por Precipitação com Etanol. ANAIS in: **ENZITEC 97 3º SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA**, Rio de Janeiro, Out/97.
- 7- CORTEZ, E.V.; PESSOA JR, A.; ASSIS, A.N. Xylanase Recovery By Ethanol and Na_2SO_4 Precipitation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. **70-72**:661-666, 1998.
- 8- HASMANN, F. A.; SILVA, R.R.P., PESSOA JR. A.; ROBERTO, I.C. β -Xilosidase: Avaliação da Estabilidade e Determinação de Parâmetros Cinéticos. **Farmácia e Química**. **32**(2):28-31, 1999.

- 9- HASMANN, F. A., PESSOA-JR, A.; ROBERTO, I. C. Screening of Variables in β -Xylosidase Recovery Using CTAB Reversed Micelles. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, **91-93**, 2001 (no prelo)
- 10- HASMANN, A.F.; SILVA, R. R. P.; PESSOA JR, A.; ROBERTO, I.C. Study of the Influences of pH and Temperatures on the Recovery of β -Xylosidase by BDBAC Reversed Micelles. In: **VI SHEB - SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS**, Maringá/PR, Programas e Resumos, 06-10/Dez.99, 1999.
- 11- HASMANN, A.F.; SILVA, R.R.P.; PESSOA JR, A.; ROBERTO, I.C. Determination and Evaluation of the Stability and Kinetic Parameters of the Enzyme β -Xylosidase In: **VI SHEB - SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS**, Maringá/PR, Programas e Resumos, 06-10/Dez.99, 1999.
- 12- HASMANN, F. A.; PESSOA-JR, A.; ROBERTO, I.C. VITOLO, M. Influência de Fragmentos Celulares de *S. cerevisiae* em Sistemas Micelares Reversos. In: **XIII SINA Ferm - Simpósio Nacional de Fermentações**. Teresópolis, 07-10/08/2000.
- 13- HASMANN, F. A.; VITOLO, M.; PESSOA-JR, A. Influência de fragmentos celulares de *S. cerevisiae* em sistemas micelares reversos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. vol. 26, supl. 1, p.78, 2000.
- 14- HASMANN, F.A.; PESSOA JR, A.; ROBERTO, I.C. Extração de β -Xilosidase por Micelas Reversas de CTAB: Avaliação de Parâmetros. In: **XX CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**, 24-28/10/99. Salvador/BA.
- 15- HASMANN, F.A.; ROBERTO, I.C.; VITOLO, M.; PESSOA-JR, A. Influência de Fragmentos Celulares de *Saccharomyces cerevisiae* em Sistemas Micelares Reversos. In: **XIII SINA Ferm - Simpósio Nacional de Fermentações**, UFRJ/Teresópolis, 07-10/Ago/2000.
- 16- PESSOA JR, A.; KILIKIAN, B. V.; MILAGRES, A. M. F.; RODRIGUES, E. M. G.; CORTEZ, E. V.; COSTA, S. A. Comparação de Diferentes Técnicas para Separação de Xilanases. ANAIS in: **ENZITEC 97 3º SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA**, Rio de Janeiro, Out/97.

- 17- SILVA, R.R.P.; CORTEZ, E.V.; COSTA, S.A.; ROBERTO, I.C.; HASMANN, F.A.; RODRIGUES, R.C.L.B.; ASSIS, A.N.; PESSOA JR, A. Influência do pH na Extração Líquido-Líquido de β -xilosidase por Micelas Reversas Utilizando Agente Tensoativo Catiônico. In: **XII SINAFERM - Simpósio Nacional de Fermentações**, UFU/Uberlândia, 04-07/Ago/1998.

3.7 Ely Vieira Cortez

Neste trabalho de doutorado utilizou-se o SMR para extrair as **enzimas intracelulares** xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XD) produzidas pela **levedura** *Cândida guilliermondii* utilizando o catiônico BDBAC com auxílio de **planejamento estatístico**. Testou-se, também, a extração com o agente tensoativo aniônico AOT, porém os rendimentos de extração nas fases aquosas II foram nulos e os aumentos de pureza das enzimas foram inferiores a um nas fases aquosas I. Como esta tese está em andamento e para possibilitar comparações com o BDBAC, serão estudadas extrações com outro agente tensoativo catiônico, o CTAB, uma vez que esse composto proporcionou resultados promissores na purificação da β -xilosidase quando conduzido por HASMANN (1999). Portanto, são apresentados a seguir os principais resultados obtidos com extração por SMR do agente tensoativo catiônico BDBAC.

Foi elaborado um planejamento estatístico para extração das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase, utilizando o agente tensoativo BDBAC, constituído dos seguintes fatores: concentração do co-solvente (%) na solução de microemulsão, concentração do tensoativo (M) na solução de microemulsão, e temperatura (°C). A variável pH foi fixada em 7,0 para preservar a estabilidade das enzimas e a condutividade elétrica foi fixada em 14 mS/cm, pois estudos preliminares mostraram ser este um valor que poderia proporcionar bons rendimentos. Foi, portanto, realizado um planejamento experimental completo do tipo 2^3 mais 3 repetições no ponto central, para avaliar a influência das variáveis na recuperação das enzimas XR e XD.

A Tabela 3.7.1 mostra todas as recuperações obtidas, até o momento, das enzimas XR e XD baseadas no planejamento experimental. No caso da XR foi possível, inclusive, mostrar os resultados do processo otimizado (ensaio 18), porém, estatisticamente não foi possível, ainda, otimizar a extração da XD na fase aquosa I.

Os resultados mostrados na Tabela 3.7.1 são altamente promissores, uma vez que o principal objetivo de purificar a XR é para obtê-la livre da XD, pois, como apresentado na revisão bibliográfica, a proposta mais ampla deste trabalho é produzir xilitol a partir de xilose em reator enzimático e a partir de reação catalisada pela enzima XR, sem a presença da enzima XD que é responsável pela degradação do nosso produto-alvo.

Alguns experimentos mostraram ser possível obterem-se as duas coisas: purificar e separar. Por exemplo, no ensaio 03 conseguiu-se a separação total das enzimas (para verificar os dados em mais detalhes é necessário recorrer ao texto do exame de qualificação do aluno, realizado em Dezembro de 2000) e ainda uma recuperação satisfatória (igual a 92%) para a XD na fase aquosa I. Nesse mesmo ensaio obteve-se uma ótima recuperação (igual a 145%) da XR na fase aquosa II. Esses resultados mostraram, portanto, que ao mesmo tempo que as enzimas podem ser separadas uma da outra, elas podem ser purificadas em fases diferentes do sistema.

O planejamento estatístico, possibilitou, até esta etapa do trabalho de doutorado, somente a otimização da extração da XR. A otimização da extração da XD está, ainda, em estudo.

Após otimização do processo, obteve-se um modelo matemático (Equação 3.7.1) e uma superfície de resposta (Figura 3.7.1) que representa a porcentagem de recuperação da XR (Y) em função das variáveis mais significativas na sua extração, ou seja, todas as variáveis avaliadas.

Equação 3.7.1

$$Y = 129,2 - 16,7.X_1 + 18,2.X_2 - 24,8.X_3 + 15,1.X_2.X_3 - 17,2.X_1^2 - 18,4.X_3^2$$

sendo: Y = Recuperação da XR (%);

X_1 = Temperatura ($^{\circ}$ C)

X_2 = concentração de co-solvente (% v/v)

X_3 = concentração de BDBAC (M)

Tabela 3.7.1 – Valores de recuperação das enzimas XR e XD obtidos após extração por micelas reversas do BDBAC. Resultados do planejamento experimental.

Ensaio	Condições de Extração			Recuperação (%)	
	T (°C)	Co-solvente (%)	BDBAC (%)	XD*	XR**
1	5,0	6,0	0,10,	4	140
2	30,0	6,0	0,10,	0	81
3	5,0	9,0	0,10,	92	145
4	30,0	9,0	0,10,	78	118
5	5,0	6,0	0,20,	0	47
6	30,0	6,0	0,20,	71	92
7	5,0	9,0	0,20,	5	116
8	30,0	9,0	0,20	1	94
9	17,5	7,5	0,15	0	122
10	17,5	7,5	0,15	5	123
11	17,5	7,5	0,15	7	131
12	5,0	7,5	0,15	89	122
13	30,0	7,5	0,15	ND	110
14	17,5	6,0	0,15	ND	142
15	17,5	9,0	0,15	ND	120
16	17,5	7,5	0,10	ND	126
17	17,5	7,5	0,20	ND	104
18	11,4	9,0	0,14	ND	135
19	5,0	7,5	0,15	74	ND
20	5,0	7,5	0,15	93	ND
21	5,0	6,0	0,15	8	ND
22	5,0	9,0	0,15	150	ND
23	5,0	7,5	0,10	156	ND
24	5,0	7,5	0,20	3	ND

*Recuperação na Fase Aquosa I; **Recuperação na Fase Aquosa II;

ND–não determinado por fazer parte da continuidade do planejamento estatístico da outra enzima.

A recuperação máxima de XR prevista pelo modelo, igual a 152%, foi obtida à temperatura de 11,4 °C, com hexanol a 9% (v/v) e concentração de BDBAC a 0.14 M. As extrações obtidas experimentalmente proporcionaram rendimento de 135% nesse ponto ótimo, porém apesar da diferença de 17% entre o valor previsto pelo modelo e o experimental, o resultado está dentro da faixa de valores esperados, considerando os erros da análise estatística.

Figura 3.7.1 – Superfície de resposta descrita pela Equação (3.7.1), correlacionando rendimento de extração (R) em função da temperatura (X_1) e concentração de BDBAC (X_3). Para se obter a superfície de resposta, fixou-se a concentração de co-solvente em seu nível superior, ou seja, 9%.

Os balanços de massa, superiores a 100%, obtidos para grande parte das extrações mostraram que o processo de extração por micela reversa tem a capacidade de eliminar inibidores presentes no meio inicial, além de reextrair a enzima em um tampão no qual esteja em condições mais favoráveis à atividade enzimática, como por exemplo, no pH ótimo de atividade da enzima.

Trabalhos publicados pelo aluno Ely Vieira Cortez.

- 1- CORTEZ, E.V.; FELIPE, M.G.A.; PESSOA-JR, A.; VITOLO, M. Recuperação da Xilose Redutase por Micela Reversa. In: SEMANA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA FCF/USP. 18-22/10/99, São Paulo/SP. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.35, supl.1, p.97, 1999.

- 2- CORTEZ, E.V.; ALMEIDA, M.G.F.; PESSOA-JR, A.; VITOLO, M. Fermentação do Hidrolisado de Bagaço de Cana: Avaliação das Atividades das Enzimas Xilose Redutase (XR) e Xilitol Desidrogenase (XD) de *Candida guilliermondii*. In: **XIII SINAIFERM - Simpósio Nacional de Fermentações**, UFRJ/Teresópolis, 07-10/Ago/2000.
- 3- CORTEZ, E. V.; ALMEIDA, M. G. F.; ROBERTO, I. C.; PESSOA-JR, A.; VITOLO, M. Extraction by reversed micelles of the intracellular enzyme xylose reductase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 91-93, 2001 (no prelo)

3.8 Luis Fernando Peffi Ferreira

Neste trabalho de mestrado utilizou-se o SMR para extrair a glicose-oxidase (GOD) na forma pura adquirida da SIGMA® produzidas pelo **fungo *Aspergillus niger*** utilizando o agente tensoativo catiônico CTAB com auxílio de **planejamento estatístico**. Como esta dissertação está em andamento serão, posteriormente, estudadas extrações com um agente tensoativo aniônico, o AOT.

O trabalho de purificação da glicose-oxidase faz parte de um projeto que está sendo executado em conjunto com a Faculdade de Engenharia Industrial (FEI) e faz parte de um convênio estabelecido entre as duas instituições (USP e FEI) que tem por objetivo principal a produção e purificação das enzimas glicose-oxidase e invertase para, posteriormente, serem utilizadas em reatores enzimáticos contínuos de membranas para produção de frutose e ácido glicônico a partir de sacarose.

Na Tabela 3.8.1 encontram-se os resultados iniciais das extrações da GOD, a partir de um planejamento experimental, e mostram que, também para a glicose oxidase a técnica de extração por sistemas micelares reversos é promissora, uma vez que se obtiveram valores de recuperação da enzima da ordem de 83% na Fase Aquosa II. Estudos complementares estão sendo feitos visando aumentar essa recuperação para valores mais próximos de 100%.

Tabela 3.8.1 – Valores de Recuperação (%) em atividade da enzima glicose-oxidase obtida após extração por sistemas micelares reversos em diferentes valores de pH, concentração de CTAB, condutividade elétrica, isooctano, hexanol e butanol. Tabela de resultados feita de acordo com um planejamento estatístico experimental misto.

Ensaio	1	2	3	4
pH	6,0	9,0	6,0	9,0
CTAB (M)	0,1	0,1	0,2	0,2
Condutividade Elétrica (mS/cm)	10,0	4,8	4,8	10,0

Ensaio	Isooctano	Hexanol	butanol	%R	%R	%R	%R
1	76	4	20	60,91	45,29	nf	60,82
2	81	9	10	nf	nf	nf	nf
3	85	4	10	28,98	nf	nf	nf
4	83	7	10	nf	nf	nf	nf
5	80	4	15	48,92	nf	nf	68,83
6	72	9	19	38,60	54,17	50,01	69,79
7	77	9	15	35,42	43,38	nf	59,65
8	75	8	17	57,20	47,96	52,70	68,08
9	79	8	13	46,29	38,77	27,74	42,04
10	76	6	18	63,20	49,39	83,10	60,55
11	76	4	20	60,39	43,94	nf	60,45
12	85	4	10	31,36	nf	nf	nf
13	72	9	19	46,10	50,38	52,51	70,41
14	81	9	10	nf	nf	nf	nf

nf – não houve formação de sistema bifásico.

Os dados da Tabela 3.8.1 estão sendo, no momento, avaliados estatisticamente. Mesmo assim, resolveu-se efetuar alguns experimentos complementares em função da análise dessa Tabela, pois como se pode observar no ensaio de número 10 obteve-se um rendimento de 83,10%. Esse foi o maior rendimento obtido até o momento e, enquanto se realizava a análise estatística, resolveu-se fazer alguns experimentos para tentar melhorar esse valor. Para isso, fixaram-se as concentrações de solventes (isooctano: 76%; hexanol: 6%; butanol: 18%) e a condutividade elétrica (4,8 mS/cm) e variaram-se o pH (valores iguais a 5,0; 6,0 e 7,0) e a concentração de CTAB (0,2; 0,25 e 0,3 M). Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 3.8.2.

Tabela 3.8.2 - Valores de Recuperação (%) em atividade da enzima glicose-oxidase obtida após extração por sistemas micelares reversos em diferentes valores de pH e concentração de CTAB. A condutividade elétrica foi de 4,8 mS/cm, isooctano de 76%, hexanol de 6% e butanol de 18%. Tabela de resultados feita de acordo com um segundo planejamento estatístico experimental do tipo completo 2^2 com 3 repetições no ponto central.

Ensaio	pH	CTAB (M)	%Recuperação na Fase Aquosa II
01	5,0	0,20	90,20
02	7,0	0,20	65,71
03	5,0	0,30	87,04
04	7,0	0,30	71,45
05	6,0	0,25	0
06	6,0	0,25	0
07	6,0	0,25	0

Os resultados da Tabela 3.8.2 indicam que foi possível aumentar o rendimento de recuperação da GOD na fase aquosa II de 83,10% para 90,20%, antes mesmo da otimização do processo de extração. Esses resultados são altamente promissores e mostram que há possibilidade de recuperar a GOD por sistemas micelares reversos com elevados rendimentos. Conclui-se, portanto, que há um promissor potencial para a purificação da enzima presente em meios fermentados complexos utilizando a técnica de extração líquido-líquido por micelas reversas.

Trabalhos publicados pelo aluno Luis Fernando Peffi Ferreira.

FERREIRA, L. F. P., LUCARINI, A. C., VITOLO, M., PESSOA-JR, A.. Avaliação de parâmetros cinéticos para a enzima glicose oxidase. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. vol. 26, supl. 1, p.77, 2000.

4. Materiais e Métodos

Este capítulo foi incluído para facilitar a compreensão dos resultados apresentados no item 3 e viabilizar a análise dos resultados inéditos obtidos pelo candidato, apresentados no item 5. É, na verdade, um resumo, uma vez que toda metodologia já foi detalhadamente descrita pelos seguintes alunos: RODRIGUES (1997), HASMANN (2000), CORTEZ (1998, 2000), FERREIRA (2001), COSTA (1998), RIBEIRO (2000), SOUZA (2000) e SILVA (2000).

4.1 Extração Líquido-Líquido em Sistemas Poliméricos de Duas Fases Aquosas

Os sistemas de fases foram preparados utilizando PEG (soluções estoque a 50%) e tampão fosfato (componentes do tampão: K_2HPO_4 e NaH_2PO_4 – solução estoque a 40%). Após a adição destes componentes em um tubo de centrífuga graduado de 15mL, 2,0 g do meio contendo a enzima foram adicionados. Em seguida, água deionizada foi adicionada ao tubo para ajustar a concentração final desejada dos componentes e, ainda, manter constante a massa final do sistema (10g). A variação da proporção entre NaH_2PO_4 e K_2HPO_4 é que definiu os valores do pH de extração. Após homogeneização dos componentes por agitação a 8 rpm durante 20 minutos (no caso de enzimas intracelulares presentes no homogeneizado celular) ou por agitação em vórtice durante 1 minuto (no caso de enzimas extracelulares), o tubo foi centrifugado (~400g por 10 min) na mesma temperatura da agitação para a separação das fases. Após a centrifugação, no caso das enzimas intracelulares, o tubo foi deixado em repouso por 1 hora para permitir que o sistema entrasse em equilíbrio. Após esse repouso, os volumes das fases foram anotados e as amostras retiradas para posterior análise.

A descrição mais detalhada desta técnica pode ser encontrada nas seguintes referências: COSTA (1998), SILVA (2000), SOUZA (2000) e RIBEIRO (2000).

4.2 Extração Líquido-Líquido em Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas

Foram selecionados para os estudos deste tipo de extração a enzima glicose 6-fosfato desidrogenase, o agente tensoativo não-iônico "óxido de n-decil-tetraetilenos ($C_{10}E_4$)" e o agente tensoativo catiônico DTAB (brometo de dodecil-trimetil-amônio). Para o preparo do sistema foi utilizada água deionizada do tipo Milli-Q® e tamponada em pH 7,2 (ácido cítrico 10 mM e fosfato de sódio 20 mM - Tampão de McIlvaine).

As condições de extração, como temperatura e concentração dos agentes tensoativos, foram definidas em função da estabilidade da enzima (SILVA *et al*, 1999^a) e da relação entre volumes das fases (R). As temperaturas testadas variaram entre ~18,8°C (temperatura do ponto crítico) para o tensoativo que será utilizado e ~21,0°C (máxima temperatura mostrada no diagrama de fases) quando as extrações foram conduzidas com o tensoativo $C_{10}E_4$ puro e de ~25°C a ~40°C quando as extrações foram conduzidas com a mistura entre o agente tensoativo não-iônico com o catiônico. Para se acompanhar a estabilidade das enzimas durante as extrações, preparou-se um tubo contendo somente a enzima e o tampão (sem a presença dos tensoativos) que foi mantido na mesma temperatura e mesmo período de tempo que os tubos contendo as enzimas submetidas à extração. A precisão da temperatura ($\pm 0,03^\circ\text{C}$) foi mantida com o auxílio de um aparelho termorregulável. Esse equipamento, por ser construído em vidro, proporcionou, ainda, a facilidade de verificar a mudança de fases do sistema sem ter que se retirar o frasco das condições de temperatura em que se encontrava. Para realizar as extrações, foram preparadas soluções-tampão contendo concentrações conhecidas dos agentes tensoativos e da enzima-alvo (G6PDH) e deixadas em repouso até atingir o equilíbrio, isto é, volume das fases. Após a separação das fases, foram medidos os seus volumes, retiradas amostras para análise das atividades enzimáticas e calculados os rendimentos de extração e os coeficientes de partição da enzima.

4.2.1 Construção da Curva Binodal

A curva binodal da solução aquosa tamponada de $C_{10}E_4$ foi determinada de acordo com o método do “ponto de névoa” descrito por BLANKSCHTEIN *et al.* (1986). Este método consiste em, visualmente, identificar a temperatura, $T_{névoa}$, na qual soluções com concentrações conhecidas de $C_{10}E_4$ tornam-se turvas à medida que se aumenta a temperatura. Cada solução de $C_{10}E_4$ foi colocada em um banho termorregulável transparente onde a temperatura foi variada em $0,01^\circ\text{C}$. Inicialmente cada solução foi resfriada a uma temperatura suficientemente baixa para que o sistema exibisse uma fase única, clara e homogênea. A partir desse ponto a temperatura foi sendo vagarosamente aumentada (de $0,01$ em $0,01^\circ\text{C}$) até que a solução ficasse turva. Esse procedimento foi feito em triplicada e o ponto de névoa foi definido como a média dos três valores obtidos. A curva binodal foi então obtida após serem traçados os valores de $T_{névoa}$ em função da concentração do tensoativo.

4.2.2 Avaliação da Estabilidade da Enzima G6PDH na Presença dos Agentes Tensoativos $C_{10}E_4$ e DTAB

Antes de se iniciar os estudos de extração foi avaliada a estabilidade da enzima-alvo na presença dos agentes tensoativos utilizados. Para isso incubou-se a enzima, por ~ 20 horas a 4°C e 21°C , na presença dos agentes tensoativos e mediu-se a atividade antes e após esse período de tempo. Foram testadas diferentes concentrações de enzima, para avaliar, também, esse efeito. A concentração da enzima variou de $\sim 9,8 \cdot 10^{-5}$ a $\sim 3,2 \cdot 10^{-5}$ $\text{g}_{enzima}/\text{g}_{solução}$ e foi diluída com tampão de McIlvaine em pH igual 7,2.

4.2.3 Determinação do Valor de R

Para determinar o valor de R (V_T/V_B) foram preparadas soluções-tampão contendo concentrações conhecidas dos agentes tensoativos e deixadas em repouso por diferentes períodos de tempo em uma determinada temperatura

até atingir equilíbrio, isto é, até que os volumes das fases permanecessem constantes em função do tempo. Após a separação das fases, foram medidos os seus volumes e calculados os valores de R. Para cada nova concentração de agente tensoativo foi construída uma curva de R em função da temperatura.

4.3 Extração Líquido-Líquido em Sistemas Micelares Reversos

O processo de extração foi conduzido em duas etapas. Na primeira delas, denominada de extração, a solução aquosa contendo a enzima-alvo foi misturada à microemulsão (agente tensoativo + solventes orgânicos) em partes iguais (5mL). Após agitação em agitador tipo vórtice por 1 min, a mistura foi centrifugada a 1677g por 10 min para separação das fases. Para a segunda etapa (reextração), a fase superior formada após a etapa de extração foi retirada e utilizada nos ensaios. Tal etapa foi realizada misturando-se 2,0 mL da pseudofase micelar com 2,0 mL de tampão de reextração adicionado de NaCl (de modo a se obter solução final na concentração de 1,0 M), com a finalidade de transferir (reextrair) a enzima da micela para a nova fase aquosa. Na segunda etapa, a amostra foi novamente agitada e centrifugada nas condições anteriormente citadas.

Os resultados da extração foram expressos em termos da atividade total recuperada (%) da enzima, tendo como referencial a quantidade inicial de enzima.

A descrição mais detalhada desta técnica pode ser encontrada nas seguintes referências: RODRIGUES (1997) e HASMANN (1999).

4.4 Métodos Analíticos

4.4.1 Teor de Proteínas Totais

Os teores de proteínas das amostras das extrações foram feitos de acordo com o método de LOWRY (1959) para os sistemas micelares reversos e de acordo com o método de BRADFORD (1976) para os sistemas poliméricos de duas fases aquosas. Em ambos os casos foi utilizada como padrão a

albumina de soro bovino (BSA –“bovine serum albumine”). Nas extrações conduzidas pelos sistemas micelares de duas fases aquosas não foram determinados os teores de proteínas, pois utilizou-se somente a enzima na forma pura.

4.4.2 Atividades Enzimáticas

Xilanase

A atividade de xilanase extracelular foi determinada em função da quantidade de açúcares redutores liberados após a ação da enzima sobre o substrato xilana, e está de acordo com o método de BAILEY *et al.* (1992). Os açúcares redutores foram dosados pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). A curva padrão foi feita usando xilose, nas concentrações entre 2 e 10 $\mu\text{mol/mL}$.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de ART, expressos como xilose, por minuto, a 50°C.

β -xilosidase

A atividade da β -Xilosidase foi determinada através da quantidade de p-nitrofenol liberada após a ação da enzima numa solução de p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (pNpX) (substrato) em água (KUMAR, RAMÓN, 1996).

Uma unidade de atividade de β -Xilosidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de p-nitrofenol/min.mL, nas condições descritas anteriormente.

Xilose Redutase (XR) e Xilitol Desidrogenase (XD)

Para a determinação das atividades enzimáticas da XR e XD empregou-se o método de ALEXANDER (1985). A atividade da XR foi determinada acompanhando-se a velocidade de oxidação do NADPH a 340 nm em

espectrofotômetro BECKMAN 640 B empregando-se xilose como substrato. A atividade da XD foi determinada medindo-se o aumento da absorvância a 340 nm devido à redução do NAD^+ a NADH , utilizando-se xilitol como substrato.

Uma unidade (U) de XR foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de 1 μmol de NADPH/min nas condições do experimento e uma unidade (U) de XD foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a redução de 1 μmol de NADP^+/min nas condições do experimento.

Hexoquinase e Glicose-6-Fosfato Desidrogenase

Estas determinações foram realizadas por análise espectrofotométrica à temperatura de 30°C a 340 nm, de acordo com o método descrito por BERGMEYER (1984). A atividade da hexoquinase foi medida em um sistema enzimático contendo glicose, Mg^{++} , adenosina-5-trifosfato (ATP), nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato (NADP^+) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) em tampão tris-HCl pH 7,5. A glicose foi fosforilada a glicose-6-fosfato (G-6-P) pela enzima hexoquinase (HK) na presença de ATP e Mg^{++} . Esta G-6-P foi, em seguida, oxidada pela enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), a gluconato-6-fosfato, na presença de NADP^+ que foi transformado em nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH). A atividade da enzima hexoquinase foi então determinada pela medida desta velocidade de formação de NADPH , verificada por espectrofotômetro. Para a determinação da atividade enzimática da G6PDH foi utilizado o mesmo princípio, com a realização de somente a segunda parte da reação anteriormente descrita.

Uma unidade (U) de HK e de G6PDH foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a redução de 1 μmol de NADP^+/min nas condições do experimento.

Glucose Oxidase

A velocidade de reação da glicose-oxidase foi determinada acompanhando-se o aumento da absorvância a 460 nm resultante da oxidação de o-dianisidina em um sistema acoplado à peroxidase. Uma unidade de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima capaz de oxidar um micromol de o-dianisidina por minuto a 25°C e pH 6,0 sob condições especificadas de concentração dos reagentes (KUNST *et al.*, 1983).

4.5 Metodologia de Análise dos Resultados

Para avaliação dos processos de extração foram analisados os seguintes parâmetros: K, A_e, AP, η_p, η_a.

Extração Líquido-Líquido em Sistemas Poliméricos de Duas Fases Aquosas (SDFA)

Coeficiente de Partição (K):

O coeficiente de partição é um parâmetro que exprime a eficiência de partição da enzima entre as duas fases presentes na extração líquido-líquido.

$$K = C_t/C_b$$

Sendo: C_t = Concentração (ou atividade) de enzima na fase superior

C_b = Concentração (ou atividade) de enzima na fase inferior

K = Coeficiente de partição (também pode ser expresso como: K_p ou K_{E, G6PDH})

K_p = coeficiente de partição de proteínas em geral

Balanço de Massa

$$\eta_a = \{[A_b] + [A_t]/[A_i]\} \cdot 100$$

Sendo: A_t = atividade enzimática na fase superior multiplicada pelo volume dessa fase [U],

A_b = atividade enzimática na fase inferior multiplicada pelo volume dessa fase [U],

A_i = atividade enzimática antes da extração multiplicada pelo volume da amostra colocada para extração [U].

η_a = balanço de massa (%)

Recuperação da Enzima na Fase Superior

$$R_{sup} = (A_t/A_i) \cdot 100$$

Sendo : A_t = atividade enzimática na fase superior multiplicada pelo volume dessa fase [U]

A_i = atividade enzimática antes da extração multiplicada pelo volume da amostra colocada para extração [U]

R_{sup} = recuperação da enzima na fase superior

Aumento de Pureza

É o aumento de atividade específica da enzima após o processo de extração. Foi obtido através da relação entre as atividades específicas da enzima antes (A_{ei}) e após a purificação (A_{e2}).

$$AP = A_{e2}/A_{ei}$$

sendo: A_{e2} = atividade específica da enzima após a extração, expressa em U/mg_{prot};
 A_{ei} = atividade específica da enzima antes da extração, expressa em U/mg_{prot};
AP = aumento de pureza (adimensional)

Extração Líquido-Líquido em Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas (SMDFA)

O cálculo do coeficiente de partição, do balanço de massa e da recuperação da enzima na fase superior foi feito da mesma forma que para o SDFA.

Proporção de Volumes (R)

$$R = V_t/V_b$$

Sendo: V_t = volume da fase superior do sistema bifásico
 V_b = volume da fase inferior do sistema bifásico

Extração Líquido-Líquido em Sistemas Micelares Reversos

Balanco de Massa

$$\eta_a = [(A_b + A_t)/A_i] \cdot 100$$

Sendo: A_t = atividade enzimática na fase aquosa obtida após a reextração da enzima multiplicada pelo volume dessa fase [U],

A_b = atividade enzimática na fase aquosa remanescente após o processo de extração multiplicada pelo volume dessa fase [U],

A_i = atividade enzimática antes da extração multiplicada pelo volume da amostra colocada para extração [U].

η_a = balanço de massa (%)

Recuperação da Enzima Após Extração e Reextração

$$R_E = (A_t/A_i) \cdot 100$$

Sendo : A_t = atividade enzimática na fase reextraída multiplicada pelo volume dessa fase [U]

A_i = atividade enzimática antes da extração multiplicada pelo volume total do sistema [U]

R_E = recuperação da enzima após processo de extração e reextração.

Aumento de Pureza

$$AP = A_{e2}/A_{ei}$$

sendo: A_{e2} = atividade específica da enzima após o processo de extração/reextração, expressa em U/mg_{prot};

A_{ei} = atividade específica da enzima antes da extração, expressa em U/mg_{prot};

AP = aumento de pureza (adimensional)

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo apresentam-se os resultados sobre *Extração Líquido-Líquido em Sistemas Micelares em Duas Fases aquosas* da enzima G6PDH obtidos pelo candidato em seu estágio realizado no M.I.T. (*Massachusetts Institute of Technology*, Cambridge, MA, USA) no período de Maio a Agosto de 2000.

5.1 Avaliação da Estabilidade da Enzima Frente aos Agentes Tensoativos $C_{10}E_4$ e DTAB.

Antes de se iniciarem os estudos de extração, foi necessário conhecer a estabilidade da enzima frente aos agentes tensoativos que seriam utilizados na extração, ou seja, o agente tensoativo não-iônico $C_{10}E_4$ e o catiônico DTAB, em diferentes temperaturas. Para isso, foram utilizadas diferentes concentrações de enzima, que variaram de $\sim 3,2 \cdot 10^{-5}$ a $\sim 9,8 \cdot 10^{-5} \text{ g}_{\text{enzima}}/\text{g}_{\text{solução}}$, pois dentro dessa faixa de valores não há interferência na posição da curva binodal do diagrama de fases (LIU *et al.*, 1998). Também tomou-se o cuidado para que as concentrações das enzimas presentes nas fases superiores e inferiores do sistema (obtidas após a extração) ficassem dentro dessa faixa de concentração.

A estabilidade da enzima G6PDH em diferentes temperaturas (10 a 50°C) foi anteriormente avaliada por RIBEIRO (2000) em tampão pH 7,2 para diferentes temperaturas (Figura 5.1) e verificou-se que até 40°C a enzima permanece estável (sem desnaturação) por pelo menos 1 hora de estocagem. Porém, alguns estudos complementares foram necessários para verificar essa estabilidade na presença dos agentes tensoativos que seriam utilizados nas extrações. Como se pode observar na Figura 5.2A e 5.2B, considerando-se os erros experimentais, os agentes tensoativos não influenciaram a atividade enzimática da enzima G6PDH quando presente nas concentrações de $\sim 3,2 \cdot 10^{-5}$ a $\sim 9,8 \cdot 10^{-5} \text{ g}_{\text{enzima}}/\text{g}_{\text{solução}}$ e conservadas a 4°C. É importante destacar que as estabilidades das enzimas na presença dos agentes tensoativos não foram testadas em temperaturas nas quais o

sistema tornava-se bifásico. Na verdade as estabilidades nessas temperaturas foram sendo verificadas durante as extrações.

Os resultados do estudo da estabilidade da enzima indicaram que as extrações poderiam ser iniciadas em temperaturas de até 40°C, porém evitando manter a essa temperatura por períodos superiores a 1 hora.

Figura 5.1 – Atividade da G6PDH em função do tempo frente a diferentes temperaturas de estocagem (RIBEIRO, 2000).

A

B

Figura 5.2 – (A) Atividade da enzima G6PDH em função da sua concentração na presença de tampão citrato/fosfato pH 7,2 e dos agentes tensoativos não-iônicos C₁₀E₄ e catiônico DTAB; (B) Atividade da enzima G6PDH em função da sua concentração na presença de tampão citrato/fosfato pH 7,2 e do agente tensoativo não-iônico C₁₀E₄ e catiônico DTAB, considerando-se os erros experimentais.

Foi, também, avaliada a estabilidade da enzima G6PDH na presença do agente tensoativo catiônico DTAB, sem a presença do C₁₀E₄, pois é possível que esse agente tensoativo não-iônico esteja protegendo a enzima contra os efeitos desnaturantes do DTAB. Para isso, incubou-se a enzima na

concentração de $\sim 0,00006836 \text{ g}_{\text{G6PDH}}/\text{g}_{\text{solução}}$ em tampão pH 7,2, a 4°C na presença de DTAB a 32,47 mM (ou 0,40%). Os resultados mostraram que após 24 horas de estocagem a enzima era 100% desnaturada. Isso pode ser explicado pelo fato de que o agente tensoativo catiônico, quando está em solução, sem a presença do C_{10}E_4 , fica livre para interagir com a enzima e ser atraído por suas cargas negativas. Dependendo de sua concentração no meio ele envolve completamente a enzima até desnaturá-la. Na presença do C_{10}E_4 , o DTAB passa a fazer parte das micelas (Figura 2.10) e com isso sua concentração livre no meio diminui. Além disso as enzimas ficam parcialmente protegidas pelas micelas que contém o agente tensoativo não-iônico como principal componente, pois elas formam camadas que as envolvem. Baseados nesse conceito de que somente o tensoativo presente na forma livre na solução (fora da micela) é capaz de desnaturar a enzima, resolveu-se determinar qual é a concentração mínima de DTAB em solução necessária para provocar essa desnaturação. Para isso testou-se a estabilidade da G6PDH a 4°C e a 21°C na presença de DTAB, em tampão pH 7,2 em concentrações que variaram de 0,1mM a 12 mM. Essas concentrações foram escolhidas em função da CMC do DTAB, que é de 16 mM em meio contendo baixa concentração de sais (Tampão de McIlvaine). Como nessa solução há a presença de sais fosfato e citrato (oriundos do tampão pH 7,2) o valor da CMC irá diminuir, uma vez que a presença de íons no meio aumenta a força de atração entre as cabeças polares dos agentes tensoativos e facilita a formação de micelas. Portanto a CMC do meio de extração da G6PDH é menor que 16 mM.

Como se pode ver na Figura 5.3, a enzima G6PDH é desnaturada, em torno de 75% após 19 horas de estocagem, mesmo na presença de DTAB a 0,1 mM independente da temperatura ser de 4 ou 21°C. No entanto a desnaturação foi muito maior (100%) quando a enzima foi mantida em DTAB 4mM a 21°C e em DTAB 6mM a 4°C, por 20 horas. Esses resultados indicaram que a concentração mínima de DTAB solúvel, livre do tensoativo não-iônico, necessária para desnaturar a G6PDH era ainda menor. Porém, como a concentração mínima testada (0,1 mM) estava muito abaixo do CMC do DTAB (16 mM) concluiu-se que não havia sentido continuar testando a

estabilidade da G6PDH frente a concentrações ainda inferiores às aquelas até então testadas, pois a interação do agente tensoativo catiônico livre com a enzima certamente segue princípios diferentes de quando está na presença do C₁₀E₄. A explicação mais aceita para esse fato é a de que a micela do agente tensoativo C₁₀E₄ está protegendo o sítio ativo da enzima contra os fortes efeitos das interações eletrostáticas do DTAB.

Figura 5.3 – Atividade após 19 horas de estocagem da G6PDH nas temperaturas de 4 °C (—♦—) e 21°C (—■—) em função da concentração do agente tensoativo DTAB (0,1 a 12 mM).

Determinação do Valor de R

R é definido como a proporção ($R = V_T / V_I$) entre o volume da fase superior (V_T) e o volume da fase inferior (V_I) do sistema micelar em duas fases aquosas e varia em função da temperatura e concentração dos agentes tensoativos. É uma variável muito importante a ser considerada no sistema, pois o seu valor exprime qual o espaço ocupado pelas micelas num sistema em uma determinada composição. Nas Figuras 5.4 a 5.6 estão mostrados os valores de R para diferentes composições do SMDFA. O conhecimento das

curvas de R em função de Temperatura para cada condição experimental, antes de se iniciarem as extracções, facilita a realização dos experimentos caso seja necessário variar valor de R na extração. Como se pode ver, com o aumento da temperatura há uma diminuição do valor de R.

Figura 5.4 – Proporção ($R = V_T / V_I$) entre o volume da fase superior (V_T) e o volume da fase inferior (V_I) em função da temperatura do SMDFA contendo $C_{10}E_4$ (4,1272%) e DTAB (0,3199%), em tampão pH 7,2.

Figura 5.5 – Proporção ($R = V_T / V_I$) entre o volume da fase superior (V_T) e o volume da fase inferior (V_I) em função da temperatura do SMDFA contendo somente $C_{10}E_4$ (4,1272%), em tampão pH 7,2.

Figura 5.6 – Proporção ($R = V_T / V_I$) entre o volume da fase superior (V_T) e o volume da fase inferior (V_I) em função da temperatura do SMDFA contendo $C_{10}E_4$ (4,1272%) e DTAB (0,1600% —◆—; 0,1400% —●—; 0,1200% —■—), em tampão pH 7,2.

5.3 Extração da Glicose-6-Fosfato Desidrogenase por SMDFA.

Extração com Agente Tensoativo Não-Iônico $C_{10}E_4$

Para se fazer uma avaliação do comportamento da enzima perante o processo de extração foram feitas, inicialmente, duas extrações utilizando-se somente o agente tensoativo não-iônico, no caso o $C_{10}E_4$, na concentração de 4,1272%. Essa concentração de tensoativo foi fixada pois com ela foi possível obter os melhores valores de coeficientes de partição para a enzima lisozima. Além disso, nessa concentração de $C_{10}E_4$ o sistema é mantido distante do ponto crítico, com maior linha de amarração, e, portanto, o sistema é mais estável (KAMEI, 2000). Como também era previsto, o valor do coeficiente de partição da enzima nas condições testadas foi inferior a 1 (Tabela 5.1), pois a enzima é hidrofílica e tem mais afinidade pela fase pobre do que pela fase rica em micelas. Constatou-se, ainda, que o agente tensoativo não desnaturou a enzima, pois o balanço de massa do processo fechou em ~100% para ambos os valores de R testados. Portanto, essas primeiras extrações foram importantes para confirmar a aplicabilidade da técnica para a extração da G6PDH.

Tabela 5.1 – Valores dos Coeficientes de partição da G6PDH ($K_{E,G6PDH}$), Balanço de Massa (η_a) obtidos após extrações por SMDFA, conduzidas em diferentes temperaturas, valores de R e com o agente tensoativo $C_{10}E_4$ a 4,1272%.

t_E (min)	T (°C)	R	$K_{E,G6PDH}$	R_{sup}^* (%)	η_a (%)
30	20,48	0,83	0,27	18,8	102,1
30	20,19	0,91	0,30	22,2	104,5

A partir desses resultados, planejaram-se outras 5 extrações em diferentes temperaturas e concentrações de $C_{10}E_4$ (Tabela 5.2). As condições de extração foram definidas de tal forma que o valor de R (relação entre os volumes das fases) fosse constante e próximo de 1 (condição na qual o procedimento de extração é mais facilmente conduzido) e que essas extrações fossem conduzidas em diferentes linhas de amarração. Para se conseguir o valor de R próximo de 1, foi necessário determinar o ponto médio de cada linha de amarração (Figura 5.7). O objetivo desses experimentos foi verificar se o modelo matemático desenvolvido para prever o coeficiente de partição de enzimas hidrofílicas se aplicava à enzima glicose-6-fosfato desidrogenase. O modelo utilizado foi o cilíndrico e está apresentado na *Revisão Bibliográfica* (item 2.2).

Tabela 5.2 - Valores dos Coeficientes de partição da G6PDH ($K_{E,G6PDH}$), do Balanço de Massa (η_a) e da Recuperação da G6PDH na fase superior (R_{top}) do sistema, obtidos após extrações por SMDFA conduzidas em diferentes temperaturas e concentrações do agente tensoativo não iônico $C_{10}E_4$.

T_E (h)	T (°C)	$C_{10}E_4$ (% p/p)	R	$K_{E,G6PDH}$	η_a^* (%)	R_{top} (%)
18	19,23±0,03	2,4221	0,57	0,50	105,3	23,3
		2,4213	0,76	0,51	98,9	27,7
		2,4219	0,75	0,49	101,4	27,3
		2,4207	0,76	0,52	99,0	27,8
	Média	2,4215	0,71	0,51	101,2	26,5
18	19,73±0,03	3,1029	0,75	0,37	97,9	21,3
		3,1031	0,78	0,40	98,7	23,3
		3,1026	0,81	0,40	99,3	24,3
		3,1011	0,82	0,38	97,0	23,3
	Média	3,1024	0,79	0,39	98,2	23,1
18	20,18±0,03	3,8661	0,85	0,29	100,2	19,9
		3,8662	0,93	0,31	97,0	21,6
		3,8642	0,97	0,30	97,5	22,0
		3,8655	0,82	0,29	101,0	19,7
	Média	3,8655	0,89	0,30	98,9	20,8
18	20,68±0,03	4,6727	0,94	0,23	107,5	18,9
		4,6742	0,82	0,25	107,7	18,7
		4,6757	0,94	0,25	106,5	20,2
		4,6765	1,07	0,26	102,3	22,6
	Média	4,6748	0,94	0,25	106,0	20,1
18	21,20±0,03	5,5070	0,88	0,19	105,2	15,3
		5,5100	1,00	0,19	97,0	15,5
		5,5046	1,00	0,21	100,0	17,3
		5,5124	1,23	0,20	91,6	18,2
	Média	5,5085	1,03	0,20	98,5	16,6

Figura 5.7 – Curva Binodal Experimental de uma solução aquosa do agente tensoativo $C_{10}E_4$ copiada do artigo de LIU *et al.* (1996) (●), curva construída a partir dos dados de KAMEI (1998) (○) e curva binodal experimental (◆) desse mesmo tensoativo, construída neste trabalho. As condições de extração (■) que foram escolhidas para serem realizadas neste trabalho visavam testar o modelo matemático proposto por NIKAS *et al.* (1992) e que estão numericamente mostrados na Tabela 5.2. As diferenças entre os perfis das curvas binodais está no número do lote do reagente.

Na Figura 5.7 encontram-se três curvas binodais: 1) obtida da literatura (LIU *et al.* 1996); 2) construída neste trabalho experimentalmente com o novo lote de C₁₀E₄ e; 3) construída por KAMEI (2000) a partir de um outro lote de C₁₀E₄. Os pontos experimentais selecionados para fazer as extrações, que também estão apresentados nessa figura, foram definidos com base na curva binodal contruída por KAMEI (2000) e deveriam proporcionar um valor de R próximo a 1. Teoricamente, para se obter o valor de R=1 deve-se: 1) definir em qual linha de amarração se deseja fazer a extração (ou seja, definir a temperatura); 2) retirar da curva binodal os valores de ϕ_B e ϕ_T e calcular a média aritmética entre eles. Porém, como se pode ver na Tabela 5.2, os valores experimentais obtidos para R foram, na maioria das extrações, inferiores a 1. Para explicar essa diferença nos valores de R, resolveu-se construir uma nova curva binodal, pois o agente tensoativo utilizado neste trabalho possuía um número de lote diferente daquele utilizado na curva de KAMEI (2000). Após comparação entre as curvas binodais, pôde-se confirmar, como se pode ver na Figura 5.7, que o valor de R seria diferente e inferior a 1, pois a curva de KAMEI (2000) estava deslocada para cima, fazendo com que a proporção entre o V_T e o V_B fossem menores. No entanto, é importante destacar que o fato de os valores de R terem sido, em geral, inferiores a 1 não impediu a análise dos resultados.

A Figura 5.9 mostra os coeficientes de partição obtidos experimentalmente para a enzima G6PDH, em função da temperatura de extração por sistemas micelares mistos de duas fases aquosas utilizando o agente tensoativo não-iônico C₁₀E₄. O fato do $K_{E,G6PDH}$ ser sempre menor que 1 indica que essa proteína migra preferencialmente para a fase pobre em micelas (fase diluída). Fica também claro que, à medida que a temperatura se distancia da temperatura crítica ($T_c \cong 18,8^\circ\text{C}$), $K_{E,G6PDH}$ diminui.

Comparando-se os dados da Figura 5.9 com os dados obtidos por LIU *et al.* (1996) verifica-se que, dentre as proteínas citadas por esses autores, a curva experimental para a G6PDH é similar à curva construída para a enzima catalase e mostra que essas duas enzimas possuem as características mais próximas das encontradas na literatura corrente. A catalase possui massa

molar de ~ 232.000 Da e raio hidrodinâmico (R_p) igual a $52 \text{ \AA}$ enquanto que a G6PDH possui massa molar de ~ 110.000 Daltons e raio hidrodinâmico (R_p) igual a $68 \text{ \AA}$. As outras duas proteínas citadas no artigo possuem massas molares de 44.000 Da (ovoalbumina) e 12.400 Da (citocromo C). Observa-se, no entanto, que o perfil da curva de K_p em função da temperatura para o citocromo C ($R_p = 19 \text{ \AA}$) e para a ovoalbumina ($R_p = 29 \text{ \AA}$) também é semelhante à da G6PDH sendo que a diferença entre as massas molares e raios hidrodinâmicos faz com que as curvas dessas duas proteínas sejam deslocadas no sentido de obter maiores valores de K_p . Essas observações sugerem que: (1) durante a extração a proteína é transferida para a fase que tem maior volume livre disponível (neste caso, é a fase pobre em micelas); (2) essa tendência é mais forte quanto maior a diferença entre a temperatura de extração (T) e a temperatura do ponto crítico (T_c); (3) essa tendência também é mais forte quanto maior a massa molar da proteína. Em outras palavras, essas observações são consistentes com a suposição de que as interações por volume de exclusão têm um papel dominante na partição da enzima.

Para se comparar os resultados experimentais mostrados anteriormente (Tabela 5.2 e Figura 5.8) com o modelo matemático proposto por NIKAS *et al.* (1992) deve-se assumir que as proteínas hidrofílicas (como é o caso da G6PDH) e as micelas do agente tensoativo não-iônico $C_{10}E_4$ não interagem entre si. Assume-se, ainda, que a solução aquosa de $C_{10}E_4$ pode formar micelas longas, cilíndricas, polidispersas e rígidas (BLANKSCHTEIN *et al.*, 1996; PUVVADA, BLANKSCHTEIN, 1990; NIKAS *et al.*, 1992) e que a proteína de G6PDH também se apresenta na forma rígida. Além das condições anteriormente descritas, necessita-se que, para a aplicação do modelo, a proteína (no caso a G6PDH) esteja presente em baixas concentrações ($0,00006836 \text{ g}_{G6PDH}/\text{g}_{\text{solução}}$) e que a solução possua baixa concentração salina (tampão de McIlvaine a 18 mM). Considerando que: o raio hidrodinâmico (R_p) da enzima G6PDH é $68 \text{ \AA}$ (calculado conforme dimensões dos cristais isomorfos obtidos por ROWLAND *et al.*, 1994); que o raio de corte transversal (R_o) das micelas cilíndricas constituídas pelo agente tensoativo $C_{10}E_4$ é $21 \text{ \AA}$; que a fração volumétrica do tensoativo na fase

superior (ϕ_T) e na fase inferior (ϕ_B) são função da temperatura (ver Tabela 5.3), tem-se que os valores de K_p (ou $K_{E,G6PDH}$ ou K_{pc}) teóricos possuem tendências similares aos obtidos experimentalmente, como se pode ver na Tabela 5.3 e na Figura 5.8. Um dos fatores que pode ter influenciado na diferença entre os valores teóricos obtidos a partir do modelo e os valores experimentais, pode ser atribuído ao fato de que a G6PDH é uma proteína globular, porém com formato elipsoidal (ROWLAND *et al.* 1994) e não-esférico, como considerado pelo modelo.

Verifica-se, ainda, que o valor de $K_{E,G6PDH}$ previsto através dos valores de ϕ retirados da curva binodal construída por LIU *et al.* (1998) e dos valores retirados da curva binodal construída neste trabalho (que é praticamente coincidente com a curva binodal apresentada por NIKAS *et al.*, 1992, como se pode ver na Figura 5.7) possui uma pequena diferença. Ela é atribuída ao número do lote do agente tensoativo não-iônico $C_{10}E_4$, já que os equipamentos e a metodologia utilizadas foram os mesmos.

Considerando os resultados obtidos neste trabalho e os dados mostrados na literatura pode-se afirmar que o modelo proposto apresenta uma razoável aproximação no cálculo do coeficiente de partição de proteínas hidrofílicas em sistemas de duas fases aquosas micelares de agentes tensoativos não-iônicos.

Tabela 5.3 – Valores de $K_{E,G6PDH}$, obtidos experimentalmente e valores obtidos teoricamente** de acordo com o modelo de exclusão pelo volume.

Text (°C)	ϕ_T	ϕ_B	$K_{E,G6PDH}$ (experimental)	K_p ou K_{pc} ou $K_{E,G6PDH}$ * (teóricos**)
19,20	0,039820	0,008621	0,50	0,47
19,70	0,057199	0,004867	0,39	0,28
20,20	0,074577	0,002750	0,30	0,17
20,70	0,091954	0,001555	0,25	0,11
21,20	0,109332	0,000881	0,20	0,07

*nesse caso o coeficiente de partição pode ser expresso dessas três formas

**modelo de exclusão pelo volume: $K_{pc} = \exp[-(\phi_T - \phi_B)fc(1 + R_p/R_o)^2]$ – Exemplo de cálculo: Anexo III.

Figura 5.8 - Valores de $K_{E,G6PDH}$ obtidos experimentalmente (—■—) e valores obtidos teoricamente (—◆—) de acordo com o modelo de exclusão pelo volume, em função da temperatura, após extração por sistemas micelares mistos em duas fases aquosas utilizando o agente tensoativo não-iônico $C_{10}E_4$ (dados experimentais retirados da Tabela 5.3).

Extração com Agente Tensoativo Não-iônico $C_{10}E_4$ + Agente Tensoativo Catiônico DTAB

Os estudos de extração tiveram continuidade com a realização de extrações utilizando uma mistura contendo o agente tensoativo não-iônico $C_{10}E_4$ e agente tensoativo catiônico DTAB (utilizado como ligante não-específico) e cujos resultados estão apresentados na Tabela 5.4. A primeira extração (Ensaio nº 01) foi conduzida por 20 horas e como se pode ver nessa tabela a enzima foi totalmente desnaturada, uma vez que não foi encontrada atividade enzimática na fase superior, nem na inferior do sistema (o balanço de massa fechou em zero). Em função disso resolveu-se realizar uma nova extração (Ensaio nº 02), nas mesmas condições de temperatura (34,69°C) e de concentrações dos tensoativos ($C_{10}E_4$ e DTAB), porém conduzida por

apenas duas horas (as amostras das fases foram retiradas após 2 horas). Esse período foi definido em função do tempo necessário para que as fases superior e inferior entrassem em equilíbrio. Como se pode ver na Tabela 5.2 os valores das atividades da G6PDH nas fases superior e inferior foram diferentes de zero e indicou que a redução do tempo de extração de 20 para 2 horas contribuiu para preservar parte da atividade enzimática. Mesmo tendo sido obtida uma baixa eficiência de extração ($\eta_a \cong 20,3\%$), conseguiu-se obter elevados valores de coeficientes de partição da enzima ($K_{E,G6PDH} \cong 33,4$) e esse resultado indicou que a adição de agente tensoativo catiônico como um “ligante não-específico” é promissora, porém deve ser melhor estudada para evitar a desnaturação da enzima. A desnaturação de ~80% da G6PDH durante a extração foi atribuída, inicialmente, a agente tensoativo catiônico (DTAB), já que, de acordo com a literatura, são poucos os casos em que um agente tensoativo não-iônico não desnatura a enzima.

Em função dos resultados dessas duas primeiras extrações, os experimentos seguintes foram planejados de tal forma que focassem a redução do contato da enzima com esse tensoativo catiônico, já que a sua eliminação total do sistema poderia baixar o coeficiente de partição para valores menores que 1, como mostrado anteriormente. Sendo assim foram testadas algumas novas condições de extração:

- 1) variação da relação (R) entre o volume das fases para a faixa de 0,5 a 4.
- 2) variação da concentração do agente tensoativo DTAB para a faixa de 0,3199 a 0,1200%.

Os experimentos nos quais se reduziram a relação entre o volume das fases, R, (redução do volume da fase superior, para onde a enzima deve ser transferida) tiveram por objetivo principal diminuir a possibilidade de contato da enzima com o tensoativo catiônico. Essa hipótese baseia-se no fato de que o número de moléculas de enzimas na fase superior do sistema permanece constante (quando está na presença de um tensoativo iônico) independente do volume da fase. Porém quando esse volume é reduzido ocorre a diminuição do número de moléculas de tensoativos livres (não

ligados às micelas) e conseqüentemente há menos moléculas disponíveis para interagir com as enzimas.

Nessas novas condições de extração, a temperatura foi, obviamente, alterada em função da nova composição do meio, como pode ser visto na Tabela 5.4. Por exemplo, no caso de $R = 0,5$ (Ensaio nº 03) a temperatura foi elevada para 40,58°C enquanto que para $R = 1$ (Ensaio nº 04) a temperatura foi mantida a 36,96°C (Figura 5.4) para que se obtivesse um sistema bifásico na proporção proposta.

A outra forma encontrada para reduzir o número de moléculas livres desse agente tensoativo catiônico foi a redução da concentração de DTAB no sistema. Como esperado, essas modificações nas concentrações de tensoativos também alteraram o ponto crítico do sistema ternário (água/tensoativo catiônico/tensoativo não iônico) e as extrações foram realizadas nas temperaturas mostradas na Tabela 5.4 (Ensaio nº^{os} 05 a 20).

Tabela 5.4 – Coeficientes de partição da G6PDH ($K_{E,G6PDH}$), Recuperação da Enzima na Fase Superior e Balanço de Massa (η_a), obtidos após extrações por SMDFA, conduzidas por diferentes períodos de tempo em diferentes temperaturas (e, conseqüentemente, diferentes valores de R) com os agentes tensoativos $C_{10}E_4$ (4,1272%) em diferentes concentrações de DTAB.

Ensaio n°	T (°C)	Condições de Extração			R=V _T /V _B	R _{Top} (%)	K _{E,G6PDH}	η _a (%)	Atividades Enzimáticas (O.D./min)		
		DTAB (%)	t _E * (h)	Fase Super.					Fase Inferior	Enz. Inicial	
01	34,69		20,0	4,0	0	-**	0	0	0	0,2896	
02	34,69	0,3199	2,0	4,0	20,8	33,4**	22,3	0,0750	0,0025	0,2818	
03	40,58		0,5	0,5	0	-	0	0	0	0,3153	
04	36,96		0,5	1,0	19,2	1,1	36,8	0,1145	0,1027	0,2952	
05	27,25	0,1600	0,5	1,0	75,6	10,1	82,9	0,4808	0,0477	0,3217	
06	27,44			1,1	79,2	9,7	86,7	0,4877	0,0505	0,3217	
07	25,09	0,1200	0,5	1,3	69,1	2,4	90,5	0,3891	0,1602	0,3217	
08	25,54			1,1	67,9	2,8	90,7	0,4266	0,1504	0,3217	
09	28,65			0,4	50,8	5,0	80,2	0,6315	0,1276	0,3217	
10	26,68			0,1400	0,5		78,8	5,8	91,8	0,4657	0,0807
		1,0	77,4			5,2	91,6	0,4575	0,0881	0,3024	
		75,6	5,9			88,6	0,4745	0,0820	0,3139		
		80,3	5,6			94,7	0,4926	0,0878	0,3139		
		72,0	4,0			90,5	0,4530	0,1152	0,3139		
11	26,00			1,4	77,5	4,2	91,4	0,4214	0,0998	0,3139	
12	25,96			1,8	86,6	4,6	95,3	0,4259	0,0930	0,3139	
13	25,92			2,5	97,3	4,1	107,0	0,4300	0,1044	0,3199	
14	25,66			2,9	92,0	3,5	101,2	0,4832	0,1398	0,4098	
15	25,72			3,1	86,2	3,5	94,0	0,4671	0,1333	0,4098	
16	25,51			3,3	84,8	3,2	93,0	0,4543	0,1430	0,4098	
17	25,66			2,8	86,7	3,7	95,3	0,4953	0,1356	0,4198	
18	25,66			2,5	84,1	3,6	93,7	0,4964	0,1394	0,4198	
19	25,66			2,1	82,8	3,7	93,8	0,5164	0,1411	0,4198	
20	25,66			2,7	91,0	3,7	95,0	0,4962	0,1338	0,4198	

η_a – recuperação total em atividade enzimática (balanço de massa), t_{extr.} = tempo de extração $K_{E,G6PDH} = \frac{\text{Ativ. G6PDH Fase Superior}}{\text{Ativ. G6PDH Fase Inferior}}$; **Média de 4 repetições

Figura 5.9 - Coeficientes de partição da G6PDH ($K_{E,G6PDH}$), Recuperação da Enzima na Fase Superior (R_{top}) (%) e Balanço de Massa da Enzima (η_a) obtidos após extrações por SMDFA conduzidas com os agentes tensoativos $C_{10}E_4$ (4,1272%) em diferentes concentrações de DTAB (0,12000, 0,14000, 0,16000 e 0,3199%) e mantendo-se $R \cong 1$.

De acordo com a Tabela 5.4 e com a Figura 5.9 pode-se observar que o coeficiente de partição da G6PDH ($K_{E,G6PDH}$), o balanço de massa da enzima no sistema (η_a) e a recuperação da enzima na fase superior depende de vários fatores, dentre eles a temperatura (e conseqüentemente o valor de R), o tempo de extração e, principalmente, a concentração do agente tensoativo catiônico DTAB. Comparando-se o ensaio número 01 com o ensaio 02 observa-se, nitidamente, que um tempo prolongado de exposição (20 horas) da enzima ao agente tensoativo catiônico tem um efeito altamente desnaturante, pois 100% da enzima perdeu a atividade. Portanto esse tempo de extração foi reduzido ao longo do trabalho chegando ao limite inferior de 30 minutos. Esse baixo período

de tempo utilizado para as extrações não influenciou negativamente a separação das fases. Verificou-se, também, que a desnaturação da enzima não depende somente do tempo de extração, mas também da temperatura e da concentração do tensoativo catiônico. Comparando-se o ensaio 03 com o ensaio 04, onde o tempo de extração e a concentração do DTAB foram mantidos constantes, verificou-se que a redução da temperatura de 40,58 para 36,96°C possibilitou um aumento na recuperação total da enzima (balanço de massa) de 0 para 36,8%. Concluiu-se, portanto, até esse ponto que a redução da temperatura e do tempo de extração contribuíam positivamente para o rendimento do processo de extração. Considerando que para se reduzir a temperatura era necessário, também, reduzir a concentração de DTAB conseguiu-se diminuir o efeito negativo sobre a G6PDH de duas variáveis simultaneamente. As reduções dos valores dessas duas variáveis proporcionou uma melhora significativa dos resultados. Isso pode ser visto quando são comparados os ensaios 05 a 10 com os ensaios 01 a 04. Esses ensaios de número 05 a 10 mostraram que a concentração de DTAB é decisiva na estabilidade da enzima durante a extração. Como se pode observar, os ensaios 05 e 06, que foram realizados com DTAB a 0,16%(p/p) proporcionaram um coeficiente de partição da enzima satisfatório, porém o balanço de massa fechou em aproximadamente 84%. Isso significa que as micelas formadas pelo agente tensoativo não-iônico ($C_{10}E_4$) continham uma quantidade tal de DTAB que a força eletrostática gerada era suficiente para atrair uma porção significativa de G6PDH. Porém a fração solúvel de DTAB (que não foi incorporada à micela ou que está em equilíbrio) degradou aproximadamente 15% da G6PDH. Esse fato levou ao estudo da extração com menores concentrações de DTAB.

Como se pode verificar nos Ensaios 07 a 09 (concentração de DTAB = 0,12%(p/p), a redução na concentração do tensoativo catiônico diminuiu o seu efeito desnaturante, mas como consequência houve redução no valor do coeficiente de partição (de ~10 para ~3). Esses resultados mostraram que existe um equilíbrio entre os agentes tensoativos presentes nas micelas com os tensoativos livres. Ou seja, mesmo se reduzindo a quantidade de moléculas

disponíveis no meio, sempre haverá uma parte delas livre no meio que serão responsáveis pela degradação de parte da enzima presente em temperaturas superiores à ambiente.

A

B

Figura 5.10 - Recuperação da Enzima na Fase Superior (%), Balanço de Massa da Enzima (η_a) e Coeficientes de partição da G6PDH em função de diferentes valores de R (V_T/V_B), obtidos após extrações por SMDFA conduzidas com os agentes tensoativos $C_{10}E_4$ (4,1272%) e DTAB (0,14%).

Para se verificar a reprodutibilidade das extrações, os ensaios 14 e do 17 ao 20 foram realizados nas mesmas condições: temperatura = 25,66°C, $C_{10}E_4 = 4,1272\%$ (p/p), DTAB = 0,14% e $R \approx 2,5$. Os resultados obtidos apresentaram boa reprodutibilidade e proporcionaram um balanço de massa médio de 95,3%, recuperação da enzima na fase superior de 86,9% e coeficiente de partição igual a 3,6.

Novas extrações foram realizadas em temperaturas próximas às anteriores para se verificar a possibilidade de se obter balanços de massas mais próximos de 100% e rendimentos superiores aos até então obtidos. Como se pode ver esse objetivo foi atingido com os ensaios de números 12 e 13, onde foram obtidos balanços de massa de 107,0 e 101,2% e rendimentos em enzima de 97,3 e 92,0%, respectivamente.

Quando comparado com vários processos de purificação existentes na literatura, esses resultados foram considerados promissores, principalmente se considerarmos que eles foram realizados em somente uma etapa (ver Tabela 5.5). Considerou-se, também, que a extração da G6PDH utilizando esses tensoativos foi realizada em uma condição tal que dificilmente obter-se-iam melhores resultados. Isso mostrou que o uso do ligante não-específico DTAB foi eficiente no processo de extração de uma enzima hidrofílica em sistemas micelares mistos de duas fases aquosas.

Tabela 5.5 – Rendimentos de purificação da enzima G6PDH, obtidos em vários processos.

Etapas	Processos de Purificação	Fonte da Enzima	Rendimento (%)	Referências
Simples	Sistemas micelares mistos em duas fases aquosas	Pura de <i>L. mesenteroides</i>	~97,3%	ESTE TRABALHO
Simples	Cromatografia de troca-iônica em leito fluidizado	Homogeneizado de leveduras	98	CHANG, CHASE (1996)
Simples	Cromatografia de troca-iônica em leito fluidizado	Homogeneizado de leveduras	99	CHANG <i>et al.</i> (1995)
Simples	Cromatografia de afinidade em leito fluidizado usando perfluoro polímero na forma sólida	Homogeneizado de leveduras	84	McCREATH <i>et al.</i> (1995)
Simples	Cromatografia de afinidade em leito fluidizado usando perfluoro polímero na forma de emulsão	Homogeneizado de leveduras	77	McCREATH <i>et al.</i> (1994)
Simples	Partição em sistemas de duas fases aquosas induzida pela temperatura	Pura de <i>S. cerevisiae</i>	73	ALRED <i>et al.</i> (1994)
Simples	Partição em sistemas de duas fases aquosas induzida pela temperatura	Homogeneizado de leveduras	50	ALRED <i>et al.</i> (1994)
Múltiplas	Precipitação com PEG + cromatografia de troca-iônica em Q-sepharose + membrana de afinidade	Extrato de levedura pré-purificado	51	CHAMPLUVIER, KULA (1992)
Múltiplas	Centrifugação + precipitação com PEG+ partição em sistemas de duas fases aquosas por afinidade em 3 etapas + cromatografia de troca-iônica em DEAE celulose	Homogeneizado de leveduras	43-48	JOHANSSON, JOELSSON (1985)
Múltiplas	Precipitação com sulfato de amônio + diálise + Duas etapas de cromatografia	Extrato de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	46,7	TSAI, CHEN (1998)
Múltiplas	Precipitação com sulfato de amônio + cromatografia de troca-iônica em DEAE celulose + cromatografia de afinidade + gel filtração	Homogeneizado de leveduras	53	FARMER, EASTBERRY (1991)

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Apresenta-se na Tabela 8.1, um quadro sumário contendo os principais resultados oriundos das dissertações e teses arroladas até o momento.

Tabela 8.1 – Sumário com os principais resultados obtidos nos trabalhos sobre extração líquido-líquido de enzimas utilizando meio complexos que envolveram o autor.

Autor	Processo/Enzima	AP*	R*(%)	BM*
PESSOA-JR (2000)	SMDFA/G6PDH	ND	97,3	107,0
COSTA (1998)	SDFA/Xilanase	1,34	80,0	ND
RIBEIRO (2001)	SDFA/G6PDH	2,28	97,7	~100
SOUZA (2001)	SDFA/HK	2,52	102,0	102,0
RODRIGUES (1997)	SMR/Xilanase	2,30 ⁽¹⁾ 7,00 ⁽²⁾	29,4 ⁽¹⁾ 76,1 ⁽²⁾	105,5
HASMANN (1999)	SMR/ β -xilosidase	2,00 ⁽³⁾ 5,34 ⁽⁴⁾	43,0 ⁽³⁾ 44,3 ⁽⁴⁾	~100
CORTEZ (2000)	SMR/XR	4,8	135,0	135,0
	SMR/XD	ND	92,0	92,0
FERREIRA (2001)	SMR/GOD	ND	83,1	83,1

*AP - aumento de pureza; R - recuperação da enzima na fase de interesse; BM- balanço de massa; ND – não determinado; ⁽¹⁾ e ⁽²⁾ – fase aquosa II e fase aquosa I, respectivamente; ⁽³⁾ e ⁽⁴⁾ extração com BDBAC e CTAB, respectivamente.

O sumário apresentado na Tabela 8.1 mostra os resultados mais relevantes obtidos em cada técnica e para diferentes enzimas. Em função dessa Tabela e de outros resultados relevantes obtidos em todos estudos de Extração Líquido-Líquido de Enzimas, pode-se concluir que:

- Em geral, o aumento de pureza das enzimas obtidos por Extração Líquido-Líquido é baixo. Isso ocorre, pois essa técnica é considerada de baixa resolução ou de pré-purificação;
- Para todas as técnicas de extração estudadas até o momento têm-se verificado balanços de massa e recuperações satisfatórias, ou seja, próximas de 100%;
- As extrações por micelas reversas têm mostrado ser as mais seletivas dentre as três testadas. Na purificação de xilanase obtida por Rodrigues (1997) obtiveram-se somente duas bandas na eletroforese após a

extração, enquanto que as extrações conduzidas por CORTEZ (2000) possibilitaram separar duas enzimas-alvo, a XR e a XD, simultaneamente em fases diferentes do sistema.

- Antes de se iniciar qualquer estudo de extração deve-se avaliar a estabilidade das enzimas em função do pH e temperatura, já que essas variáveis são importantes para os 03 processos até agora estudados;
- Os primeiros estudos de extração devem ser feitos com a enzima-alvo na forma pura, para avaliar o seu comportamento perante o processo, sem a presença de agentes contaminantes;
- A determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos, antes e após as extração, tem mostrado ser uma boa forma de se avaliar as alterações sofridas pelas enzimas;
- O uso de planejamento experimental, para otimizar as purificações por processos de extração, tem mostrado ser útil, pois tem proporcionado modelos matemáticos que prevêem valores teóricos coerentes com os obtidos experimentalmente. Tem, também, possibilitado a identificação de interações entre variáveis importantes que influenciam no sistema de extração. Porém a avaliação isolada de algumas variáveis terá que ser feita sempre que se quiser demonstrar com mais detalhes algum efeito fenomenológico;
- A análise estatística mostrou que é necessário avaliar mais de uma resposta para satisfazer as exigências de purificação de enzimas.

Baseado nas conclusões apresentadas, apresenta-se a seguir as perspectivas de continuidade dos trabalhos de Extração Líquido-Líquido de Enzimas.

- Realizar estudos utilizando planejamento experimental, porém, utilizando mais de uma resposta. No caso do SDFA serão considerados, além do valor de K, também o balanço de massa, o aumento de pureza e a recuperação da enzima em uma das fases do sistema. No caso do SMF serão considerados, além da recuperação da enzima em uma das fases do sistema, o aumento de pureza e o balanço de massa;

- Continuar os estudos por SDFA, porém utilizando ligantes de afinidade para aumentar a seletividade do processo;
- Continuar os estudos de SMDFA com a enzima presente em homogeneizado celular;
- Iniciar estudos de extração por processos contínuos e com recirculação de reagentes.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRES-BARROS, M.R., CABRAL, J.M.S. Selective separation and purification of two lipases from *Chromobacterium viscosum* using AOT reversed micelles. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.38, p.1302-1307, 1991.
- AKADEMISCHE WISSENSCHAFTLICHE DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK Enzyme electrode for fructose analysis. DD 279505 06. jun.1990.
- ALBERTSSON, P.A. **Partition of cell particles and macromolecules**. 2.ed. New York: Wiley, 1986. 323p.
- ALEXANDER, N.J. Temperature sensitivity of the induction of xylose reductase in *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.37, p.1739-1744, 1985.
- ALRED, P.A., KOZLOWSKI, A., HARRIS, J.M., TJERNELD, F. Application of temperature-induced phase partitioning at ambient temperature for enzyme purification. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.659, p.289-298, 1994.
- ANDREASEN, P.A. Molecular mass of protein and their partitioning in aqueous two-phase systems. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.64, n.1, p.99-103, 1994.
- ANDREWS, B.A., PYLE, D.L., ASENJO, J.A. The effect of pH and ionic strength on partitioning of four proteins in reverse micelle systems. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.43, p.1048-1052, 1994.
- ASENJO, J.A. **Separation process in biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1990. 801p. (Bioprocess technology, 9).
- ASENJO, J.A., TURNER, E.R., MISTRY, L.S., KAUL, A. Separation and purification of recombinant proteins from *Escherichia coli* with two-phase systems. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.668, p.129-137, 1994.
- ATKINSON, B., SAINTER, P.J. Development of downstream processing. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, London, v.32, p.100, 1982.
- AU, S.W.N., GOVER, S., LAM, V.M.S., ADAMS, M.J. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP+

- molecule and provides insights into enzyme deficiency. **Structure**, London, v.8, n.3, p.293-303, 2000.
- BAILEY, J.E., OLLIS, D.F. **Biochemical engineering fundamentals**. 2.ed. New York: McGraw-Hill, 1986. 984p.
- BAILEY, R.B., WOODWORD, A. Isolation and characterization of a pleiotropic glucose repression resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Gen. Genet.**, Berlin, v.193, n.3, p.507-512, 1984.
- BALAGUER, P., TÉROUANNE, B., ELIAOU, J.-F., HUMBERT, M., BOUSSIOUX, A.-M., NICOLAS, J.C. Use of glucose-6-phosphate dehydrogenase as a new label for nucleic acid hybridization reactions. **Anal. Biochem.**, Orlando, v.180, p.50-54, 1989.
- BAMBERGER, S., BROOKS, D.E., SHARP, K.A., ALSTINE, J.M.V., WEBBER, T.J. Preparation of phase systems and measurement of their physicochemical properties. In: WALTER, H., BROOKS, D.E., FISHER, D. **Partitioning in aqueous two-phase systems: theory, methods, uses, and applications to biotechnology**. Orlando: Academic Press, 1985.
- BÄR, A. Xylitol. In: O'BREEN NABORS, L., GELARDI, R. **Alternative sweeteners**. New York: Marcel Dekker, 1986.
- BASSI, A.S., TANG, D.Q., BERGOUNOU, M.A. Mediated, amperometric biosensor for glucose-6-phosphate monitoring based on entrapped glucose-6-phosphate dehydrogenase, Mg^{+2} ions, tetracyanoquinodimethane, and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate in carbon paste. **Anal. Biochem.**, Orlando, v.268, n.2, p.223-228, 1999.
- BAUGHMAN, D.R., LUI, Y.A. An expert network for predictive modeling and optimal design of extractive bioseparations in aqueous two-phase systems. **Ind. Eng. Chem. Res.**, Columbus, v.33, n.11, p.2668-2687, 1994.
- BELTER, P.A., CUSSLER, E.L., HU, W.-S. **Bioseparations: downstream processing for biotechnology**. New York: Wiley, 1988. 368p.
- BERGER, L., SLEIN, M.W., COLOWICK, S.P., CORI, C.F. Isolation of hexokinase from baker's yeast. **J. Gen. Physiol.**, n.29, p.379-391, 1946.
- BERGGREN, K., CARLSSON, M., LINSE, P., VEIDE, A., TJERNELD, F. Partition of recombinant protein-A derivatives in PEG-dextran and UCON-

dextran aqueous two-phase systems. **Pharmacol. Toxicol.**, Copenhagen, v.41, suppl.2, p.181, 1995.

BERGMEYER, H.U. **Methods of enzymatic analysis**. 3.ed. Weinheim: Verlag Chemie, 1983. v.2, 539p.

BIELY, P., PULS, J., SCHNEIDER, H. Acetyl xylan estereases in fungal cellulolytic system. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.186, p.80-84, 1985.

BISSON, L.F., FRAENKEL, D.G. Involvement of kinases in glucose and fructose uptake by *S. cerevisiae*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.80, p.1730-1734, 1983.

BLANKSCHTEIN, D., HUANG, Y.X., THURSTON, G.M. Salt effects on liquid liquid phase separation in aqueous micellar solutions of the zwitterionic surfactant C₈-lecithin. **Langmuir**, Columbus, v.7, n.5, p.896-897, 1991.

BLANKSCHTEIN, D., THURSTON, G.M., BENEDEK, G.B. Phenomenological theory of equilibrium thermodynamic properties and phase separation of micellar solutions. **J. Chem. Phys.**, Woodbury, v.85, n.7268-7288, 1986.

BORDIER, C. Phase separation of integral membrane proteins in triton X-114 solution. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.256, n.1604-1607, 1981.

BOROSS, L., SIMON, M., KOTORMAN, M., SZAJANI, B. Characterization and analytical application of glycolytic enzymes immobilized covalently on "Akrilex" carries. In: EUROPEAN CONGRESS OF BIOTECHNOLOGY, 6, Florence, 1993. **Proceedings**. Amsterdam: Elsevier, 1994. v.2 (Progress in biotechnology, 9). 1987.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, Orlando, v.72, p.248-254, 1976.

BRANDANI, V., DI GIACOMO, G., SPERA, L. Extraction of α -amilase protein by reverse micelles. **Process Biochem.**, Oxford, v.28, p.9-15, 1991.

BRICE, R.E., MORRISON, I.M. Effect of the addition of D-xylose on xylanase activity and digestibility of fiber in an artificial rumen **Appl. Biochem. Biotechnol.**, Totowa, v.30, p.9-15, 1991.

BRUINENBERG, P.M., BOT, P.H.M., van DIJKEN, J.P., SCHEFFERS, W.A. NADH-linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation

- of xylose by yeast. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v.19, p.256-260, 1984.
- CASCONI, O., ANDREWS, B.A., ASENJO, J.A. Partitioning and purification of thaumatin in aqueous two-phase systems. **Enzyme Microbiol. Technol.**, New York, v.13, p.629-635, 1991.
- CASTRO, M.J.M, CABRAL, J.M.S. Reversed micelles in biotechnological processes. **Biotechnol. Adv.**, New York, v.6, p.151-167, 1988.
- CHAMPLUVIER, B., KULA, M.R. Dye-ligand membranes as selective adsorbents for rapid purification of enzymes: a case study. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.40, p.33-40, 1992.
- CHANG, Q.-L., CHEN, J.-Y. Selective recovery of two enzymes from *Bacillus subtilis* using Aliquat 336 reversed micelles. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.56, Totowa, p.197-204, 1996.
- CHANG, Y.K., CHASE, H.A. Ion exchange purification of G6PDH from unclarified yeast cell homogenates using expanded bed adsorption. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.49, n.2, p.204-216, 1995.
- CHANG, Y.K., CHASE, H.A. Ion exchange purification of G6PDH from unclarified yeast cell homogenates using expanded bed adsorption. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.49, n.2, p.204-216, 1996.
- CHATEL, S., VOIRIN, A., LUCIANI, A., ARTAUD, J. Starch identification and determination in sweetened fruit preparations. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.44, n.2, p.502-506, 1996.
- CHAUDHURI, J.B. Separations in biotechnology. **Trends Biotechnol.**, Amsterdam, v.13, n.1, p.12-14, 1995.
- CHENG-KANG, L., WEN-DA, SU. Separation of phenylacetic acid from 6-aminopenicillanic acid via cloud-point extraction with N-decyltetra(ethylene oxide) nonionic surfactant. **Sep. Sci. Technol.**, Monticello, v.33, n.7, p.1001-1012, 1998.
- CHEVALIER, Y., ZEMB, T. The structure of micelles and microemulsions. **Rep. Prog. Phys.**, Bristol, v.53, p.279-371, 1990.
- CHIANG, C.L. Separation of cholesterol esterase in cloud point extraction system. Separation of cholesterol esterase in cloud point extraction system. **J. Chin. Inst. Chem. Eng.**, Hsinchu, v.30, n.2, p.171-176, 1999.

- CHUNG, H.B., KIM, K.W., SONG, B.-K., KIM, H.C., RHEE, K.S. Novel poythene glycol/levan aqueous two-phase system for protein partitioning. **Biotechnol. Tech.**, Dordrecht, v.11, n.5, p.327-329, 1997.
- CLEMETSON, K.J., BIENZ, D., ZAHNO, M.-L., LÜSCHER, E.F. Distribution of platelet glycoproteins and phosphoproteins in hydrophobic and hydrophilic phases in triton x-114 phase partition. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.778, p.463-469, 1984.
- COIMBRA, J.S. Desempenho de um extrator tipo graesser: na separação de proteínas do soro de queijo usando sistemas aquosos bifásicos. Campinas, 1995. (Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP).
- COLOWICK, S.P. The hexokinases. In: BOYER, P.D., ed. **The enzymes**. New York: Academic Press, 1973. v.9, p.1-48.
- CORTEZ, E.V. Extração líquido-líquido de xilose redutase e xilitol desidrogenase por micelas reversas. São Paulo, (Exame de Qualificação de Doutorado). FCF/USP, 2000.
- CORTEZ, E.V. **Recuperação de xilanase por precipitação**. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Engenharia Química de Lorena, FAENQUIL. 1998.
- CORTEZ, E.V., PESSOA JR, A., ASSIS, A.N. Xylanase recovery by ethanol and Na₂SO₄ precipitation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.70-72, p.661-666, 1998.
- COSGROVE, M. S.; NAYLOR, C.; PALUDAN, S.; ADAMS, M. J.; LEVY, H. R. On the mechanism of the reaction catalyzed by glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Biochemistry**, v.37, p.2759-2767, 1998.
- COSTA, S.A. **Extração líquido-líquido de xilanases em sistemas de duas fases aquosas**. Lorena, (Dissertação de Mestrado) Faculdade de Engenharia Química de Lorena/FAENQUIL). 1998.
- COSTA, S.A., PESSOA JR, A., ROBERTO, I.C. Xylanase recovery: effect of extraction conditions on the aqueous two-phase systems using experimental design. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v.70/72, p.629-639, 1998.

- COUGHLAN, M.P; HAZLEWOOD, G.P. β -1,4-D Xylan degrading enzyme systems: biochemistry molecular biology and applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.17, p.259-289, 1993.
- DEKKER, M., HILHORST, R., LAANE, C. Isolating enzymes by reversed Micelles. **Anal. Biochem.**, Orlando, v.178, p.217-226, 1989.
- DEKKER, R.F.H. **The enzymatic hydrolysis of biomass**. In: SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA, 2, Maringá. 1985. **Anais**. Maringá: UEM, 1985.
- DESHPANDE, V., LACHKE, A., VALADE, J.L. The use kraft pulp bleaching: a review. **Tappi J.**, Atlanta, v.77, n.6, p.125-131, 1994.
- DUNGAN, S.R., BAUSCH, T., HATTON, T.A., PLUCINSKI, P., NITSCH, W. Interfacial transport processes in the reversed micellar extraction of proteins, **J. Colloid Interface Sci.**, Orlando, v.145, n.1, p.33-50, 1991.
- EMODI, A. Xylitol: its properties and food applications. **Food Technol.**, Chicago, Jan., p.28-32, 1978.
- ENTIAN, K.D., SCHÜLLER, H.J. Glucose repression (carbon catabolite repression) in yeast. In ZIMMERMANN, F.K., ENTIAN, K.D., eds. **Yeast sugar metabolism: biochemistry, genetics, biotechnology and applications**. Lancaster: Technomic, 1997. p.409-434.
- ENTIAN, K.D., ZIMMERMANN, F.K. Glycolytic enzymes and intermediates in carbon catabolite repression mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Genet.**, New York, v.177, p.345-350, 1980.
- ENZITEC: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 4, Rio de Janeiro, 1999. **Folheto de apresentação**. Rio de Janeiro: UFRJ, 1999.
- ESUMI, K., UENO, M. **Structure-performance relationships in surfactants**. New York: Marcel Dekker, 1997.
- FARMER, F.F., EASTERBY, J.S. The purification of yeast glucose-6-phosphate dehydrogenase by dye-ligand chromatography. **Anal. Biochem.**, Orlando, v.141, p.79-82, 1991.
- FERREIRA, L. F. P. **Extração líquido-líquido de glicose-oxidase por micela reversa**. São Paulo, 2001. 66p. [Relatório FAPESP].

- FREY, S.D., ELLIOTT, E.T., PAUSTIAN, K. Application of the hexokinase-glucose-6-phosphate dehydrogenase enzymatic assay for measurement of glucose in amended soil. **Soil Biol. Biochem.**, Amsterdam, v.31, n.6, p.933-935, 1999.
- FROMM, H.J., ZEWE, V. Kinetic studies of the brain hexokinase reaction. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.237, n.5, p.1661-1667, 1962.
- GAIKAR, V.G., BODHANKAR, S.S., LATHA, V. The effect of surface active additives on the partitioning of proteins and enzymes in aqueous two-phase systems. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, London, v.67, n.4, p.329-332, 1996.
- GARRETT, R.H., GRISHAM, C.M. **Biochemistry**. Fort Worth: Saunders College, 1995. 1100p.
- GILBERT, M., BREU, C., YAGUCHI, M., SADDLER, J.N. Purification and characterization of a xylanase. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, Totowa, v.34/35, p.247-259, 1992.
- GLATZ, C.E. Precipitation. In. ASENJO, J.A. **Separation processes in biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1990. p.329-356.
- GUAN, Y., WU, X.-Y., TREFFRY, T.E., LILLEY, T.H. Studies on the isolation of penicillin acylase from *Escherichia coli* by aqueous two-phase partitioning. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.40, p.517-524, 1992.
- GUPTA, M.N., MATTIASSEN, B. Novel technologies in downstream processing. **Chem. Ind.**, London, p.673-675, sept., 1994.
- HALL, G.M. **Methods of testing protein functionality**. London: Chapman & Hall, 1996. 265p.
- HARRIS, J.M. **Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications**. New York: Plenum, 1992.
- HARRIS, P., WRIGHT, G., ANDREWS, A.T., PYLE, D.L., ASENJO, J.A. The application of aqueous two-phase partitioning to the purification of proteins from transgenic sheep milk. **Prog. Biotechnol.**, Amsterdam, v.9, pt.2, p.823-826, 1994.
- HASMAN, F.A. Extração líquido-líquido de β -xilosidase por micelas reversas. Lorena, 2000. 107p. (Dissertação de Mestrado - FAENQUIL).

- HATTON, T.A. **Extraction of proteins and amino acids using reversed micelles**. Washington: American Chemical Society, 1987. [ACS Symposium Series].
- HELENIUS, A., SIMONS, K. The binding of detergents to lipophilic and hydrophilic proteins. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.247, p.3656-3661, 1972.
- HENTSCH, M., MENOUD, P., STEINER, L., FLASCHEL, E., RENKEN, A. Optmization of the surfactant (aot) concentration in a reverse micellar extraction process. **Biotechnol. Tech.**, Dordrecht, v.6, n.4, p.359-364, 1992.
- HILHORST, R., SEGEEVA, M., HEERING, D., RIETVELD, P., FIJNEMAN, P., WOLBET, R.B.G., DEKKER, M., BIJSTERBOSH, B.H. Protein extraction from aqueous phase into a reversed micellar phase: effect of water content and reversed micellar composition. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.4, n.46, p.375-387, 1995.
- HINZE, W.L. Organized surfactant assemblies in separation science. Washington: American Chemical Society, 1987. p.2-82. (ACS Symposium Series, v.342).
- HOLM, C., FREDRIKSON, G., BELFRAGE, P. Demonstration of the amphiphilic character of hormone-sensitive lipase by temperature-induced phase separation in Triton X-114 and charge-shift electrophoresis. **J. Biol. Chem.**, v.261, p.15659-15661, 1986.
- HOTHA, S., BONIK, M.R. Production of alkaline protease by *Bacillus thuringiensis* H 14 in aqueous two-phase systems. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, London, v.69, p.5-10, 1997.
- HUANG, S.-Y., LEE, Y.-C. Separation and purification of horseradish peroxidase from *Armoracia rusticana* root using reversed micellar extraction. **Bioseparation**, Dordrecht, v.4, p.1-5, 1994.
- HUDDLESTON, J., VEIDE, A., KÖHLER, K., FLANAGAN, J., ENFORS, S.O., LYDDIATT, A. The molecular basis of parttionning in aqueous two-phase systems. **Trends Biotechnol.**, Amsterdam, v.9, p.381, 1991.
- HUDDLESTON, J.G., OTTOMAR, K.W., NGONYANI, D.M., LYDDIATT, A. Influence of sytem and molecular parameters upon fractionation of

- intracellular proteins from *saccharomyces* by aqueous two-phase partition. **Enzyme Microb. Technol.**, New York, v.13, p.24-32, 1991.
- HUDDLESTON, J.G., WANG, R., LYDDIATT, A. On the use of mild hydrophobic interaction chromatography for method scouting protein purification strategies in aqueous two-phase systems: a study model proteins. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.44, p.626-635, 1994.
- HUENUPI, E., GOMEZ, A., ANDREWS, B.A., ASENJO, J.A. Optimization and design considerations of two-phase continuous protein separation. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, London, v.74, p.256-263, 1999.
- HUSTEDT, H., KORNER, K.H., KULA, M.R. Applications of phase partitioning in biotechnology. In: WALTER, H., BROOKS, D.E., FISHER, D. **Partitioning in aqueous two-phase systems: theory, methods, uses, and applications to biotechnology**. Orlando: Academic Press, 1985b. p.529-587.
- HUSTEDT, H., KRONER, K.H., MENGE, U., KULA, M.R. Recovery of proteins using aqueous two-phase systems. **Trends Biotechnol.**, Amsterdam, v.3, p.139-144, 1985a.
- HYVÖNEN, L., KOIVISTOINEN, P., VOIROL, F. Food technological evaluation of xylitol. **Adv. Food Res.**, San Diego, v.28, p.373-403, 1982.
- ISHAQUE, A., MILLHAUSEN, M., LEVY, H. On the absene of cysteine in glucose-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, Orlando, v.59, p.894, 1974.
- ISHIKAWA, H., MAEDA, T., HIKITA, K. Initial rate studies of a thermophilic glucokinase from *Bacillus stearothermophilus*. **Biochem. J.**, Colchester, v.248, p.13-20, 1987.
- ISRAELICHAVILI, J.N. **Intermolecular and surface forces**. 2.ed. London: Academic, 1992.
- JANES, R.L. The chemistry of wood and fibers. In: McDONALD, R.G., FRANKLIN, J.N. **The pulping of wood**. New York: McGraw-Hill, 1969. p.33.
- JEFFRIES, T.W. Conversion of xylose to ethanol under aerobic conditions by *Candida tropicalis*. **Biotechnol. Lett.**, Dordrecht, v.3, p.213-216, 1981.
- JOHANSSON, G. Aqueous two-phase systems in protein purification. **J. Biotechnol.**, Amsterdam, v.3, p.11-18, 1985.

- JOSELEAU, J.P., COMTAT, J., RUEL, K. Chemical structure of xylans and their interaction in the plant cell walls. In: VISSER, J., BELDMAN, G., KUSTERS-van SOMEREN, M.A., VORAGEN, A.G.J., eds. **Xylans and xylanases**. Amsterdam: Elsevier, 1992. p.1-15. (Progress in Biotechnology, 7).
- KADAM, K.I. Reverse micelles as a bioseparation tool. **Enzyme Microb. Technol.**, New York, v.8, p.266-273, 1986.
- KAMEI, D.T. **A fundamental investigation of protein partitioning in two-phase aqueous mixed micellar systems**. Massachusetts, 2000. (PhD Thesis - Massachusetts Institute of Technology).
- KAMEI, D.T. **A fundamental investigation of protein partitioning in two-phase aqueous mixed micellar systems**. MIT, 1998. [Palestra].
- KOVÁK, L., NELSON, B.D., ERNSTER, L. A method for determining the intracellular distribution of enzymes in yeast provides no evidence for the association of hexokinase with mitochondria. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v.134, n.1, p.285-291, 1986.
- KREI, G.A., HUSTEDT, H. Extraction of enzymes by reverse micelles. **Chem. Eng. Sci.**, Amsterdam, v.47, n.1, p.99-111, 1992.
- KREI, G.A., HUSTEDT, H. Extraction von Enzymen mittels reverser Mizellen. **Bioengineering**, Elmsford, v.314, p.3241, 1989.
- KRONER, K.H., HUSTEDT, H., KULA, M.-R. Extractive enzyme recovery: economic considerations. **Process Biochem.**, Oxford, v.19, p.170-179, 1984.
- KULA, M.-R. Liquid-liquid extraction of biopolymers. In: MOO-YOUNG, M., ed. **Comprehensive biotechnology: the principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine**. Oxford: Pergamon, 1985. v.3, cap.28, p.451-471.
- KULA, M.-R., KRONER, K.-H., HUSTEDT, H. Purification of enzymes of liquid-liquid extraction. **Adv. Biochem. Eng.**, Berlin, v.24, p.73-118, 1982.
- KUMAR, S., RAMÓN, D. Purification and regulation of the synthesis of a β -xylosidase from *Aspergillus nidulans*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v.135, p.287-293, 1996.

- KUNITZ, M., McDONALD, M.R. Crystalline hexokinase (heterophosphatase): method of isolation and properties. **J. Gen. Physiol.**, New York, v.29, p.393-412, 1946. É número ou volume?
- KUNST, A., DRAEGER, B., ZIEGENHORN, J. D-Glucose. In: BERGMAYER, H.U. **Methods of enzymatic analysis**. 3.ed. Weinheim: Verlag Chemie, 1983. v.6, p.163-185.
- LAHORE, H.M.F., MIRANDA, M.V., FRAILE, E., BONINO, M.J.B.J., CASCONI, O. Partition behaviour and purification of a *Mucor bacilliformis* acid protease in aqueous two-phase systems. **Process Biochem.**, Oxford, v.30, n.7, p.615-621, 1996.
- LEE, C.-K., SANDLER, S.I. Vancomycin partitioning in aqueous two-phase systems: effects of pH, salts, and an affinity ligand. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.35, p.408-416, 1990.
- LEE, C.K., SU, W.D. Nonionic surfactant-mediated affinity cloud-point extraction of vancomycin. **Sep. Sci. Technol.**, Monticello, v.34, n.16, p.3267-3277, 1999.
- LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L., COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 1995.
- LEVY, H.R. Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroids*. **Biochem. Soc. Trans.**, Colchester, v.17, p.313-315, 1988.
- LI, M., ZHU, Q.-Z., MEI, H.-L. Partitioning of amino acids by aqueous two-phase systems combined with temperature-induced phase formation. **Biotechnol. Prog.**, Columbus, v.13, p.105-108, 1997.
- LIU, C.-L., KAMEI, D.T., KING, J.A., WANG, D.I.C., BLANKSCHTEIN, D. Separation of proteins and viruses using two-phase aqueous micellar systems. **J. Chromatogr., B**, Amsterdam, v.711, p.127-138, 1998.
- LIU, C.-L., NIKAS, Y.J., BLANKSCHTEIN, D. Novel bioseparations using two-phase aqueous micellar systems. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.52, p.185-192, 1996.
- LIU, C.-L., NIKAS, Y.J., BLANKSCHTEIN, D. Partitioning of proteins using two-phase aqueous surfactant systems. **AIChE J.**, New York, v.41, p.991-995, 1995.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J., Protein

- measurement with the Folin-phenol-reagent. **J. Biotechnol.**, Amsterdam, v.193, p.265-275, 1959.
- LU, M., TJERNELD, F. Protein purification using aqueous two-phase systems and recovery of phase forming polymers. **Pharmacol. Toxicol.**, Copenhagen, v.41, suppl.2, 1995.
- LUISI, P.L., GIOMINI, M., PILENI, M.P., ROBINSON, B.H. Reversed micelles as hosts for proteins and small molecules. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.947, p.209-246, 1988.
- MAITRA, P.K. Glucokinase from yeast. **Methods Enzymol.**, San Diego, v.42, p.25-30, 1985.
- MAITY, H., JARORI, G.K. Yeast hexokinase. PII - bound nucleotide conformation at the active site. **Eur. J. Biochem.**, Oxford, v.250, p.539-548, 1997.
- MAKINEN, K.K. Xylitol and oral health. **Adv. Food Res.**, San Diego, v.25, p.137-158, 1979.
- MAKINEN, K.K. Xylitol: the sugar that prevents tooth decay. **The Futuris**, p.135-139, 1976. Não encontrei em nenhum lugar este título.
- MAKINO, S. Interaction of protein with amphiphilic substances. **Adv. Biophys.**, v.12, Tokyo, p.131-184, 1979.
- MAKINO, S., REYNOLDS, J.A., TANFORD, C. The binding of deoxycholate and Triton X-100 to proteins. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.248, p.4926-4932, 1973.
- MANZ, U., VANNINEN, E., VOIROL, F. Xylitol – its properties and use as a sugar substitute in foods. **FOOD R. A. SYMP. SUGAR AND SUGAR REPLACEMENTS**, London, 10 out., 1973.
- MARCOZI, G., CORREA, N., LUISI, P.L., CASELLI, M. Protein extraction by reverse micelles: A study of the factors affecting the forward and backward transfer of α -chymotrypsin and its activity. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.38, p.1239-1246, 1991.
- McCREATH, G.E., CHASE, H.A., LOWE, C.R. Novel affinity separations based on perfluorocarbon emulsions: use of a perfluorocarbon affinity emulsion for the direct extraction of glucose-6-phosphate dehydrogenase from

- homogenised bakers' yeast. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.659, p.275-287, 1994.
- McCREATH, G.E., CHASE, H.A., OWEN, R.O., LOWE, C.R. Expanded bed affinity-chromatography of dehydrogenases from bakers-yeast using dye-ligand perfluoropolymer supports. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.48, n.4, p.341-354, 1995.
- MEYER, U. Extraktion von enzymen mittels inverser mizelen. Braunschweig, 1992. (Diplomprüfungsausschuss - Technische Universität Braunschweig).
- MILAGRES, A.M.F., DURAN, N. Xylanolytic enzymes from *Penicillium janthinellum* and its applications in bleaching of pulp. **Prog. Biotechnol.**, Amsterdam, v.7, p 539-545, 1992.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, Columbus, v.31, n.3, p.426-428, 1959.
- MINUTH, T., GIEREN, H., PAPE, U. Pilot scale processing of detergent based aqueous two-phase systems. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.55, p.339, 1997.
- MIURA, J., ISHII, H., WATANABE, H. Extraction and separation of nickel chelates of 1-(2-thiazolylazo)-2-naphtol in nonionic surfactant solution. **Bunseki Kagaku**, Tokyo, v.25, p.808. 1976.
- MORI, H., ISHIDA, M., OKAMOTO, S. Glucose determination using a flow system with enzyme reactor and application to analysis of glucose content in beverages. **J. Health Sci.**, Tokyo, v.45, n.3, p.126-129, 1999.
- MUTSAERS, J.H.G.M. Xylanase in breadmaking. In: XYLANS AND XYLANASES INTERNATIONAL SYMPOSIUM, Wageningen, 1991.
- NIKAS, Y.J., LIU, C.-L., SRIVASTAVA, T., ABBOTT, N.L., BLANKSCHTEIN, D. Protein partitioning in two-phase aqueous nonionic micellar solutions. **Macromolecules**, Columbus, v.25, p.4794-4806, 1992.
- NUNEZ-DELICADO, E., BRU, R., SANCHEZ-FERRER, A., GARCIA-CARMONA, F. Triton X-114-aided purification of latent tyrosinase. **J. Chromatogr., B.**, Amsterdam, v.680, n.1/2, p.105-112, 1996.
- OLIVE, C., LEVY, H. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroids*. **Methods Enzymol.**, San Diego, v.41, part B, 1975.

- PATEL, M.T., NAGARAJAN, R., KILARA, A. Interactive influence and optimization of reaction parameters in the hydrolysis of olive and coconut triacylglycerols by *C. cylindracea* and *R. javanicus* lipases in reverse micellar media. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, Totowa, v.59, p.109-124, 1996.
- PAZUR, J.H. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. **Methods Enzymol.**, San Diego, v.9, p.82-87, 1966.
- PEPPER, T., OLINGER, P.M. Xylitol in sugar-free confections. **Food Technol.**, Chicago, v.10, p.98-106, 1988.
- PESSOA Jr., A. Extração líquido-líquido de glicose-6-fosfato desidrogenase por sistemas micelares em duas fases aquosas. São Paulo, 2000. [Relatório FAPESP].
- PESSOA Jr., A., MANCILHA, I.M., SATO, S. Acid hydrolysis of hemicellulose from sugar cane bagasse. **Braz. J. Chem. Eng.**, São Paulo, v.14, n.3, p.291-297, 1997.
- PESSOA Jr., A., VITOLO, M. Downstream processing of inulinase: comparison of different techniques. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, Totowa, v.70/72, p.505-511, 1998c.
- PESSOA Jr., A., VITOLO, M. Evaluation of cross-flow microfiltration membranes using rotary disc-filter. **Process Biochem.**, Oxford, v.33, n.1, p.39-45, 1998a.
- PESSOA Jr., A., VITOLO, M. Recovery of inulinase using BDBAC reversed micelles. **Process Biochem.**, Oxford, v.33, n.3, p.291-297, 1998b.
- PESSOA Jr., A., VITOLO, M. Separation of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using reversed micellar extraction. **Biotechnol. Tech.**, Dordrecht, v.11, n.6, p.421-422, 1997.
- PIRES, M.J., AIRES-BARROS, M.R., CABRAL, J.M.S. Liquid-liquid extraction of proteins with reversed micelles. **Biotechnol. Prog.**, Columbus, v.12, n.3, p.290-301, 1996.
- PLANAS, J., LEFEBVRE, D., TJERNELD, F., HÅGERDAL, H.B. Analysis of phase composition in aqueous two phase systems using a two-column chromatographic method: application to lactic acid production by extractive fermentation. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.54, p.303-311, 1997.

- PRYDE, J.G. Triton X-114: a detergent that has come in from the cold. **Trends Biochem. Sci.**, Amsterdam, v.11, p.160-163, 1986.
- PRYDE, J.G., PHILIPS, J.H. Fractionation of membrane proteins by temperature-induced phase separation in Triton X-114. **Biochem. J.**, Colchester, v.233, p.525-533, 1986.
- PULS, J., POUNTANEN, K. Mechanisms of enzymic hydrolysis hemicelluloses (xylans) and procedures of determination of the enzyme activities involved. In: COUGHLAN, M.P., ed. **Enzyme systems for lignocellulose degradation**. London: Elsevier, 1989. p.151-165.
- PURICH, D.L., FROMM, H.J., RUDOLPH, F.B. Hexokinases: kinetic, physical and regulatory properties. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.**, New York, v.39, p.249-320, 1973.
- PUVVADA, S., BLANCKSCHEIN, D. Molecular-thermodynamic approach to predict micellization, phase behavior and phase separation of micellar solutions. I. Application to non-ionic surfactants. **J. Chem. Phys.**, Woodbury, v.92, n.6, p.3710-3724, 1990.
- QUINA, F.H., HINZE, W.L. Surfactant-mediated cloud point extractions: an environmentally benign alternative separation approach. **Ind. Eng. Chem. Res.**, Columbus, v.38, p.4150-4168, 1999.
- RAMELMEIER, R.A., TERSTAPPEN, G.C., KULA, M.-R. The partitioning of cholesterol oxidase in Triton X-114 based aqueous two-phase systems. **Bioseparation**, Dordrecht, v.2, p.315-324, 1991.
- REGALADO, C., ASENJO, J.A., PYLE, D.L. Studies on the purification of peroxidase from horseradish roots using reversed micelles. **Enzyme Microbiol. Technol.**, New York, v.18, p.332-339, 1996.
- RIBEIRO M.Z. Extração de glicose-6-fosfato desidrogenase em sistemas de duas fases aquosas. São Paulo, 2000. 134p. (Exame de qualificação para o título de Mestre - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
- RODRIGUES, E. Hexoquinase purificada de eritrócito de galinha (*gallus gallus domesticus*): propriedades cinéticas e físicoquímicas relacionadas ao metabolismo glicídico. São Paulo, 1987. 162p. (Tese de Doutorado - Instituto de Química - USP).

- RODRIGUES, E.M.G. Extração líquido-líquido de xilanase por micela reversa. Lorena, 1997. 90p. (Dissertação de Mestrado - Departamento de Biotecnologia - FAENQUIL).
- RODRIGUES, E.M.G., MILAGRES, A.M.F, PESSOA Jr., A. Xylanase recovery: effect of extraction conditions on the aot-reversed micellar systems using experimental design. **Process Biochem.**, Oxford, v.34, n.2, p.121-125 1999a.
- RODRIGUES, E.M.G., PESSOA Jr., A., MILAGRES, A.M.F. Screening of variables in xylanase recovery using BDBAC reversed micelles. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, Totowa, v.77/79, p.779-788, 1999b.
- ROSA, S.A.M. Obtenção e cinética da xilose redutase e xilitol desidrogenase de *Candida guilliermondii* FTI 20037. São Paulo, 1996. 95p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
- ROWLAND, P., BASAK, A.K., GOVER, S., LEVY, H.R., ADAMS, M.J. The three-dimensional structure of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroids* refined at 2.0 Å resolution. **Structure**, London, v.2, n.11, p.1073-1087, 1994.
- SAITOH, T., HINZE, W.L. Concentration of hydrophobic organic compounds and extraction of protein using alkylammoniosulfate zwitterionic surfactant mediated phase separation (cloud point extractions). **Anal. Chem.**, Columbus, v.63, p.2520-2525, 1991.
- SÁNCHEZ-FERRER, A., BRU, R., GARCÍA-CARMONA, F. Phase separation of biomolecules in polyoxyethylene glycol nonionic detergents. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, Boca Raton, v.29, p.275-313, 1994.
- SARUBBO, L.A. Caracterização de um novo sistema bifásico aquoso e aplicação em extração de proteínas com coluna de discos perfurados rotativos. Campinas, 2000. 174p. (Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia Química - UNICAMP).
- SCAWEN, M.D., MELLING, J. Large-scale extraction and purification of enzymes and others proteins. In: WISEMAN, A., ed. **Handbook of enzyme biotechnology**. 2.ed. Chichester: Ellis Horwood, 1985. p.15-51.

- SCHMIDT, A.S., ANDREWS, B.A., ASENJO, J.A. Correlations for the partition behavior of proteins in aqueous two-phase systems: effect of overall protein concentration. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.50, n.6, p.617-626, 1996.
- SCHMIDT, A.S., VENTON, A.M., ASENJO, J.A. Partitioning and purification of α -amylase in aqueous two-phase. **Enzyme Microbiol. Technol.**, New York, v.16, p.131-142, 1994.
- SEBASTIÃO, M.J., MARTEL, P., BAPTISTA, A., PETERSEN, S.B., CABRAL, J.M.S., AIRES-BARROS, M.R. Predicting the partition coefficients of a recombinant cutinase in polyethylene glycol/phosphate aqueous two-phase systems. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.56, n.3, p.248-257, 1997.
- SEOUD, O.A., SANCTIS, D.S., PALMA, E.J. **Tensoativos: química e aplicações em cosméticos e detergentes**. São Paulo: ABQ, 1999. Páginas? [Apostila].
- SEVERO, L.G. Determinação da atividade da glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) em eritrócitos humanos. São Paulo, 1979. 68p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
- SHAH, D.O. **Micelles, microemulsions and monolayers: science and technology**. New York: Marcel Dekker, 1998.
- SHAMEL, R.E., KEOGH, M. Double-digit growth predicted for biotechnology products in next decade. **Genet. Eng. News**, Larchmont, dez, 1995.
- SILVA, D.P., PESSOA Jr., A., VITOLO, M. Effect of temperature and pH on storage stability of hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Boll. Chim. Farm.**, Milan, v.138, n.2, p.47, 1999.
- SILVA, D.P., PESSOA Jr., A., VITOLO, M. Partition of hexokinase and glucose 6-phosphate dehydrogenase in an aqueous two-phase system: influence of polyethylene glycol molecular weight. In: CONGRESS OF PHARMACEUTICAL SCIENCES: trends in pharmaceutical sciences for the next century, 2, Ribeirão Preto, 1999. **Resumos**. Ribeirão Preto: USP, 1999b.
- SINHA, R., SINGH, S.P., AHMED, S., GARG, S.K. Partitioning of a *Bacillus* alkaline protease in aqueous two-phase systems. **Bioresour. Technol.**, Amsterdam, v.55, p.163-165, 1996.

- SIRIMANNE, S.R., PATTERSON, D.G., MA, L., JUSTICE, J.B. Application of cloud-point extraction-reversed-phase high performance liquid chromatography: a preliminary study of the extraction and quantification of vitamins A and E in human serum and whole blood. **J. Chromatogr., B**, Amsterdam, v.716, n.1/2, p.129-137.
- SIVARS, U., TJERNELD, F. Mechanisms of phase behaviour and protein partitioning in detergent/polymer aqueous two-phase systems for purification of integral membranes proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1474, n.2, p.133-146, 2000.
- STRYER, L. **Bioquímica**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 881p.
- SULISTYO, J., KAMIYAMA, Y., YASUI, T. Purification and some properties of *Aspergillus pulverulentus* β -xylosidase with transxylosylation capacity. **J. Ferment. Bioeng.**, Amsterdam, v.79, n.1, p.77-82, 1995.
- SUNNA, A., ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Crit. Rev. Biotechnol.**, Boca Raton, v.17, n.1, p.39-67, 1997.
- TAKEDA, M. Glucose induced inactivation of mitochondrial enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem. J.**, Colchester, v.198, n.2, p.281-287, 1981.
- TANFORD, C. **The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes**. New York: Wiley, 1980.
- TANI, H.; KAMIDATE, T.; WATANABE, H. 1998. Aqueous micellar two-phase systems for protein separation. **Anal. Sci.**, Tokyo, v.14, n.5, p.875-888.
- TEROUANNE, B., BENCHEICK, M., BALAGUER, P., BOUSSIOUX, A.M., NICOLAS, I.C. Bioluminescent assays using glucose-6-phosphate dehydrogenase: application to biotin and streptavidin detection. **Anal. Biochem.**, London, v.180, n.1, p.43-49, 1989.
- TERSTAPPEN, G.C., RAMELMEIER, R.A., KULA, M.R. Protein partitioning in detergent-based aqueous two-phase systems. **J. Biotechnol.**, Amsterdam, v.28, p.263-275, 1993.
- TJERNELD, F., ALRED, P.A., HARRIS, J.M. Utilization of temperature-induced phase separation for purification of biomolecules. In: PYLE D.L., ed. **Separation for biotechnology**. London: Elsevier, 1994. v.3, p.505-511.

- TREVISAN, H.C. Desenvolvimento de um método de produção de sílica de porosidade controlada e sua utilização na imobilização de proteínas. Campinas, 1993. (Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia Química - UNICAMP).
- ULUSU, N.M., KUS, M.S., ACAN, N.L., TEZCAN, E.F. A rapid method for the purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from bovine lens. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, Amsterdam, v.31, n.7, p.787-796.
- UMAKOSHI, H., YANO, K., KUBOI, R., KOMASWA, I. Exative cultivation of recombinant *Escherichia coli* using aqueous two-phase systems for production and separation of intracellular heat shock proteins. **Biotechnol. Prog.**, Columbus, v.12, p.51-56, 1996.
- VAN DER BROECK, H.C., GRAAF, L.L., HILLE, J.D.R., VAN OUYEN, A.J.J., VESSER, J., HARDER, A. Cloning and expression of fungal xylanase genes and use of the xylanase in bread making and in preparation of feed and paper products. **Eur. Patent Appl.**, v.90, p.202-220, 1990. Não encontrei este título.
- VERNAU, J., KULA, M.R. Extraction of proteins from biological raw material using aqueous polyethylene glycol-citrate phase systems. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, Colchester, v.12, p.397-404, 1990.
- VIIKARI, L., KANTELINEN, A., SUNDQUIST, J., LINKO, M. Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. **FEMS Microbiol. Rev.**, Amsterdam, v.13, p.335-350, 1994.
- VITOLO, M., ROCHA-FI., J.A. **Enzimas no contexto da síntese orgânica**. São Paulo: s.c.p., 1998. 84p
- WHITAKER, J.R. Enzymes in analytical chemistry. In: FOX, P.F., ed. **Food enzymology**. New York: Elsevier Science, 1991. v.2, 378p.
- WONG, K.K.Y., TAN, L.U.L., SADDLER, J.N. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms. **Funct., Prop. Appl. Microbiol. Rev.**, v.52, n.13, p.305-317, 1988.
- WOODWARD, J. Xylanases: functions, properties and applications. In: WISEMAN, A. **Topics in enzyme and fermentation biotechnology**. Chichester: Ellis Horwood; New York: Halsted Press, 1984. p.9-30.
- WORTHINGTON BIOCHEMICAL CORPORATION (E.U.A.). [Online]. Available:

- YLIKAHRI, R. Metabolic and nutritional aspects of xylitol. **Adv. Food Res.**, San Diego, v.25, p.159-180, 1979.
- ZAMARRO, M.T., DOMINGO, M.J., ORTEGA, F., ESTRADA, P. Recovery of cellulolytic enzymes from wheat-straw hydrolysis broth with dioctyl sulphosuccinate/isoo-octane reverse micelles. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, Colchester, v.23, p.117-125, 1996.
- ZÁRATE, V., BELDA, F. Characterization of the heterologous invertase produced by *Schizosaccharomyces pombe* from the SUC2 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Appl. Chem. Biotechnol.**, v.80, p.45-52, 1996.
- ZASLAVSKY, B.Y. **Aqueous two-phase partitioning: physical chemistry and bioanalytical applications**. New York: Marcel Dekker, 1995.
- ZHANG, T.-F., HAGER, L.P. A single-step large-scale purification of pyruvate oxidase. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v.257, n.2, p.485-487, 1984.

ANEXOS

Nos anexos seguintes estão sendo apresentadas cópias dos artigos publicados ou aceitos para publicação, dos trabalhos realizados em conjunto com os orientados que defenderam tese, sob a orientação do autor, e de artigos publicados em cooperação com outros pesquisadores pertencentes a outros grupos.

Estes anexos contém artigos que estão subdivididos em função do tema abordado, como: I) extração líquido-líquido em sistemas poliméricos de duas fases aquosas; II) extração líquido-líquido em sistemas micelares reversos e III) fermentação, precipitação e cinética enzimática.

Anexo I

Artigos já publicados ou em fase de publicação sobre o tema:

***Extração Líquido-Líquido em Sistemas Poliméricos de
Duas Fases Aquosas***

1. Costa, S.A.; **Pessoa Jr, A.**; Roberto, I.C. Xylanase Recovery: Effect of Extraction Conditions on the Aqueous Two-Phase System Using Experimental Design. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. **70-72**:629-639, 1998.
2. Costa, S.A.; **Pessoa Jr, A.**; Roberto, I.C. Partition of Xylanolytic Complex from *Penicillium janthinellum* by Aqueous Two-Phase System (atps). **Journal of Chromatography B**, **743**:239-348, 2000

Xylanase Recovery

Effect of Extraction Conditions on the Aqueous Two-Phase System Using Experimental Design

SILGIA A. COSTA, ADALBERTO PESSOA JR,*
AND INÊS C. ROBERTO

Department of Biotechnology/FAENQUIL, Rod. Itajubá-Lorena, Km 74,5,
12.600-000, Lorena/SP, Brazil

ABSTRACT

The partitioning of xylanase produced by *Penicillium janthinellum* in aqueous two-phase systems (ATPS) using poly(ethylene glycol) (PEG) and phosphate (K_2HPO_4/KH_2PO_4) was studied employing a statistical experimental design. The aim was to identify the key factors governing xylanase partitioning. The interactions of five factors (PEG concentration, molecular weight, concentration of buffer K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH, and NaCl concentration) and their main effects on the partition coefficient (K) were evaluated by means of a 2^5 full-factorial experimental design with four center points. The %PEG, %NaCl, and pH were the most important factors affecting the response variable (K). Response surface methodology (RSM) was adopted and an empirical second-order polynomial model was constructed on the basis of the results. The optimum partition conditions were pH 7.0, PEG = 8.83% and NaCl = 6.02%. Adequacy of the model for predicting optimum response value was tested under these conditions. The experimental xylanase partition coefficient (K) was 2.21, whereas its value predicted by the model was 2.33. These results indicate that the predicted model was adequate for the process. PEG molecular weight and phosphate concentration did not affect the xylanase partition coefficient.

Index Entries: Aqueous two-phase system; xylanase; *Penicillium janthinellum*; experimental design.

INTRODUCTION

Enzymes involved in lignocellulosic degradation *in situ* are of interest for their potential application to processes utilizing lignocellulosic sub-

* Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed.

strates. Xylanases and xylanase-producing microorganisms can potentially be applied to the production of hydrolysates from agro-industrial wastes (1), to nutritional improvement of lignocellulosic feeds (2), and to the processing of food (3), agrofiber (4), and pulp (5). Efforts have been made by the pulp and paper industries to reduce the amount of chlorine needed for bleaching. Studies have been conducted on the effluent treatment and on the effectiveness of less toxic bleaching agents (6). The residual lignin removal by enzymatic method is actually a very interesting research area (7,8). According to Durán et al. (9), xylanases produced by *Penicillium janthinellum* can be used for reducing the chlorine charge in *Eucalyptus*-pulp bleaching with a simultaneous gain in brightness. The xylanase production has been investigated (10), but studies on downstream processes are still needed.

Extractive bioconversion using aqueous two-phase systems (ATPS) seems to be a very attractive method for the integration of fermentation and downstream processing of extracellular proteins (11). In addition to forming a relatively mild environment suitable for cell and protein extraction, ATPS can be easily scaled up and continuously processed (12–14).

The aim of this work was to identify the key factors governing xylanase partitioning using ATPS. Differences in enzyme partitioning can be ascribed to the interaction of the factors inherent in the system itself (such as choice of system components, polymer molecular weight, concentration of polymers and salts, ionic strength, and pH) with those of the target protein (such as hydrophobicity, charge, and molecular weight) (12). The effects of variables like PEG molecular weight, PEG concentration, pH, and phosphate and NaCl concentration on partition coefficient (*K*) of xylanase were studied. Full factorial experimental designs were employed since they require a reduced number of experiments and help to identify important and interacting factors determining the enzyme partition (15). Response surface methodology was used for optimizing xylanase partition coefficient (*K*) by ATPS and a statistical model correlating the variables was obtained.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism and Cultivation

The microorganism *P. janthinellum*, isolated from decaying wood by Milagres (16), was identified by the Biosystematic Research Center of Canada (Ottawa, Ontario, Canada) and deposited in their collection under the designation of CRC 87M-115. The strain was initially maintained in silica stocks and later on agar slants. The spore inocula were obtained after cultivation at 30°C for 5 d in medium containing 1% glucose, 0.1% yeast extract, 2% (v/v) concentrated salts solution based on Vogel's medium (17), and 2% agar-agar. The final concentration of spores was 10^5 mL⁻¹. The

cultivation medium for enzyme production was composed of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate (800 g of dry milled bagasse mixed with 8 L 0.25% H₂SO₄ and autoclaved for 45 min at 121°C), supplemented with 2% (v/v) concentrated salts solution based on Vogel's medium and 0.1% yeast extract. The medium was then autoclaved for 15 min at 121°C. Shake-flask cultures were grown in Erlenmeyer flasks (125 mL) containing 25 mL of medium. Standard cultivation conditions were: temperature 30°C; initial pH 5.5 (uncontrolled); cultivation time 96 h. The xylanase activity after this time was 876 nanokats/mL⁻¹.

Determination of Enzyme Activities

Xylanase activities were determined by incubating 0.5 mL of diluted culture filtrate with 0.5 mL of a "Birchwood" xylan suspension (10 g/L⁻¹) in 0.05 M phosphate buffer (pH 5.5) for 5 min at 50°C. The released reducing equivalents were measured by a colorimetric assay (18) using xylose solution as a standard reference. Activity units were expressed as micromoles of reducing equivalents released per min PEG concentration level influenced this activity. The three concentration levels tested—10, 22.5, and 35%—enhanced the enzyme activity by 2.6, 10, and 18%, respectively.

Preparation of Phase Systems

Phase systems were prepared from PEG, phosphate (KH₂PO₄/K₂HPO₄), and NaCl in solid form. Three milliliters of medium containing xylanase was added to the systems and deionized water was used to adjust the desired final concentrations of the components. By varying the proportion between KH₂PO₄ and K₂HPO₄, the pH of the system was adjusted. Centrifugation (2500g for 10 min) was used after thorough vortex-mixing of the system components; the phase volumes were measured using graduated centrifuge tubes. Samples of the top and bottom phases were then assayed for enzyme activity. During all partition experiments, the temperature was -25°C.

Experimental Designs and Statistical Analysis

To quantify the partition coefficient (*K*), the fraction of enzymes present in the lower and upper phases after phase separation was used. This fraction (*y*), which is the response factor, was measured as a function of pH (*X*₁), PEG MW (*X*₂), PEG concentration (*X*₃), phosphate concentration (*X*₄), and NaCl concentration (*X*₅). For each of the five factors, high (coded value: +1) and low (coded value: -1) set points were selected (Table 1). ATPSs representing all 32 (2⁵), set-point combinations were made, as well as an ATPS representing the center point in which the value of all factors was in between (coded value: 0). All factors were measured twice, whereas the center point was measured times.

Table 1
Factors and Levels in the Five-Factor, Three-Level Response Surface Design
Used for Optimizing the Xylanase Partition Coefficient by ATPS

Run number	Factors	Inferior level (-1)	Superior level (+)	Center point (0)
X ₁	pH	5.0	8.0	6.5
X ₂	MW PEG	600	6000	4000
X ₃	% PEG	10	35	22.5
X ₄	%Phosphate	10	25	17.5
X ₅	%NaCl	0	10	5

After statistical analysis (Tables 2 and 3) the optimization of xylanase partition coefficient (K) was achieved by three independent process variables using a 2³-factorial experimental design with six star points ($\alpha = 1.41$) and four replicates at the center point (Table 4), according to the method of Box et al. (15). These independent variables (pH, %PEG, and %NaCl) acquired new values and are coded as X₁, X₃, and X₅ in the following equations:

$$X_1 = (\text{pH} - 7.4)/0.5 \quad (1)$$

$$X_3 = (\% \text{PEG} - 13.0)/5 \quad (2)$$

$$X_5 = (\% \text{NaCl} - 5.6)/0.3 \quad (3)$$

where pH, %PEG and %NaCl are true values and X₁, X₃, and X₅ are coded values.

A statistical examination of the results and a response surface study were carried out using the STATGRAPH 6.0 statistical program package. The polynomial model employed was of the form:

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{1,2} X_1 X_2 + \beta_{1,3} X_1 X_3 + \beta_{2,3} X_2 X_3 + \beta_{1,1} X_1^2 + \beta_{2,2} X_2^2 + \beta_{3,3} X_3^2 \quad (4)$$

where:

β_0 = constant, $\beta_{1,2}$, $\beta_{1,3}$, $\beta_{2,3}$ = cross product coefficients, β_1 , β_2 , β_3 = linear coefficients, X₁, X₂, X₃ = coded independent variables, and $\beta_{1,1}$, $\beta_{2,2}$, $\beta_{3,3}$ = quadratic coefficients.

Chemicals

Birchwood 4-O-methyl- β -D-glucoroxylan (90% xylose) was obtained from Sigma (St. Louis, MO), and poly(ethylene glycol) (PEG) from Merck (Darmstadt, Germany). All the other chemicals were of analytical grade.

Table 2
Xylanase Partition Coefficient (K) from 2³-Full Factorial Design with Center Point under Different Treatments

Assay number	Assay sequence	Factors					K*
		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	
1	25	-1	-1	-1	-1	-1	0
2	36	+1	-1	-1	-1	-1	0
3	20	-1	+1	-1	-1	-1	0
4	28	+1	+1	-1	-1	-1	0.60
5	22	-1	-1	+1	-1	-1	0
6	4	+1	-1	+1	-1	-1	1.72
7	34	-1	+1	+1	-1	-1	0
8	23	+1	+1	+1	-1	-1	0.81
9	8	0	0	0	0	0	1.69
10	14	-1	-1	-1	+1	-1	0
11	26	+1	-1	-1	+1	-1	2.03
12	6	-1	+1	-1	+1	-1	1.16
13	3	+1	+1	-1	+1	-1	1.72
14	12	-1	-1	+1	+1	-1	0
15	19	+1	-1	+1	+1	-1	0.57
16	7	-1	+1	+1	+1	-1	0
17	35	+1	+1	+1	+1	-1	0
18	16	0	0	0	0	0	1.33
19	9	-1	-1	-1	-1	+1	0
20	30	+1	-1	-1	-1	+1	2.34
21	17	-1	+1	-1	-1	+1	1.42
22	15	+1	+1	-1	-1	+1	1.94
23	5	-1	-1	+1	-1	+1	0
24	21	+1	-1	+1	-1	+1	0
25	29	-1	+1	+1	-1	+1	0
26	1	+1	+1	+1	-1	+1	0
27	24	0	0	0	0	0	1.57
28	2	-1	-1	-1	+1	+1	0
29	33	+1	-1	-1	+1	+1	1.36
30	31	-1	+1	-1	+1	+1	2.11
31	11	+1	+1	-1	+1	+1	1.33
32	18	-1	-1	+1	+1	+1	0
33	13	+1	-1	+1	+1	+1	0
34	27	-1	+1	+1	+1	+1	0
35	10	+1	+1	+1	+1	+1	0
36	32	0	0	0	0	0	1.40

* K = (K₁ + K₂)/2 average partition coefficient.

Table 3
Estimated Effect, Standard Error and Student's *t* Test of 2⁵ Factorial Design with Four Center Points

Variables	Estimated effects	Standard error	<i>t</i> Values
Average	0.713	± 0.104	—
X ₁	0.608	± 0.224	2.71*
X ₂	0.191	± 0.224	0.86
X ₃	-0.806	± 0.224	3.36*
X ₄	0.090	± 0.224	0.41
X ₅	0.118	± 0.224	0.53
X ₁ X ₂	-0.394	± 0.224	1.76
X ₁ X ₃	-0.221	± 0.224	0.98
X ₁ X ₄	-0.141	± 0.224	0.63
X ₁ X ₅	-0.187	± 0.224	0.80
X ₂ X ₃	-0.376	± 0.224	1.68
X ₂ X ₄	0.103	± 0.224	0.46
X ₂ X ₅	-0.195	± 0.224	0.87
X ₃ X ₄	-0.335	± 0.224	1.50
X ₃ X ₅	-0.505	± 0.224	2.25*
X ₄ X ₅	-0.203	± 0.224	0.90

* Significant at the 5% level (*t* = 2.08012).

Table 4
Experimental Data for Xylanase Partition Coefficient (K) Under Different Treatments

Treatment	pH	%PEG	%NaCl	K
1	-1	-1	-1	2.10
2	+1	-1	-1	2.07
3	-1	+1	-1	1.75
4	+1	+1	-1	1.62
5	-1	-1	+1	2.32
6	+1	-1	+1	2.13
7	-1	+1	+1	2.14
8	+1	+1	+1	1.85
9	-1.41	0	0	2.10
10	1.41	0	0	2.27
11	0	-1.41	0	2.36
12	0	1.41	0	1.72
13	0	0	-1.41	2.27
14	0	0	1.41	2.30
15	0	0	0	2.27
16	0	0	0	2.08
17	0	0	0	2.07
18	0	0	0	2.11

Fig. 1. Interpretation diagram of the interaction effects between %PEG and %NaCl in the 2⁵ factorial design.

RESULTS AND DISCUSSION

The partition coefficients obtained after xylanase extraction by ATPS, according to the factorial design, are presented in Table 2. The factor levels were defined based on phase diagrams (MW PEG, % PEG, % phosphate and % NaCl factors) (19) and on the enzyme characteristics (pH factor) (5). The individual effects of the experimental factors and their interactions on partition coefficient (K) are shown in Table 3. As can be seen the pH (X₁), %PEG (X₃) and the interactions between %PEG (X₃) and %NaCl (X₅) presented a significant influence on partition coefficient at the 5% level. The estimated effect for the pH (X₁) was positive indicating that from level -1 to +1 the K value augments as a function of pH. The effect of this variable is independent of the other factors since there was no significant interactions among them. On the other hand, the main effect of the %PEG (X₃) cannot be interpreted separately because its interaction with %NaCl (X₅) was significant at the 5% level. As can be seen in Fig. 1, an increase in the NaCl concentration from 0 to 10% provides an increase of 0.63 U in the K value. In this variation range, at 35% NaCl, a reduction of 0.38 U in the partition coefficient is observed. On the other hand, after increasing PEG concentration from 10 to 35%, without NaCl addition the K value decreases by 0.30 U. This variation (10 to 35%) causes a decrease of 1.31 Units in the K value. As a function of these results, further optimizing experiments were performed using a 2³ orthogonal factorial design according to the Materials and Methods section (Table 4). The regression coefficients, *t* values and determination coefficients (R²) for the full quadratic

Table 5
Regression Coefficients, *t* Values and *R*² of Quadratic Response Surface for *K* Values

Term of the model	Regression coefficients	Standard error	<i>t</i> Values
Interception	2.175	± 0.044	49.489
Factor <i>X</i> ₁	-0.066	± 0.053	1.237
Factor <i>X</i> ₃	-0.361	± 0.053	6.704*
Factor <i>X</i> ₅	0.157	± 0.053	2.918 ^b
<i>X</i> ₁ <i>X</i> ₃	-0.05	± 0.066	0.758
<i>X</i> ₁ <i>X</i> ₅	-0.08	± 0.066	1.214
<i>X</i> ₃ <i>X</i> ₅	0.085	± 0.066	1.289
<i>X</i> ₁ <i>X</i> ₁	-0.075	± 0.066	1.138
<i>X</i> ₃ <i>X</i> ₃	-0.220	± 0.066	3.337*
<i>X</i> ₅ <i>X</i> ₅	0.025	± 0.066	0.379

Standard error estimated from pure error with 3 df. (*t* = 3.18245).

* Significant at the 5% level.

^b Significant at the 10% level.

Fig. 2. Response surface of xylanase partition coefficient (*K*) as a function of %PEG, %NaCl, and pH.

response-surface models of *K* are shown in Table 5 and analysis of variance (Table 6). At the 5% probability, the pH value demonstrated no significant influence on the partition coefficient (*K*) as a main effect and as a second-order interaction effect, considering the new pH range (between 6.9 and 7.9). On the other hand, NaCl (%) presented a significant influence as a main effect, whereas PEG (%) also presented a second-order effect. Figure 2 illustrates the three-dimensional response surfaces and contour plots

Table 6
Analysis of Variance (ANOVA) for the Quadratic Model

Source of variations	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F Value	<i>P</i> value ^a
Factor <i>X</i> ₃	0.3906	1	0.3906	31.06	0.0003
Factor <i>X</i> ₅	0.0740	1	0.0740	5.88	0.0382
<i>X</i> ₃ ²	0.0968	1	0.0968	7.70	0.0216
Lack of fit	0.1286	5	0.0257	2.04	0.1656
Pure Error	0.1132	9	0.0126		
Total (Corr.)	0.8033	17			

*R*² = 0.70.

^a *P* < 0.05.

Table 7
Regression Results: Observed Responses and Predicted Values

Observation number	Actual value (<i>y</i> _o)	Predicted value (<i>y</i> _p)	Residual (<i>y</i> _o - <i>y</i> _p)
1	2.10	2.15	-0.05
2	2.07	2.15	-0.08
3	1.75	1.79	-0.04
4	1.62	1.79	-0.17
5	2.32	2.31	0.01
6	2.13	2.31	-0.18
7	2.14	1.95	0.19
8	1.85	1.95	-0.10
9	2.10	2.16	-0.06
10	2.27	2.16	0.11
11	2.36	2.19	0.17
12	1.72	1.68	0.04
13	2.27	2.05	0.22
14	2.30	2.27	0.03
15	2.27	2.16	0.11
16	2.08	2.16	-0.08
17	2.07	2.16	-0.09
18	2.11	2.16	-0.05

showing the expected *K* values as a function of %NaCl and %PEG attained with equation 5.

$$y = 2.18 - 0.18X_3 + 0.08X_5 - 0.11X_3^2 \quad (5)$$

The mathematical model (Eq. 5) enables the maximal point calculation (*K*

= 2.33) for the coded values of -0.83 and +1.41 corresponding to 8.83% of PEG and 6.02% of NaCl, respectively.

Each of the actual K values (y_o) is compared with the values predicted from the model, y_p , in Table 7. The comparison of the residuals with the error variance S_e^2 (0.23) indicates that none of the individual residuals exceeds twice the square root of the residual variance. All of the above considerations indicate an excellent adequacy of the regression model (20). After the optimum processing conditions were identified by the model derived by RSM, the xylanase partition was performed under the following conditions: PEG = 8.83%; pH 7.0 and NaCl = 6.02%. The experimental xylanase partition coefficient (K) was 2.21, whereas its value predicted by the model was 2.33. This experimental finding is in close agreement with the model prediction. Of the xylanase recovered, 80% remained in the top phase.

CONCLUSIONS

The partition behavior of *P. janthinellum* xylanase has been studied in aqueous two-phase systems. The response surface methodology (RSM) was useful in optimizing the xylanase partition coefficient and graphical analysis aided in locating optimum conditions. The %PEG, %NaCl, and pH were the most important factors affecting the response variable (K). The optimum partition conditions were selected at pH 7.0; PEG = 8.83% and NaCl = 6.02%. Adequacy of the model for predicting optimum response value was tested using these conditions. The experimental xylanase partition coefficient (K) was 2.21, whereas the value predicted by the model was 2.33. These results indicate that the model was adequate for the process. In the range of experimental conditions, MW PEG and phosphate concentration did not affect the xylanase partition coefficient. The results showed the feasibility of xylanase recovery by ATPS and the advantage of employing experimental design for determining optimal extraction conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

Silgia A. Costa acknowledges the financial support of CAPES/Brazil, in the form of a Master of Science fellowship, and FAPESP/São Paulo, Brazil. Thanks are also due to Adriane M. F. Milagres for valuable suggestions, and to Maria Eunice M. Coelho for revising this text.

REFERENCES

1. Eriksson, K. E. L., Blanchetter, R. A., Ander, P. (1990), in *Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components*, Springer-Verlag, New York.
2. Giovannozzi-Sermarini, G., Bertoni, G., Porri, A. (1989), in *Enzyme Systems for Lignocellulose Degradation*, (Coughlan, M. P. ed.) Elsevier New York, pp. 371-382.

3. Mutsaers, J. H. G. M. (1991), in *Xylans and Xylanases International Symposium*, Wageningen, The Netherlands, Novo Nordisk, p. 48.
4. Sharma, H. S. S. (1987), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26, 358-362.
5. Milagres, A. M. F. and Durán, N. (1992), *Prog. Biotechnol.* 7, 539-545.
6. Parthasarathy, V. R. (1990), *Tappi J.* 73, 243-247.
7. Senior, D. J., Hamilton, J., Bernier, R. L., and Dumanoir, J. R. (1992), *Tappi J.*, 11, 125-130.
8. Allison, R. W., Clark, T. A., Wrathall, S. H. (1993), *APPITA* 46, 269-273.
9. Durán, N., Milagres, A. M. F., Sposito, E., and Haun, M. (1995), in *ACS Symposium Series*, (Saddler, J. N. and Penner, N. H., eds.) American Chemical Society, San Diego, CA, pp. 332-338.
10. Palma, M. B., Milagres, A. M. F., Prata, A. M. R., Mancilha, I. M. (1996), *Proc. Biochem.* 31, 141-145.
11. Zijlstra, G. M., Michielsen, M. J. F., Gooijer, C. D., Po, L. A., and Tramper, J. (1996), *Biotechnol. Prog.* 12, 363-370.
12. Schmidt, A. S., Ventom, A. M., and Asenjo, J. A. (1994), *Enzyme Microb. Technol.* 16, 131-142.
13. Huddleston, J., Veide, A., Köhler, K., Flanagan, J., Enfors, S.-O., and Lyddiatt, A. (1991), *TBTec* 9, 381-388.
14. Kula, M.-R., Kroner, K. H., and Hustedt, H. (1982), in *Advances in Biochemical Engineering*, Fiechter, A. ed., 24, 73-118.
15. Box, G. E. P., Hunter, W. G., and Hunter, J. S. (1978), in *Statistics for Experiments*, John Wiley and Sons, New York.
16. Milagres, A. M. F. (1988), MSc. Thesis, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil.
17. Vogel, H. J. (1956), *Microbiol. Genet. Bull.* 13, 42-43.
18. Miller, G. L. (1959), *Anal. Chem.* 31, 426-428.
19. Albertsson, P. A. (1971), *Partitioning of Cell Particles and Macromolecules*, 2nd ed., Wiley Interscience, New York.
20. Sen, R. (1997), *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 68, 263-270.

Partitioning of xylanolytic complex from *Penicillium janthinellum* by an aqueous two-phase system

Silgia Aparecida Costa^a, Adalberto Pessoa Jr.^{b,*}, Inês Conceição Roberto^a

^aDepartment of Biotechnology, Faculty of Chemical Engineering of Lorena, Rod. Itajubá-Lorena, Km 74,5. 12.600-000, Lorena/SP, Brazil

^bBiochemical and Pharmaceutical Department/FCF/USP, CEP 05315-970, P.O. Box 66083, São Paulo-SP, Brazil

Abstract

This work evaluates the influences of five parameters (pH, PEG molecular mass, PEG concentration, concentration of buffer K_2HPO_4 – KH_2PO_4 and NaCl concentration) on xylanolytic complex partitioning produced by *P. janthinellum* in aqueous two-phase systems, using a 2^5 factorial experimental design. A mathematical model to quantify the influence of these parameters was attained and statistically tested. The optimum point for total protein extraction was obtained under the following conditions: pH 7.0, PEG 10 000, 3.67% PEG, 10% potassium phosphate and 12.4% NaCl. The partition coefficient (*K*) value experimentally obtained was 5.25 and that predicted by the model was 5.89. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Partitioning; Aqueous two-phase systems; *Penicillium janthinellum*; Experimental design; Xylanolytic complex

1. Introduction

The development of techniques and methods for the separation and purification of proteins has been an important prerequisite for many of the advances made in the biotechnology industry [1–4]. Aqueous two-phase systems (ATPS), either polymer–polymer–water or polymer–salt–water, provide a method which has several advantages, including biocompatibility, and it can be easily scaled up to the industrial level [5]. Proteins partition unevenly in the two phases, depending on the nature of the polymer molecular mass, polymer and salt concentration, ionic composition and strength, and pH of the system, together with the size, charge and hydrophobicity of the biomolecule, which are the principal

factors influencing the partition coefficient [6,7]. Factors and mechanisms that cause the uneven distribution of proteins between the two phases are little understood, but empirical rules have been developed. In practice, the technique requires further experimentation to find an adequate system for each particular application [8].

Biodegradation of xylan, a major component of the plant cell wall, requires the combined action of several enzymes [9]. The enzymatic complex produced by *P. janthinellum* is composed of endoxylanases that cleave internal xylosidic linkages on the xylan backbone and β -xylosidases that release xylosyl residues by endwise attack of xylooligosaccharides. The recent interest in xylan-degrading enzymes comes from their potential use in the pulp and paper industry for biobleaching, thus reducing the amount of toxic bleaching chemicals in plant effluents. According to Durán et al. [10] xylanases

*Corresponding author. Fax: +55-11-815-6386.

E-mail address: pessoajr@usp.br (A. Pessoa Jr.)

produced by *P. janthinellum* can be used for reducing the chlorine charge in eucalyptus-pulp bleaching with a simultaneous gain in brightness. These enzymes are also important in clarification of beer and juice, and in partial xylan hydrolysis in animal feed [11].

In this study, we identified some important variables to the process of liquid–liquid extraction of a xylanolytic complex from *P. janthinellum* using an aqueous two-phase system.

2. Experimental

2.1. Microorganism and culture media

The microorganism *P. janthinellum*, isolated from decaying wood by Milagres [12], was identified by the Biosystematic Research Center of Canada and deposited in their collection under the designation of CRC 87 M-115. The strain was initially maintained in silica stocks and later on agar slants. The fungus was cultivated at 30°C for 5 days in medium containing 1% (w/v) glucose, 0.1% (w/v) yeast extract, 2% (v/v) concentrated salt solution based on Vogel's medium [13] and 2% (w/v) agar-agar. The medium was autoclaved at 121°C for 15 min. The spore inocula were obtained by suspending spores in water, filtering through gauze and pouring the filtrate into Erlenmeyer flasks. The final concentration of spores was 10^5 /ml.

2.2. Preparation of sugar cane bagasse acid hydrolysate

In order to prepare the hydrolysate for fermentation, 800 g of dry milled bagasse was mixed with 8 l of sulphuric acid solution (0.25%) and autoclaved for 45 min at 121°C. The liquid fraction was separated by filtration and the pH adjusted to 5.5 with NaOH.

2.3. Enzyme production and determination

The cultivation medium for enzyme production was composed of the sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate described above supplemented with 2% (v/v) concentrated salt solution based on

Vogel's medium [12] and 1% yeast extract. The medium was then autoclaved for 15 min at 121°C. Shake-flask cultures were grown in Erlenmeyer flasks (125 ml) containing 25 ml of medium. Standard cultivation conditions were: temperature 30°C; initial pH 5.5 (uncontrolled); cultivation time 96 h. The medium was then filtered and the cells collected. Xylanase activities were determined by incubating 0.5 ml of diluted culture filtrate with 0.5 ml of an Birchwood xylan suspension (10 g l^{-1}) in 0.05 M phosphate buffer (pH 5.5) for 5 min at 50°C. The released reducing equivalents were measured by a colorimetric assay [14] based on the absorbance at 540 nm using xylose solution as a standard reference. Activity units were expressed as micromoles of reducing equivalents released per minute.

2.4. Protein determination and analytical electrophoresis

The amount of total protein was determined according to the Coomassie Blue method described by Bradford [15] using bovine serum albumin (BSA) as a protein concentration standard. Sodiumdodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis was performed according with method described by Weber et al. [16].

2.5. Preparation of phase systems

The extraction studies were carried out without cells. Phase systems were prepared from PEG, phosphate (KH_2PO_4 – K_2HPO_4) and NaCl in solid form. A 3-g amount of medium containing xylanase was added to the systems (total mass=10 g) and deionized water was used to adjust the concentrations (expressed as %, w/w) of the components to the desired values. By varying the proportion between KH_2PO_4 and K_2HPO_4 the pH of the system was adjusted. Centrifugation (2500 g, 10 min) to speed up phase separation was used after thorough vortex-mixing of the system components and the phase volume ratios were determined using graduated centrifuge tubes. Samples of the top and bottom phases were then assayed as for enzyme activity. During all partition experiments the temperature was ~25°C. All component (PEG, NaCl and

Table 1

Factors and levels in the five-factor three-level response surface design used for optimizing the xylanase partition coefficient by ATPS

Run number	Factors	Inferior level (−1)	Superior level (+1)	Center point (0)
X1	pH	5.0	8.0	6.5
X2	MM PEG	600	6000	4000
X3	% PEG	10.0	35.0	22.5
X4	% Phosphate	10.0	25.0	17.5
X5	% NaCl	0.0	10.0	5.0

phosphate) concentrations in this work were expressed as % (w/w).

2.6. Experimental designs and statistical analysis

A 2^5 experimental design [17] was used to evaluate the effect of the pH (X_1), PEG MM (X_2), PEG concentration (% w/w) (X_3), phosphate potassium concentration (% w/w) (X_4) and NaCl concentration (% w/w) (X_5) on the partition coefficient variable. For each of the five factors, high (coded value: +1) and low (coded value: −1) set points were selected (Table 1). Table 2 presents all the 32 (2^5) set point combinations that were made, and the partition coefficients, K , obtained. A statistical model for an optimized partition coefficient employing the significant variables was determined by the response surface regression procedure. The model is expressed by Eq. (1)

$$\hat{Y}_i = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i X_i + \sum_{i=1}^n b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n b_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

where Y_i =response variable, b_0 , b_i , b_{ii} and b_{ij} =regression coefficients; X_i and X_j =variables under study.

2.7. Chemicals

Birchwood 4-O-methyl- β -D-glucoroxylan (90% xylose) was obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA), and poly(ethylene glycol) (PEG) from Merck (Darmstadt, Germany). All the other chemicals were of analytical grade.

3. Results and discussion

Table 2 presents the design matrix of the variables (pH, MM-PEG, PEG concentration, phosphate potassium concentration and NaCl concentration) and the partition coefficients obtained after total protein extraction by ATPS. The results of the partition coefficients of total proteins varied in the range of 0 and 9 as a function of the conditions employed. Those equal to zero indicate that there was no phase separation, mainly due to the low concentration of the components or to the saturation of the phase systems. The treatment of the interaction effects on the partition-coefficient (K) is shown in Table 3. As can be seen the molecular mass of PEG (X_2), % PEG (X_3) and % NaCl (X_5) exerted a significant influence on the partition coefficient at the 5% level. The variables MM PEG (X_2) and % NaCl (X_5) both presented positive signal as main effects, whereas the variable % PEG (X_3) presented a negative signal. The second-order effects for the variables $X_2 X_3$ and $X_3 X_5$ were of negative signal. This indicates that the value of K can be increased with the increase in variable X_2 and decrease in variable X_3 . The variables $X_3 X_5$ presented the same effect, i.e. their partition coefficient values can be increased by decreasing and increasing X_3 and X_5 levels, respectively. The interaction effect of variables $X_2 X_5$ gave a positive signal, suggesting that an increase in any one these variables can increase the value of K . No significant effect of the pH (X_1) was observed in this study. On the contrary, in a study of xylanase extraction, Costa et al. [18] reported that the effect of pH was significant, while the effect of MM PEG was insignificant. However, the later exerted influence on the extraction of total proteins.

Table 2
Protein partition coefficient (K) from 2^5 -full factorial design with center point under different treatments

Assay no.	Assay sequence	Factors ^b					K^a
		X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	
1	25	-1	-1	-1	-1	-1	0
2	36	+1	-1	-1	-1	-1	0
3	20	-1	+1	-1	-1	-1	0
4	28	+1	+1	-1	-1	-1	1.08
5	22	-1	-1	+1	-1	-1	0
6	4	+1	-1	+1	-1	-1	0.23
7	34	-1	+1	+1	-1	-1	0
8	23	+1	+1	+1	-1	-1	0.39
9	8	0	0	0	0	0	0.40
10	14	-1	-1	-1	+1	-1	0
11	26	+1	-1	-1	+1	-1	0.56
12	6	-1	+1	-1	+1	-1	1.05
13	3	+1	+1	-1	+1	-1	0.68
14	12	-1	-1	+1	+1	-1	0
15	19	+1	-1	+1	+1	-1	0.18
16	7	-1	+1	+1	+1	-1	0
17	35	+1	+1	+1	+1	-1	0
18	16	0	0	0	0	0	0.38
19	9	-1	-1	-1	-1	+1	0
20	30	+1	-1	-1	-1	+1	0.35
21	17	-1	+1	-1	-1	+1	7.9
22	15	+1	+1	-1	-1	+1	1.89
23	5	-1	-1	+1	-1	+1	0
24	21	+1	-1	+1	-1	+1	0
25	29	-1	+1	+1	-1	+1	0
26	1	+1	+1	+1	-1	+1	0
27	24	0	0	0	0	0	0.44
28	2	-1	-1	-1	+1	+1	0
29	33	+1	-1	-1	+1	+1	0.42
30	31	-1	+1	-1	+1	+1	9.47
31	11	+1	+1	-1	+1	+1	2.16
32	18	-1	-1	+1	+1	+1	0
33	13	+1	-1	+1	+1	+1	0.11
34	27	-1	+1	+1	+1	+1	0
35	10	+1	+1	+1	+1	+1	0
36	32	0	0	0	0	0	0.43

^a $K = (K_1 + K_2)/2$, Average partition coefficient.

^b X_1 =pH, X_2 =PEG molecular mass, X_3 =% PEG, X_4 =% potassium phosphate, X_5 =% NaCl.

As a function of these results, an analysis of variance (ANOVA) was made considering all the significant effects shown in Table 4. The ANOVA showed that the determination coefficient value ($R^2 = 0.587$) was low, and that the P value for the lack-of-fit ($P < 0.05$) was significant, which indicates that the linear model is not adequate for this study. A new region of work was investigated. Initially a path of steepest ascent was proposed to alter the work region and to obtain higher partition coefficient (K) values.

According to the estimated effects shown in Table 3, X_3 and X_5 (negative and positive signals, respectively) suggested that the displacement of the experimental region should be made by decreasing the X_3 level and increasing X_5 level. X_2 was not coded because the value of PEG molecular mass commercially available does not adjust to the values calculated by the mathematical equations. Considering that the experimental design suggests an increase in PEG molecular mass and that PEG-10 000 solution

Table 3
Estimated effects, standard errors and Student's *t*-test of 2^5 factorial design with four center points

Variables ^b	Estimated effects	Standard error	<i>t</i> Values
Average	0.761	±0.227	—
X_1	−0.648	±0.482	1.34
X_2	1.388	±0.480	2.89*
X_3	−1.540	±0.482	3.19*
X_4	0.174	±0.482	0.36
X_5	1.133	±0.482	2.35*
X_1X_2	−0.879	±0.482	1.82
X_1X_3	0.761	±0.482	1.58
X_1X_4	−0.153	±0.482	0.32
X_1X_5	−0.906	±0.482	1.88
X_2X_3	−1.439	±0.482	2.98*
X_2X_4	0.088	±0.482	0.18
X_2X_5	1.144	±0.482	2.37*
X_3X_4	−0.215	±0.482	0.45
X_3X_5	−1.219	±0.482	2.53*
X_4X_5	0.078	±0.482	0.16

* Significant at the 5% level ($t=2.08$).

^b X_1 = pH, X_2 = PEG molecular mass, X_3 = %PEG, X_4 = % potassium phosphate, X_5 = % NaCl.

is too viscous, we decided to vary only X_3 and X_5 and to fix the PEG molecular mass at 10 000. This decision can explain the reason why the K value did not reach its highest value ($K=9.47$) shown in Table 2, even at the optimized extraction conditions (Fig. 1). PEG-10 000 has the advantage of being easily handled because it is in the form of a very fine powder. The centre point was used to start the displacement of the experimental region. Table 5 shows the displacement levels, coded variables and

Fig. 1. Trajectory of planning of a path of steepest ascent proposed in Table 5.

partition coefficient values. Regarding the displacement levels, it was observed that for each 0.22 retreated unity in the value of X_3 (%PEG) it is necessary to increase 0.17 unity in the value of X_5 (%NaCl). Substituting the displacement levels (Table 5) in Eqs. (2) and (3) the coded values of X_3 and X_5 were obtained

$$X_3 = (\% \text{ PEG} - 22.5)/12.5 \quad (2)$$

$$X_5 = (\% \text{ NaCl} - 5)/5 \quad (3)$$

The displacement of a path of steepest ascent using the coded variables can be seen through the trajec-

Table 4
Analysis of variance (ANOVA) for the significant variables (X_1 , X_3 and X_5) that represent the liquid–liquid extraction of protein in the aqueous two-phase system quadratic model^a

Source of variations ^b	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	<i>F</i> value	<i>P</i> value
Factor X_2	15.544	1	15.544	8.94	0.0059
Factor X_3	18.988	1	18.988	10.92	0.0027
Factor X_5	10.271	1	10.271	5.91	0.0220
X_2X_3	16.574	1	16.574	9.53	0.0046
X_2X_5	10.476	1	10.476	6.03	0.0208
X_3X_5	11.895	1	11.895	6.84	0.0144
Lack of fit	11.952	2	5.976	3.44	0.0468
Pure error	46.936	27	1.738		
Total (corr.)	142.639	35			

^a $R^2=0.587$.

^b X_1 = pH, X_2 = molecular mass, X_3 = % PEG, X_4 = % potassium phosphate, X_5 = % NaCl.

Table 5

Values of displacement levels, coded variables and results of partition coefficients (K) of total protein obtained altering the work region

Treatment	Displacement levels		Coded variables		K_{protein}
	X_3 (%PEG)	X_5 (%NaCl)	X_3 (%PEG)	X_5 (%NaCl)	
1	0	0	22.50	5.00	0.76
2	−1.11	0.81	8.62	9.05	2.31
3	−1.33	0.98	5.87	9.90	3.24
4	−1.55	1.14	3.12	10.70	4.93
5	−1.77	1.30	0.37	11.70	0

tory presented in Fig. 1. Fig. 1 also shows that the K values of total proteins increased when the percentage PEG decreased from 22.5 to 3.12% and when the percentage NaCl increased from 5 to 10.7%. The increase in K value was observed until the 4th test. Starting from the 5th test K value decreased from 4.93 to 0. When K reached the maximum value ($K=4.93$) it was necessary to stop the displacement and investigate the region around this test. A 2^3 factorial design with centered face was proposed to study the region around the 4th test (Table 6).

Table 6 shows the matrix of the experimental design and the results of the partition coefficients (K). Substituting the negative and positive signals in Eqs. (4) and (5) it was possible to code the values of X_3 and X_5 . The results of the partition coefficients obtained ranged between 0 and ~7.

$$X_3 = (\% \text{ PEG} - 3.12)/2.75 \quad (4)$$

$$X_5 = (\% \text{ NaCl} - 10.7)/1.7 \quad (5)$$

Based on these results, an ANOVA for K response

variable was carried out considering all the effects (Table 7). This analysis revealed that X_3 and X_5 and the quadratic effect of X_3 had significant influence ($P<0.05$) on K value. From the lack-of-fit ($P>0.05$) it can be seen that the quadratic model presents a good fit for this study.

Table 8 shows the ANOVA of model regression. The model is significant at 5% probability level, giving a determination coefficient $R^2=0.91$. The percentage of variance, explained by the regression, that is the ratio between the sum of squares due to the regression and the total sum of squares, is 94%. This value can not be compared with 100% owing to the contribution of lack-of fit to pure error. In this study 99.66% of the model can be explained. The mathematical model to represent the process of liquid–liquid extraction of protein in aqueous two-phase system considering the significant variables is described by the following Eq. (6)

$$\hat{y} = 4.94 + 1.5X_3 + 0.79X_5 - 3.44X_3^2 \quad (6)$$

where $\hat{y}$ =partition coefficient, X_3 =coded % PEG level, X_5 =coded % NaCl level.

Table 6

Values of X_3 and X_5 variables coded by Eqs. (2) and (3) and the partition coefficients obtained

Treatment	% PEG	% NaCl	% PEG	% NaCl	K
1	−1	−1	0.37	9.0	0 ^a
2	+1	−1	8.62	9.0	2.19
3	−1	+1	0.37	12.4	0 ^a
4	+1	+1	8.62	12.4	3.63
5	−1	0	0.37	10.7	0 ^a
6	+1	0	8.62	10.7	3.19
7	0	−1	3.12	9.0	3.45
8	0	+1	3.12	12.4	6.79
9	0	0	3.12	10.7	4.50
10	0	0	3.12	10.7	4.87
11	0	0	3.12	10.7	5.09

^a No phase separation.

Table 7

ANOVA for the significant variables (X_3 and X_5) that represent the total protein liquid–liquid extraction in aqueous two-phase system

Source of variations ^a	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F value	P value
Factor X_3	13.530	1	13.530	152.19	0.0065 ^a
Factor X_5	3.808	1	3.808	42.84	0.0226 ^a
X_3X_5	0.518	1	0.518	5.83	0.1371
X_3^2	30.268	1	30.268	340.47	0.0029 ^a
X_5^2	0.011	1	0.011	0.13	0.7534
Lack of fit	2.436	3	0.812	9.14	0.1003
Pure error	0.177	2	0.088		
Total (corr.)	52.725	10			

^a $P < 0.05$; $R^2 = 0.95$.^b X_3 = %PEG, X_5 = % NaCl.

The response surface for the model is shown in Fig. 2 and can be expressed by Eq. (6) showing the values of partition coefficient as a function of X_3 (% PEG) and X_5 (% NaCl). Deriving Eq. (6) and making it equal to zero, we can find the variable levels that you provide the maximum value for partition coefficient. The maximum total protein partition coefficient value predicted by the model was 5.89 (system: PEG-10 000, 3.67% PEG, 10% potassium phosphate and 12.4% NaCl) and the value experimentally obtained was 5.25. This value is considered to be good, when the standard error is taken into account.

To conclude this work an electrophoretic analysis was carried out to show the profile of the total proteins obtained after extraction carried out under the conditions defined by the experimental design. Electrophoresis was also carried out under the conditions optimized by Costa et al. [18] to extract xylanases from *P. janthinellum* by ATPS and compared in this work.

Fig. 3 shows the electrophoretic profile of the

protein bands of the initial broth obtained from the cultivation of *P. janthinellum* in sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate (line 3) and also from the top (line 4) and bottom phases (line 5) after the extraction using the optimum conditions of the xylanase experimental design (pH 7.0, PEG 4000, 8.83% PEG, 10% phosphate potassium and 6.02% NaCl). The initial broth contained 42.12 U/ml of xylanases and 269.86 mg/ml of total proteins. After concentration by lyophilization, 63.67 U/ml of xylanases and 407.55 mg/ml of total proteins were obtained. Line 3 (fraction of initial broth) shows the presence of nine bands of proteins with relative molecular masses in the range of $10 \cdot 10^3$, $20 \cdot 10^3$, $30 \cdot 10^3$, $45 \cdot 10^3$, $60 \cdot 10^3$, $80 \cdot 10^3$ and $100 \cdot 10^3$ Da. After the liquid–liquid extraction in aqueous two-phase system, the enzymes partitioned between the phases, those of lower molecular mass stayed on the top phase and those of higher molecular mass on the bottom phase. Line 4 (top phase obtained at the optimum point of xylanase extraction) shows the presence of three bands with relative molecular

Table 8

ANOVA for the total regression of the model that represents the liquid–liquid extraction process of total protein in aqueous two-phase system quadratic model^a

Source of variations	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	F value	P value
Model	3	49.580	16.526	36.79	0.0001
Lack of fit	5	2.968	0.593	6.67	
Pure error	2	0.177	0.088		
Total (corr.)	10	52.724			

^a $R^2 = 0.91$; % of explained variance: 94%; % of explainable variance: 99.66%.

Fig. 2. Response surface for the partition coefficient (K) of total protein as a function of the variables X_3 (% PEG) and X_4 (% NaCl).

masses close to $14 \cdot 10^3$, $20 \cdot 10^3$ and $24 \cdot 10^3$. By comparing lines 3 (initial broth) and 4 it was observed that the initial broth presented several bands and after the extraction step only three of them

	1	2	3	4	5
116 kDa	—		—		—
97 kDa	—		—		—
66 kDa	—	—	—		—
45 kDa	—	—	—		
36 kDa		—			
29 kDa	—	—	—		
24 kDa		—	—	—	
20 kDa		—	—	—	
14 kDa		—	—	—	

Fig. 3. Electrophoresis (SDS-PAGE) for the optimized conditions of xylanase liquid–liquid extraction in aqueous two-phase system. Lines: 1=markers of molecular mass ($116 \cdot 10^3$, $97 \cdot 10^3$, $66 \cdot 10^3$ and $45 \cdot 10^3$); 2=markers of low molecular mass ($66 \cdot 10^3$, $45 \cdot 10^3$, $36 \cdot 10^3$, $24 \cdot 10^3$, $20.1 \cdot 10^3$ and $14 \cdot 10^3$); 3=initial broth; 4=top phase of system; 5=bottom phase of system.

were present. The results obtained by Rodrigues [19], using the technique of liquid–liquid extraction by reverse micelle, and by Cortez and Pessoa [20], using ethanol precipitation, suggest that the bands of 20 and $24 \cdot 10^3$ Da correspond to endoxylanases. With the optimized conditions 80% of xylanases was recovered and an enrichment factor of 1.34 times on the top phase was obtained. Concerning the band of $14 \cdot 10^3$ Da, it was found that this value is very close to the results obtained by Filho et al. [21], who purified an endoxylanase of $16 \cdot 10^3$ Da rel. mol. mass produced by *Myrthecium verrucaria*, and to the results obtained by Donnelly and Crawford [22], who obtained a p-coumaric esterase of $11 \cdot 10^3$ Da rel. mol. mass. Therefore, it is not possible to ascertain that the $14 \cdot 10^3$ Da rel. mol. mass band corresponds to one of these two enzymes.

On line 5 an electrophoretic run was made using the bottom phase of the extraction system. The presence of three bands with molecular masses of $\approx 60 \cdot 10^3$, $80 \cdot 10^3$ and $100 \cdot 10^3$ Da rel. mol. masses was observed. The band of $60 \cdot 10^3$ Da is probably an endoxylanase. Studies of precipitation with ethanol conducted by Cortez and Pessoa [20] showed bands of $104/110 \cdot 10^3$ Da rel. mol. mass, whereas Milagres [23] used a S-300 Sephacryl column and ultrafiltration, and obtained a band of $74.5 \cdot 10^3$ Da rel. mol.

mass. These authors concluded that these bands correspond to the β -xylosidase enzyme, which is present in the xylanolytic complex produced by *P. janthinellum*. The literature [24] reports that *Fusarium oxysporum* has produced endoxylanases with a relative molecular mass of $80 \cdot 10^3$ Da. A comparison between line 3 and lines 4 and 5 reveal that three enzymes whose relative molecular masses were $10 \cdot 10^3$, $30 \cdot 10^3$ and $50 \cdot 10^3$ Da were present in the initial broth but did not appear on lines 4 and 5. It is difficult to explain the absence of these bands. However, two hypotheses that can be suggested are the adherence of these enzymes to the interface of the system and the low protein concentration after partition, which impedes the detection of both the enzymes and the proteins. Fig. 4 shows the electrophoretic analysis of the optimum point of total protein extraction (pH 7.0, PEG 10 000, 3.67% PEG, 10% potassium phosphate and 12.4% NaCl). Line 3 (fraction of initial broth) presents the reproducibility of the bands shown in Fig. 3. Line 4 represents the top phase sample obtained after the extraction made at the optimum point of the total protein planning. The presence of varied bands in a range of $10 \cdot 10^3$, $20 \cdot 10^3$, $24 \cdot 10^3$, $30 \cdot 10^3$ and $10 \cdot 10^3$ Da rel. mol. masses can be observed. The $20 \cdot 10^3$ and $24 \cdot 10^3$ Da

bands possibly correspond to the endoxylanase purified by Rodrigues [19]. Line 5 presents the bottom phase sample after the liquid–liquid extraction in aqueous two-phase system. The presence of bands in the range of $30 \cdot 10^3$, $40 \cdot 10^3$, $60 \cdot 10^3$, $80 \cdot 10^3$ and $100 \cdot 10^3$ Da rel. mol. masses was observed. The bands of $30 \cdot 10^3$, $40 \cdot 10^3$ and $60 \cdot 10^3$ Da probably correspond to the endoxylanases, since a significant quantity of studies on these enzymes report the same molecular masses [24]. Possibly the bands of $80 \cdot 10^3$ and $100 \cdot 10^3$ Da are β -xylosidases, for they correspond to the bands obtained in Fig. 3, line 5. Figs. 3 and 4 are included as electrophoretic chart to facilitate their understanding and to dispel possible doubts raised by the poor quality of the picture.

4. Nomenclature

K	Partition coefficient (ratio of biomolecule concentration in the top phase to that in the bottom phase)
MM PEG	Poly(ethylene glycol) molecular mass
ATPS	Aqueous two-phase systems

Acknowledgements

S.A.C. acknowledges the financial support of CAPES/Brazil, in the form of a Master of Science fellowship, and FAPESP/São Paulo, Brazil. Thanks are also due to Adriane M.F. Milagres for her valuable suggestions, and to Maria Eunice M. Coelho for revising this text.

References

- [1] A.S. Schmidt, A.M. Venton, J.A. Asenjo, *Enz. Microb. Technol.* 16 (1994) 131.
- [2] E.M.G. Rodrigues, A. Pessoa Jr., A.M.F. Milagres, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 77–79 (1999) 779.
- [3] E.M.G. Rodrigues, A.M.F. Milagres, A. Pessoa Jr., *Proc. Biochem.* 34 (1999) 121.
- [4] E.V. Cortez, A. Pessoa Jr., A.N. Assis, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 70–72 (1998) 661.
- [5] G.V. Gaikar, S.S. Bodhankar, V.J. Latha, *Chem. Technol. Biotechnol.* 67 (1996) 329.
- [6] M.-R. Kula, *Bioseparation* 1 (1990) 181.

Fig. 4. Electrophoresis (SDS–PAGE) for the optimized conditions of total protein liquid–liquid extraction in aqueous two-phase system. Lines: 1=markers of molecular mass ($116 \cdot 10^3$, $97 \cdot 10^3$, $66 \cdot 10^3$ and $45 \cdot 10^3$); 2=markers of low molecular mass ($66 \cdot 10^3$, $45 \cdot 10^3$, $36 \cdot 10^3$, $24 \cdot 10^3$, $20 \cdot 10^3$ and $14 \cdot 10^3$); 3=initial broth; 4=top phase of system; 5=bottom phase of system.

- [7] M.J. Sebastião, P. Martel, A. Baptista, S.B. Petersen, J.M.S. Cabral, M.R. Aires-Barros, *Biotechnol. Bioeng.* 56 (1997) 248.
- [8] H.M.F. Lahore, M.V. Miranda, E.R. Fraile, M.J.B.J. Bonino, O. Cascone, *Process Biochem.* 30 (1996) 615.
- [9] C. López, A. Blanco, F.I.J. Pastor, *Biotech. Lett.* 20 (1998) 243.
- [10] N. Durán, A.M.F. Milagres, E. Sposito, M. Haun, in: J.N. Saddler, M.H. Penner (Eds.), *ACS Symposium Series*, Plenum, New York, 1995, p. 332.
- [11] M.G. Gutierrez, R.P. Tengerdy, *Biotechnol. Lett.* 20 (1998) 45.
- [12] A.M.F. Milagres, 1988, Alguns aspectos de regulação de β -xilanase extracelulares de *Penicillium janthinellum*. M.Sc. Thesis, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil.
- [13] H.J. Vogel, *Microbial Genet. Bull.* 13 (1956) 42.
- [14] G.L. Miller, *Anal. Chem.* 31 (1959) 426.
- [15] M.A. Bradford, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248.
- [16] K. Weber, J.R. Pringle, M. Osborn, *Methods Enzymol.* 26 (1972) 3.
- [17] G.E.P. Box, W.G. Hunter, J.S. Hunter, *Statistics for Experimenters: an Introduction to Design, Data Analysis and Model Building*, Wiley, New York, 1978.
- [18] S.A. Costa, A. Pessoa Jr., I.C. Roberto, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 70–72 (1998) 629.
- [19] E.M.G. Rodrigues, 1997. Extração líquido-líquido de xilanase por micela reversa, M.Sc Thesis, Faenquil, Brazil.
- [20] E.V. Cortez, A. Pessoa Jr., *Proc. Biochem.* 35 (1999) 277.
- [21] E.X.F. Filho, J. Plus, M.P. Coughlan, *Enzyme Microb. Technol.* 15 (1993) 535.
- [22] P.K. Donnelly, D.L. Crawford, *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (1988) 2237.
- [23] A.M.F. Milagres, N. Durán, *Prog. Biotechnol.* 7 (1992) 539.
- [24] A. Sunna, G. Antranikian, *Crit. Rev. Biotechnol.* 17 (1997) 39.

Anexo II

Artigos já publicados ou em fase de publicação sobre o tema:

Extração Líquido-Líquido em Sistemas Micelares Reversos

1. Rodrigues, E. M. G.; **Pessoa Jr., A.**; Milagres, A. M. F. Xylanase Recovery: Effect of Extraction Conditions on the AOT-Reversed Micellar Systems Using Experimental Design. **Process Biochemistry**, **34**(2):121-125, 1999.
2. Rodrigues, E. M. G.; **Pessoa Jr., A.**; Milagres, A. M. F. Screening of Variables in Xylanase Recovery Using BDBAC Reversed Micelles. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. **77-79**:779-788, 1999.
3. Rodrigues, E. M. G.; Milagres, A. M. F.; **Pessoa Jr., A.** Selective Recovery of Xylanase from *Penicillium Janthinellum* Using BDBAC Reversed Micelles. **Acta Biotechnologica**. **(19)**2:157-161, 1999.
4. Hasmann, F. A.; **Pessoa Jr, A.** Roberto, I.C. Optimization of pH and Temperature for β -Xylosidase Recovery by Reversed Micelles. **Biotechnology Techniques**. **13**(4):239-242, 1999.
5. Kilikian, B.V.; Bastazin, M.R.; Minami, N.M.; Gonçalves, E.M.R., **Pessoa Jr, A.** Liquid-Liquid Extraction by Reversed Micelles in Biotechnological Process. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. **17**(01):29-38, 2000.
6. Hasmann, F. A.; **Pessoa Jr. A.**; Roberto, I.C. β -Xylosidase Recovery by Reversed Micelles: Use of Cationic Surfactant. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. **84-86**:1101-1111, 2000.
7. Cortez, E. V.; Almeida, M. G. F.; Roberto, I. C.; Pessoa-Jr, A.; Vitolo, M. Extraction by Reversed Micelles of the Intracellular Enzyme Xylose Reductase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, **91-93**, 2001 (no prelo).
8. Hasmann, F. A., Pessoa-Jr, A.; Roberto, I. C. Screening of Variables in β -Xylosidase Recovery Using CTAB Reversed Micelles. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, **91-93**, 2001 (no prelo).

Xylanase recovery: effect of extraction conditions on the AOT-reversed micellar systems using experimental design

E.M.G. Rodrigues, A.M.F. Milagres *, A. Pessoa Jr.

Depto. Biotecnologia/FAENQUIL, Rod. Itajubá-Lorena, Km 74,5, 12.600-000, Lorena, Brazil

Received 7 October 1997; received in revised form 5 May 1998; accepted 10 May 1998

Abstract

Xylanase recovery using AOT-reversed micelles was evaluated under different experimental conditions. A full factorial design with centre point was employed to verify the influence of different factors on the recovery. A mathematical model represented xylanase yield (Y) as a function of pH and temperature: $Y = 8.75 - 4.31A^2 - 3.13C^2$, where A = pH and C = temperature. The highest xylanase recovery, indicated by the model (10.2%), was attained at pH 6.3, AOT = 0.57 M and temperature 46.8°C. A new xylanase extraction was performed under these conditions to test the model. The recovery yield obtained (9.1%) showed a close similarity between the experimental result and the value predicted by the model. © 1999 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: AOT-reversed micelles; Xylanase; Liquid-liquid extraction; Statistical design; *Penicillium janthinellum*

Nomenclature

a_{surf}	area per surfactant molecule in the interface
M_{aqu}	water molecular weight
N_{av}	Avogadro's number
pI	Isoelectric point
R_m	radius of the aqueous core of the reverse micelle
W_o	Water content of the micelles
ρ_{aq}	density of water
AOT	anionic detergent aerosol-OT

1. Introduction

The use of xylanases to facilitate pulp bleaching lowers chlorine consumption and reduces toxic discharges in the paper and textile industries [1–3]. In addition, xylanase has been used in bread making [4], beer and juice clarification [5] and partial xylan hydrolysis in animal feed [6]. The xylanase produced by *Penicillium janthinellum* strain contains high xylanolytic activity, but no detectable cellulolytic activity [7]. Cultivation conditions for producing xylanase using sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate were investi-

gated by Palma et al. [8], but studies of downstream processing are still required.

The purification of proteins using reverse micellar systems has been studied extensively [9–19] since this technique allows the recovery and concentration of protein from dilute aqueous solution containing other bioproducts [10]. Reversed micelles are aggregates of surfactant molecules in organic solvents. These surfactant aggregates consist of a polar inner core and an inner layer made up of the surfactant hydrophilic head [13]. Reversed micelles are known as water-in-oil microemulsions. A microemulsion is a thermodynamically stable isotropic dispersion of two immiscible liquids consisting of microdomains of one or both liquids stabilized by an interfacial film of surfactant molecules. An important property of a microemulsion is its water oil solubilization as microdroplets dispersed in the continuous phase [14]. Some proteins can be solubilized in these polar cores, and thus solubilized in the hostile organic solvent without denaturation. A potential biotechnological application of reverse micelles is as an alternative solvent extraction technique for protein purification, in particular for prepurification and bulk reduction as one of the first steps in downstream processing [15]. Liquid-liquid extraction using reversed micelles as the extractant to separate and purify proteins has the advantage of high efficiency and can be

* Corresponding author.

made selective and to run continuously. It is also an easily scaleable and energy-saving process [12,13]. The overall liquid–liquid extraction process by reverse micelles consists of two fundamental steps: a forward extraction by which a protein is transferred from an aqueous solution to a reverse micellar organic phase and a back extraction by which the protein is released from the reverse micelles and transferred to an aqueous phase to be subsequently recovered [9,10]. During the last few years many publications have appeared on enzyme extraction using reversed micelles of the anionic surfactant AOT (sodium di-2-ethylhexyl sulfosuccinate) and show its high potentiality [16–20].

This work describes the transfer of extracellular xylanase from *P. janthinellum* to a reversed micellar phase of the anionic surfactant AOT and the influence of the following factors: pH, temperature, surfactant concentration and buffer concentration [19,21,22]. The extraction and recovery of xylanase enzymic protein has been investigated with particular reference to the yield of the extraction process and to the recovery of enzymic activity. Fractional factorial designs, in which variables can be examined after few experiments, are very efficient [23]. This methodology allows the verification of the effects of the variables individually and their interactions. A statistical model correlating the variables would permit the optimization of the extraction processes [24].

2. Materials and methods

2.1. Microorganisms and growth conditions

The isolation of *P. janthinellum* from decaying wood has been described earlier [25]. This microorganism was identified by the Biosystematic Research Center of Canada and deposited in their collection under the designation of CRC 87M-11 5. The strain was maintained in silica stocks and by transfer, on agar slants. The fungi were cultivated at 30°C for 5 days in medium containing 2% glucose, 0.25% yeast extract, 2% (v/v) concentrated salt solution based on Vogel's medium [26] and 2% agar–agar. The medium was sterilized at 112°C for 15 min. In order to obtain the spore inocula, spores were suspended in water and the suspension was filtered through gauze placed on Erlenmeyer flasks. The final spore concentration was 10^5 ml⁻¹.

2.2. Preparation of sugar cane bagasse acid hydrolysate

In order to prepare the hydrolysate for cultivation, 800 g of dry milled bagasse was mixed with 8 litres of sulphuric acid solution (0.25%) and autoclaved for 45 min at 121°C. The liquid fraction was separated by filtration and the pH adjusted to 5.5 with NaOH.

Table 1

Experimental range and levels of the independent variables

Variables	Range and levels		
	–1	0	+1
pH	2.9	6.3	9.8
AOT(M)	0.17	0.37	0.57
Temperature (°C)	26.8	36.8	46.8

2.3. Enzyme production

The cultivation medium consisted of the above sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate supplemented with 2% (v/v) concentrated salt solution based on Vogel's medium and 0.1% yeast extract. The medium was then autoclaved for 15 min at 112°C and poured into 125-ml Erlenmeyers flasks for cultivation. Each flask contained 25 ml of medium. Standard cultivation conditions were: temperature 30°C; initial pH 5.5 (uncontrolled); agitation 60 rpm, cultivation time 96 h.

2.4. Liquid–liquid fraction

The enzyme was extracted from the whole clarified fermentation broth by AOT-reversed micelles in iso-octane by a two-step procedure. In the first step (forward-extraction), 4.0 ml of the aqueous xylanase solution was mixed with an equal volume of micellar microemulsion

Table 2

Xylanase recovery (%) using the 2³-full factorial design +4 centre points and 6 centre faces under different treatments^a

Assay	Factors			Xylanase recovery (%)
	A	B	C	
1	–1	–1	–1	3.17
2	+1	–1	–1	0.00
3	–1	+1	–1	3.62
4	+1	+1	–1	2.43
5	–1	–1	+1	0.00
6	+1	–1	+1	0.00
7	–1	+1	+1	1.15
8	+1	+1	+1	0.00
9	–1	0	0	0.00
10	+1	0	0	4.32
11	0	–1	0	6.04
12	0	+1	0	11.53
13	0	0	–1	3.45
14	0	0	+1	3.24
15	0	0	0	7.82
16	0	0	0	6.03
17	0	0	0	5.17
18	0	0	0	6.59

^a A = pH (–1 = 2.9; 0 = 6.3; +1 = 9.8); B = AOT (M) (–1 = 0.17; 0 = 0.37; +1 = 0.57) C = Temperature (°C) (–1 = 26.8; 0 = 36.8; +1 = 46.8). Average values: 2 repetitions.

Table 3

Estimated effects, Student's *t*-test and standard errors of 2³ full factorial design with centre face^a

Variables	Estimated effects	Standard error	<i>t</i> -values
Average	6.438	±0.437	~
A	−0.238	±0.703	0.339
B	1.904	±0.703	2.708
C	−1.656	±0.703	2.356
AB	0.208	±0.786	0.265
AC	0.803	±0.786	1.022
BC	−0.433	±0.786	0.552
AA	−8.629	±1.350	6.397*
BB	4.621	±1.350	3.426*
CC	−6.259	±1.350	4.639*

^a A = pH; B = AOT (M); C = Temperature (°C). *Significant ($t_{3,0.95} = 3.182$).

(AOT in iso-octane), the pH of the aqueous phase solution being adjusted by adding phosphate or acetate buffer. The equilibrium phase was obtained by intense agitation on a vortex. The phases were separated by centrifugation at 2800 × *g* for 5 min. Two milliliters of xylanase-AOT-micellar phase were mixed with 2.0 ml of fresh aqueous phase (acetate buffer 1.0 M at pH 5.5 with 0.5 M NaCl), in order to transfer the enzyme from the micelles to this aqueous phase (backward-extraction), which was finally collected by centrifugation (2800 × *g*; 5 min). Both aqueous phases were assayed to determine enzyme activity. The extraction results are reported in terms of total activity recovered (%) in the strip phase using the xylanase content of the initial aqueous phase for reference. Usually, about 10% of the total activity was lost in the balance, which could be attributed to denaturation.

2.5. Determination of enzyme activities

Xylanase activities were determined according to Bailey et al. [27]. The released reducing-equivalents were measured by colorimetric assay [28] using xylose solution as a standard reference. Activity units were expressed in micromoles of reducing equivalents released per minute at 50°C. The enzyme activity during the extraction experiments varied between 40 and 60 U ml^{−1}.

2.6. Water determination

Water content (Wo: water in oil) is defined as the ratio of water molecules over surfactant molecules per reverse micelle {Wo = [H₂O]/[BDBAC]}. It is proportional to the radius of the aqueous core of the reverse micelle (*R*_m), i.e. $R_m = [3WoM_{\text{aqu}}]/[a_{\text{surf}}N_{\text{av}}\rho_{\text{aqu}}]$, where: *M*_{aqu} is the water molecular weight, ρ_{aqu} the density of water, and *a*_{surf} denotes the area per surfactant molecule in the interface, which depends on the proper-

ties of the surfactant as well as on those of the aqueous and organic phases. For ionic surfactants at room temperature, *a*_{surf} is in the range 0.5–0.7 nm² [11] and *N*_{av} is Avogadro's number. Water content values are measured as % by weight using a Karl–Fischer–Moisture Titrator (Mettler DL18).

2.7. Experimental designs

A 2³ full factorial central composite design with six star points and four replicates at the centre point, and eighth cube points was employed to fit a second order polynomial model which indicated that 18 experiments were required for this procedure. Temperature, AOT and buffer concentration were selected as experimental factors. The range and levels of the variables investigated in this study are shown in Table 1.

2.8. Chemicals

Birchwood 4-*O*-methyl-β-D-glucoroxylan (90% xylose) was obtained from Sigma (St. Louis, MO). The anionic surfactant AOT (purity > 99%) was purchased from Merck (Darmstadt, FRG). All other chemicals were of analytical grade and bought from commercial sources.

3. Results and discussion

A liquid–liquid extraction of xylanase by reversed micelles was evaluated under different experimental conditions using an experimental design [23,29]. The effects of different pH, temperature, AOT and buffer concentration levels on the extraction yield were studied. The choice of the levels to be tested was based on the biochemical characteristics of an endoxylanase produced by *P. janthinellum*. This enzyme, purified by Milagres [30] had a molecular mass of 54 kDa. The optimum pH was 5.5 and optimum temperature 50°C. This endoxylanase was stable for 3 h at temperatures between 10 and 48°C and pH from 3.5 to 7.0. Other kinds of xylanases were present in the culture medium of *P. janthinellum*, but their characteristics were not considered for the extraction by reversed micelles. A 2⁴

Table 4

Regression coefficients, *t*-values, standard errors, and significance level of the model

Term of the model	Regression	Standard error	<i>t</i> -values	<i>p</i> -value
Average	6.438	±0.706	9.121	0.000
A ²	−4.314	±1.090	3.958	0.001
B ²	2.311	±1.090	2.119	0.052
C ²	−3.129	±1.090	2.871	0.012

Table 5
Analysis of variance (ANOVA) for the model

Source of variations	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	F-value	p-value
Model	3	131.903	43.968	13.655	0.0002
Residue	14	45.078	3.220		
Total	17	176.981			

full factorial design in two levels with 4 centre points (to determine the experimental error) was employed. The yield extraction values obtained from the 20 assays were $< 3.1\%$. However, under the best extraction conditions (pH 7.0, temperature 30°C and AOT concentration 0.3 M) the variables were significant. Similar results (2.8% recovery) were obtained by Zamarro et al. [31] after extraction by reversed micelles using AOT as surfactant. Yields higher than 2.0% were obtained under the highest temperature and AOT concentration. As a function of these results a 2^3 full factorial design was performed and all the factors studied (pH, temperature and AOT concentration) were significant at the 5% level ($p < 0.05$). A linear model was obtained, but the statistical analysis indicates a significant curvature in the range of the experimental conditions. As a function of the first-order model a new model was defined, now of second order, using non linear regression. A new experimental design was performed with ascending points of the 3 significant variables: pH, temperature and AOT concentration. The assays corresponding to the ascending points were performed to determine the best region for xylanase extraction. Eighteen experiments were carried out (2^3 full factorial design + 4 centre points and 6 centre faces). Table 2 presents the matrix employed in this design. The percentage of xylanase recovered under the best conditions (11.5%) (pH 6.3, temperature 46.8°C and AOT concentration 0.57 M) was $3.7\times$ higher than the result obtained using first experimental design. At pH 2.9 a stable emulsion was formed and the enzyme recovery was not possible. On the other hand, at pH 9.8 some proteins precipitated at the interface between the aqueous and the micellar phases. This could be attributed to enzyme denaturation which probably occurred because of the complex formed between the surfactant (AOT) and the protein of the medium [32,33].

Statistical analysis of the results shows that the effect of the quadratic interactions (A^2 , B^2 and C^2) was significant at the 5% probability level and can represent the model. Analysis of variance was performed and the regression coefficient of the model ($R^2 = 0.75$) calculated (Tables 3–5). Eq. (1) represents the model where Y = xylanase recovery (%); A = pH; B = AOT concentration (M) and C = temperature ($^\circ\text{C}$).

$$Y = 6.44 - 4.31A^2 + 2.31B^2 - 3.13C^2 \quad (1)$$

This equation presents more than two variables which hampers its graphical representation (surface response and contour lines). The solution found for this problem was to assume a constant value for one of the variables ($B = 1$, in this case) and to calculate a new model (Eq. (2)).

$$Y = 8.75 - 4.31A^2 - 3.13C^2 \quad (2)$$

According to this model, xylanase extraction using the best conditions (pH 6.3, AOT concentration 0.57 M and temperature 46.8°C) gives a 10.2% activity recovery. The surface response and the contour lines of the model are represented in Fig. 1, where it can be seen that the process optimization tends to the centre region of the range studied. To confirm the maximal enzyme recovery predicted by the model, a new extraction was performed using the optimal conditions and a xylanase recovery of 9.1% was obtained. This value was $\cong 10\%$ smaller than the value (10.2%) predicted by the model. To try to find the cause of this result, the micelle water content (W_o) was determined as 24.8 and the micelle radius (R_m) as 3.7 nm. According to Krei and Hustedt [10] this micelle size can solubilize proteins with a molecular mass of 100 kDa, and this includes xylanase. This shows that a low enzyme recovery cannot be ascribed to the micelle size. Protein precipitation (from 10 to 40%) between the phases (interface) can also explain low enzyme recovery. The enrichment factor was very low ($E_r = 0.4$) in the extracted phase and no enzyme purification was observed. However, the enrichment factor was > 1 (showing some purification) in the medium remaining after the extraction.

Fig. 1. Response surface contour lines described by Eq. (2).

4. Conclusion

For xylanase recovery by AOT-reversed micelles, extraction is necessary at low ionic strength of the medium. The highest enzyme recovery was around 10% which provided an enrichment factor of 0.4. These optimized conditions were: pH 6.3, temperature 46.8°C and AOT concentration 0.57 M. The experiments performed showed that for xylanase extraction by reversed micelles another type of surfactant, perhaps cationics, are necessary.

Acknowledgements

Eliana M. G. Rodrigues acknowledges FAPESP, CAPES for a Master of Science fellowship. The authors acknowledge also the financial support from FAPESP and Maria Eunice M. Coelho for reviewing this text.

References

- [1] Senior, D. J., Hamilton, J., Bernier, R. L. and Dumanoir, J. R., Reduction in chlorine use during bleaching of kraft pulp following xylanase treatment. *Tappi Journal* 1992, 11, 125–130.
- [2] Viikari, L., Sundquist, J. and Kettunen, J., Xylanase enzymes promote pulp bleaching. *Paper Timber* 1991, 73, 384–389.
- [3] Tolan, J. S. and Canovas, R. V., The use of enzymes to decrease the CL2 requirements in pulp bleaching. *Pulp Paper Canada* 1992, 93, 39–40.
- [4] Mutsaers, J. H. G. M. Xylanase in breadmaking. In: Visser, J., Beldman, G., Kusters-van Sonneren, M. A., Voragen, A. G. J., editors, *Xylans and Xylanases International Symposium*. Amsterdam: Novo Nordisk, 1991:48.
- [5] Biely, P., Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnology* 1985, 3, 286–290.
- [6] Wong, K. K. Y., Tan, L. U. L. and Saddler, J. N., Multiplicity of β -1,4 xylanase in microorganisms: functions, properties and applications. *Microbiology Reviews* 1988, 52(13), 305–317.
- [7] Milagres, A. M. F. and Prade, R. A., Production of xylanases from *Penicillium janthinellum* and its use in the recovery of cellulosic textile fibers. *Enzyme Microbial Technology* 1994, 16, 627–631.
- [8] Palma, M. B., Milagres, A. M. F., Prata, A. M. R. and Mancilha, I. M., Influence of aeration and agitation rate on the xylanase activity from *Penicillium janthinellum*. *Process Biochemistry* 1996, 31(2), 141–145.
- [9] Brandani, V., Di Giacomo, G. and Spera, L., Recovery α -amylase extracted by reversed micelles. *Process Biochemistry* 1996, 31(2), 125–128.
- [10] Krei G. A. and Hustedt, H., Extraction of enzymes by reverse micelles. *Chemical Engineering Science* 1992, 47, 99–111.
- [11] Dekker, M., Van't Riet, K. and Weijers, S. R., Enzyme recovery by liquid–liquid extraction using reversed micelles. *Chemistry Engineering Journal* 1986, 33, B27–B33.
- [12] Pessoa Junior, A. and Vitolo, M., Separation of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using reversed micellar extraction. *Biotechnology Techniques* 1997, 11(6), 421–422.
- [13] Chang, Q.-L., Chen, J.-Y., Zhang, X.-F. and Zhao, N.-M., Effect of the cosolvent on the extraction of α -amylase with reversed micelles: circular dichroism study. *Enzyme and Microbial Technology* 1997, 20, 87–92.
- [14] Rabie, V. H. and Vera, J. H., Generalized water uptake modelling of water-in-oil microemulsions. New experimental results for aerosol-*o*-isooctane-water-salts systems. *Fluid Phase Equilibria* 1996, 122, 169–186.
- [15] Regalado, C., Asenjo, J. A. and Pyle, D. L., Studies on the purification of peroxidase from horseradish roots using reversed micelles. *Enzyme and Microbial Technology* 1996, 18, 332–339.
- [16] Göklen, K. E. and Hatton, T. A., Protein extraction using reversed micelles. *Biotechnology Progress* 1985, 1, 69–74.
- [17] Göklen, K. E. and Hatton, T. A., Liquid–liquid of low molecular-weight proteins by selective solubilization in reversed micelles. *Separation Science and Technology* 1987, 22, 831–841.
- [18] Hatton T. A. Extraction of proteins and amino acids using reversed micelles. In: *ACS Symposium Series*. Washington DC: American Chemical Society, 1987.
- [19] Hatton T. A. Reversed micellar extraction of proteins. In: Scamehorn J. F., Harwell J. H., editors, *Surfactant-based separations*. New York: Marcell Dekker, 1989.
- [20] Luisi, P. L., Giommi, M., Pileni, M. P. and Robinson, B. H., Reversed micelles as hosts for proteins and small molecules. *Biochimica Biophysica Acta* 1988, 947, 209–246.
- [21] Brandani V., Di Giacomo, G. and Spera, L., Extraction of protein α -amylase protein by reverse micelles: II Effect of pH and ionic strength. *Process Biochemistry* 1994, 29, 363–367.
- [22] Jolival, C., Minier, M. and Renon, H., Extraction of α -chymotrypsin using reversed micelles. *Journal College International Science* 1990, 135, 85–96.
- [23] Barros Neto B., Scarmínio I. S., Bruns R. E. *Planejamento e Otimização de Experimentos*. Campinas: Editora da Unicamp, 1995.
- [24] Roberto, I. C., Sato, S., Mancilha, I. M. and Taqueda, M. E. S., Influence of media composition on xylitol fermentation by *Candida guilliermondii* using response surface methodology. *Biotechnology Letters* 1995, 17(11), 1223–1228.
- [25] Milagres A. M. F., *Alguns aspectos da regulação de β -xilanases extracelulares de *Penicillium janthinellum**. Viçosa: Tese de Mestrado, UFV, 1988.
- [26] Vogel, H. J., A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (Medium N). *Microbial Genetics Bulletin* 1956, 13, 42–43.
- [27] Bailey, M. J., Biely, P. and Poutanen, K., Inter-laboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology* 1992, 23(3), 257–270.
- [28] Miller, G. L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 1959, 31, 426–428.
- [29] Box G. E. P., Hunter G. W., Hunter J. S. *Statistics for experimenters — introduction to design, data analysis, and model building*. New York: John Wiley, 1978.
- [30] Milagres A. M. F. *Produção de xilanases por *Penicillium janthinellum* e aplicação das enzimas no branqueamento de polpas kraft*. Campinas: Tese de Doutorado, UNICAMP, 1994.
- [31] Zamorro, M. T., Domingo, M. J., Ortega, F. and Estrada, P., Recovery of cellulolytic enzymes from wheat-straw hydrolysis broth with dioctyl sulphosuccinate/iso-octane reverse micelles. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 1996, 23, 117–125.
- [32] Dekker, M., Hilhorst, R. and Laane, C., Isolating enzymes by reversed micelles. *Analytical Biochemistry* 1989, 178, 217–226.
- [33] Göklen, K. E. and Hatton, T. A., Liquid–liquid of low molecular-weight proteins by selective solubilization in reversed micelles. *Separation Science and Technology* 1987, 22, 831–841.

Screening of Variables in Xylanase Recovery Using BDBAC Reversed Micelles

E. M. G. RODRIGUES, A. PESSOA, JR.,
AND A. M. F. MILAGRES*

*Department of Biotechnology, Faculty of Chemical Engineering,
of Lorena, 12.600-000, Lorena/SP-Brazil, E-mail: adriane@debiq.faenquil.br*

Abstract

Xylanase recovery by reversed micelles using cationic surfactant (N-benzyl-N-dodecyl-N-bis(2-hydroxyethyl)ammonium chloride) BDBAC was evaluated under different experimental conditions. A full factorial design with center point was employed to verify the influence of different factors on the recovery. A mathematical model was found to represent the xylanase yield (Y) as a function of BDBAC and hexanol: $Y = 4.32 + 5.1B + 2.64D + 0.83B^2 + 1.46D^2$, where B = BDBAC and D = hexanol. The highest xylanase recovery (27%), indicated by the model was attained at pH = 8.1, BDBAC = 0.38 M and hexanol = 8.6%. Under these conditions, and to test the model, a new xylanase extraction was performed in laboratory, giving 29.4% recovery yield, this value was similar to that predicted by the model.

Index Entries: Reversed micelles; xylanase; liquid-liquid extraction; statistical design.

Introduction

Plants are the source of renewable natural fibers used in the paper and textile industries. Normally, the cellulosic fibers are bleached by chemicals processes, which are harmful to the environment. Environmental problems could be avoided by replacing the chemical bleaching processes by biologically oriented processes, such as the use of xylanase (1–5). In fact, using xylanases to facilitate pulp bleaching lowers chlorine consumption and reduces toxic discharges (6–10). Besides, xylanases can also be employed in baking processes increasing loaf volume (11), clarification of beer and juice (12), and partial xylan hydrolysis in animal feed (13). *Penicillium janthinellum* strain produces xylanase with high xylanolytic activity, but no detectable cellulolytic activity (2). At present, xylanases are produced from

*Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed.

processed or refined substrates such as sugars, cellulose, and xylan. However, these are expensive substrates that account for the high costs of industrial-scale production (14). Such costs would lower if cheaper substrates were employed. Sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate, which is mainly composed of xylose oligomers, is certainly a cheap substrate. Cultivation conditions for producing xylanase using this hydrolysate were tested by (15), but downstream processing still needs to be studied.

Reverse micellar systems have been extensively studied as a technique for the extraction and purification of proteins (16–19). This technique allows the recovery and concentration of protein from a dilute aqueous solution containing other bioproducts (17). A reverse micellar system consists of aggregates of surfactant molecules containing an inner water core dispersed in an organic solvent medium. The polar microenvironment inside the reverse micelles permits the solubilization of protein while maintaining its native structure. The overall liquid-liquid extraction process by reverse micelles consists of two fundamental steps: a forward extraction, by which a protein is transferred from an aqueous solution to a reverse micellar organic phase, and a back extraction, by which the protein is released from the reverse micelles and transferred to an aqueous phase to be subsequently recovered (16,17). Because the extraction process is governed by the electrostatic interaction between the charged protein and the micellar wall, protein transfer can only take place during the forward extraction when the pH of the aqueous phase is such that the net surface charge of the protein is electrically opposite to that of the surfactant headgroups. In the back extraction, however, the pH value must be such that the protein has the same charge as the surfactant molecules; in this way repulsion forces are created, causing the release of protein from the reverse micelles. Ionic strength impedes protein transfer to reverse micelles but seems to promote protein release (17,20,21). This technique is therefore particularly interesting for the recovery of extracellular enzymes, which are presently purified by conventional processes (22).

This work describes the transfer of extracellular xylanase from *P. janthinellum* to a reversed micellar phase of the cationic surfactant BDBAC (23,24) and the influence of the following factors: pH, concentration of salts (ionic strength), temperature, solvent/co-solvent volume ratio, surfactant concentration, agitation time, and buffer concentration (16,21,25). The extraction and recovery of xylanase enzymic protein has been investigated with a particular reference to the yield of the extraction process. The common approach of studying one variable at a time, while keeping the others constant within a set of selected values, has the drawbacks of 1. requiring a large number of experiments and 2. missing the interactions among the variables. An alternative is the use of fractional factorial designs, which require fewer experiments (26). This methodology makes it possible to study the effects of the variables individually and their interactions.

Materials and Methods

Microorganism and Growth Conditions

The isolation of *P. janthinellum* from decaying wood was described by Milagres (27). This microorganism was identified by the Biosystematic Research Center of Canada and deposited in their collection under the designation of CRC 87M-115. The strain was initially maintained in silica stocks and then transferred to agar slants. The fungi were cultivated at 30°C for 5 d in medium containing 2% glucose, 0.25% yeast extract, 2% (v/v) concentrated salt solution based on Vogel's medium (28), and 2% agar-agar. The medium was autoclaved at 112°C for 15 min. In order to obtain the spore inocula, the spores were suspended in water and the suspension was filtered through gauze placed on Erlenmeyer flasks. The final spore concentration was 10^5 /mL.

Preparation of Sugar Cane Bagasse Acid Hydrolysate

In order to prepare the hydrolysate for cultivation, 800 g of dry milled bagasse was mixed with 8 L of sulphuric-acid solution (0.25%) and autoclaved for 45 min at 121°C. The liquid fraction was separated by filtration and the pH adjusted to 5.5 with NaOH.

Enzyme Production

The cultivation medium consisted of the aforementioned sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate supplemented with 2% (v/v) concentrated salt solution based on Vogel's medium and 0.1% yeast extract (29). The medium was autoclaved for 15 min at 112°C and poured into 125 mL Erlenmeyer flasks for cultivation. Inocula were prepared by inoculating 10^5 spores per mL into Erlenmeyer flasks containing 25 mL of pre-sterilized media. Standard cultivation conditions were: temperature 30°C; initial pH 5.5 (uncontrolled); agitation 60 rpm, cultivation time of 96 h.

Liquid-Liquid Extraction

The liquid-liquid extraction was performed using an experimental design. The enzyme was extracted from the whole clarified fermentation broth by BDBAC-reversed-micelles in isooctan by a two-step procedure. In the first step (forward-extraction), 4.0 mL of the aqueous xylanase solution was mixed with an equal volume of micellar microemulsion (BDBAC in isooctan/hexanol), the pH of the aqueous phase solution being adjusted by adding phosphate or acetate buffer with an appropriate pH, to a desirable final concentration. The equilibrium phase was obtained by intense agitation on a vortex. The phases were separated by centrifugation at 2800g for 5 min. Two mL of xylanase-BDBAC-micellar phase was mixed with 2.0 mL of fresh aqueous phase (acetate buffer 1.0 M at pH 5.5 with 0.5 M NaCl), in order to transfer the enzyme from the micelles to this aqueous phase (backward-extraction), which was finally collected by centrifugation

(2800g; 5 min). Both aqueous phases were assayed to determine enzyme activity. The extraction results are reported in terms of total activity recovered (%) in the stripping phase using the xylanase content of the initial aqueous phase for reference. Usually, about 10% of the total activity was lost in the balance, which could be attributed to denaturation.

Determination of Enzyme Activities

Xylanase activities were determined according to Bailey et al. (30). The released reducing-equivalents were measured by a colorimetric assay (31) using xylose solution as a standard reference. Activity units were expressed as micromoles of reducing equivalents released/min at 50°C. The enzymatic activity during the extraction experiments varied between 40 and 60 U/mL.

Water Determination

Water content (Wo: water in oil) is defined as the ratio of water molecules over surfactant molecules per reverse micelle ($Wo = [H_2O]/[BDBAC]$). It is proportional to the radius of the aqueous core of the reverse micelle (R_m), i.e., $R_m = (3 \cdot Wo \cdot M_{\text{aqu}}) / (a_{\text{surf}} \cdot N_{\text{av}} \cdot \rho_{\text{aqu}})$, where: M_{aqu} is the water molecular weight, ρ_{aqu} the density of water, and a_{surf} denotes the area per surfactant molecule in the interface, which depends on the properties of the surfactant and of the aqueous and organic phases. For ionic surfactants at room temperature, a_{surf} is in the range of 0.5–0.7 nm² (11) and N_{av} is the Avogadro's number. Water content values are expressed as % by weight using Karl-Fischer-Moisture Titrator (Mettler DL18).

Experimental Designs

After selecting the most significant factors (indicated by the 2⁷⁻³ and 2⁵⁻¹ fractional factorial designs) another statistical design was made to determine the optimized factors and the statistical model. A 2⁴ full factorial central composite design with eight star points and four replicates at the center point and sixteen points was employed to fit a second-order polynomial model, which indicated that 28 experiments would be required for this procedure. BDBAC and buffer concentrations, pH and co-solvent/solvent ratio were selected as experimental factors. The range and levels of the variables investigated in this study are shown in Table 1.

Chemicals

Birchwood 4-O-methyl-β-D-glucuroxylan (90% xylose) was obtained from Sigma (St. Louis, MO). The cationic surfactant BDBAC [N-Benzyl-N-bis(2-hydroxyethyl)-ammonium chloride] (purity > 99%) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All other chemicals were of analytical grade.

Table 1
Factors and Levels Used in the Assays
of Reversed Micelle Liquid-Liquid Extraction

Variables	Range and levels				
	-2	-1	0	+1	+2
pH	5.1	5.9	6.6	7.4	8.1
BDBAC (M)	0.18	0.23	0.28	0.33	0.38
Buffer (M)	0	0.01	0.05	0.08	0.12
Hexanol (%)	3.6	4.8	6.1	7.3	8.6

Results and Discussion

Seven variables at two levels (pH, 5.5 and 7.0, temperature, 10 and 30°C; agitation time, 1 and 3 min; percentage of hexanol, 7.5 and 10%; and concentrations of BDBAC, 0.1 and 0.2 M; buffer, 0.03; and 0.1 M and NaCl, 0 and 0.1 M, were selected and their effects on the extraction by reversed micelles was studied. In order to reduce the number of assays, a fractional factorial design (2^{7-3}) was performed. The statistical analysis showed that 5 variables (pH, NaCl, BDBAC, buffer, and hexanol concentration) presented significant effects. Another fractional factorial design (2^{5-1}) was employed. The analysis of variance of the results showed a significant curvature ($p < 0.05$ and $R^2 = 0.99$). This fact indicates that the region where the experiments were performed is located around the surface curvature. Therefore, this region is better represented by a model of order higher than 1. A new experimental design with ascending points of the four significant variables (pH, concentrations of BDBAC, buffer, and hexanol) was performed in order to adjust a second-order model.

The experiments corresponding to the ascending points were conducted to determine the region of best recovery. The 2^4 full rotational experimental design with center face required 28 experiments. As can be seen in Table 2, the best enzyme recovery was ~20%. The statistical analysis of the results showed significant effects only for the main variables A and B, and no evidence of any interactions involving these variables were obtained. The interactions BC and CD and the quadratic interactions B^2 and D^2 were significant at 95% confidence level for xylanase recovery (Table 3). The other variables were not significant and therefore were not included in the equation described by the model.

The adjustment of the second-order model by statistical criteria showed a significant level of 99%. However, the model adjusted to the data presented a correlation coefficient of 71% (Tables 4 and 5). The mathematical model to represent the extraction process can be expressed by Eq. 1.

$$Y = 8.32 - 2.00A + 2.36B - 1.37BC - 1.32CD + 0.83B^2 + 1.46D^2 \quad (1)$$

Table 2
Factors and Yields of the 2⁴ Full Factorial Design Rotational with Center Face

Assay	Factors ^a				Yield (%)
	A	B	C	D	
1	-1	-1	-1	-1	10.45
2	+1	-1	-1	-1	6.70
3	-1	+1	-1	-1	14.25
4	+1	+1	-1	-1	14.65
5	-1	-1	+1	-1	11.70
6	+1	-1	+1	-1	7.45
7	-1	+1	+1	-1	16.95
8	+1	+1	+1	-1	10.65
9	-1	-1	-1	+1	11.30
10	+1	-1	-1	+1	6.45
11	-1	+1	-1	+1	20.10
12	+1	+1	-1	+1	17.60
13	-1	-1	+1	+1	10.05
14	+1	-1	+1	+1	6.80
15	-1	+1	+1	+1	11.90
16	+1	+1	+1	+1	6.30
17	-2	0	0	0	10.40
18	+2	0	0	0	1.35
19	0	-2	0	0	6.15
20	0	+2	0	0	13.75
21	0	0	-2	0	2.60
22	0	0	+2	0	9.70
23	0	0	0	-2	14.90
24	0	0	0	+2	10.00
25	0	0	0	0	9.00
26	0	0	0	0	8.00
27	0	0	0	0	10.70
28	0	0	0	0	7.98

^aA, pH (-2 = 5.1; -1 = 5.9; 0 = 6.6; +1 = 7.4; +2 = 8.1). B, BDBAC (M) (-2 = 0.18; -1 = 0.23; 0 = 0.28; +1 = 0.33; +2 = 0.38). C, buffer (M) (-2 = 0; -1 = 0.01; 0 = 0.05; +1 = 0.08; +2 = 0.12). D, Hexanol (%) (-2 = 3.6; -1 = 4.8; 0 = 6.1; +1 = 7.3; +2 = 8.6).

Average of two repetitions.

Where:

Y = Yield (%)
A = pH
B = BDBAC (M)
C = buffer (M)
D = hexanol (%)

This model (Eq. 1) is composed of 4 variables and its graphical representation (contour lines and surface response) is not possible. Then coded values were given to pH (A) and buffer concentration (C) and Eqs. 2, 3, 4,

Table 3
Analysis of the Effects and Interactions
of the Full Factorial Design 2⁴ Rotational with Center Face

Effects ^a	Estimates	Standard error	t Value
Average	8.920	+/-0.639	—
A	-4.017	+/-0.522	7.695 ^b
B	4.725	+/-0.522	9.052 ^b
C	-0.458	+/-0.522	0.877
D	-1.008	+/-0.522	1.931
AB	0.263	+/-0.639	0.412
AC	-1.088	+/-0.639	1.703
AD	-0.288	+/-0.639	0.451
BC	-2.738	+/-0.639	4.285 ^b
BD	0.138	+/-0.639	0.216
CD	-2.638	+/-0.639	4.128 ^b
AA	-0.573	+/-0.522	1.098
BB	1.465	+/-0.522	2.807 ^b
CC	-0.435	+/-0.522	0.833
DD	2.715	+/-0.522	5.201 ^b

^aA, pH; B, BDBAC (M); C, Buffer (M); D, Hexanol (%).

^bSignificant ($t_{3,0.95} = 3.182$)

Table 4
Factors, Regression Coefficients, Standard Error, t Value,
and Significance Level to the Model Represents the Extraction Process
by Reversed Micelles Using a 2⁴ Rotational Full Factorial Design with Center Face

Factors	Coefficients	Standard error	t Value	p Value
Average	8.316	+/-0.833	9.98	0.000
A	-2.008	+/-0.538	3.73	0.001
B	2.362	+/-0.538	4.39	0.000
BC	-1.369	+/-0.659	2.08	0.050
CD	-1.319	+/-0.659	2.00	0.058
B ²	0.833	+/-0.510	1.63	0.117
D ²	1.458	+/-0.510	2.86	0.009

Table 5
Analysis of Variance of the Model Regression the Extraction Process
by Reversed Micelles Using a 2⁴ Rotational Full Factorial Design with Center Face

Source of variations	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square	F Value	p Value ^a
Model	6	354.818	59.134	8.5181	0.0001
Residue	21	145.791	6.942		
Total	27	500.608			

^ap < 0.05.

Table 6
Observed Responses and Predicted Yields

Observation number ^a	Factors				Predicted yields by the model (%)	Actual ^b yield(%)
	A	B	C	D		
1	-2	-2	2	-2	26.6	24.9
2	2	2	-2	2	27.0	29.4
3	2	2	2	-2	18.6	19.2
4	-2	2	-2	2	35.0	20.3

^aThe observation numbers refer to the following equations 1, $Y = 12.32 - 0.38B - 2.64D + 0.83B^2 + 1.46D^2$ ($A = -2$, $C = 2$). 2, $Y = 4.32 + 5.10B + 2.64D + 0.83B^2 + 1.46D^2$ ($A = 2$, $C = -2$). 3, $Y = 4.32 - 0.38B - 2.64D + 0.83B^2 + 1.46D^2$ ($A = 2$, $C = 2$). 4, $Y = 12.32 + 5.10B + 2.64D + 0.83B^2 + 1.46D^2$ ($A = -2$, $C = -2$).

^bAverage of two repetitions.

A, pH (-2 = 5.1; 2 = 8.1). B, BDBAC(mol/L) (-2 = 0.18; 2 = 0.38). C, Buffer(mol/L) (-2 = 0; 2 = 1.2). D, Hexanol (%) (-2 = 3.6; 2 = 8.6).

and 5 were obtained from Eq. 1 by replacing the coded values of A and C. They are:

$$Y = 12.32 - 0.38B - 2.64D + 0.83B^2 + 1.46D^2 \quad (A = -2, C = 2) \quad (2)$$

$$Y = 4.32 + 5.10B + 2.64D + 0.83B^2 + 1.46D^2 \quad (A = 2, C = -2) \quad (3)$$

$$Y = 4.32 - 0.38B - 2.64D + 0.83B^2 + 1.46D^2 \quad (A = 2, C = 2) \quad (4)$$

$$Y = 12.32 + 5.10B + 2.64D + 0.83B^2 + 1.46D^2 \quad (A = -2, C = -2) \quad (5)$$

where: Y = yield (%); B = BDBAC (M); D = hexanol (%).

New extractions under theoretically optimal conditions were performed using the values predicted by each model (Table 6). As can be seen the yield predicted by Eq. 4 was 40% higher than the actual value, however the other assays were good reproducible (<10%). Among these assays the highest yield was 29.4%. This experimental finding is in close agreement with the model prediction (27%). The water content of these micelles (Wo) was 45.8 (micellar radius = 6.8 nm), which showed that the micelle size was not a limiting variable during the extraction.

The recovery and purification xylanase by reversed micelles was low if compared with those obtained by precipitation with acetone (32), ammonium sulfate (33), and ethanol (34); however, this technique enables other industrial applications if the enzymes are utilized entrapped within reversed micelles (35,36). The xylanase recovery by reversed micelles using BDBAC surfactant provided an enrichment factor of 2.3-fold and is better represented by Eq. 3. The surface response and the contour lines corresponding to this model are represented by Fig. 1.

Conclusions

The extraction process by reverse micelles is a new purification method in downstream processing of xylanase. However, its efficiency depends on

Fig. 1. Surface response and contour lines described by Eq. 3.

the choice of the extraction parameters. In our study, the highest xylanase recovery value attained was ~30%, under the following conditions: pH 8.1, 0.38 M BDBAC cationic surfactant and 8.6% hexanol.

Acknowledgments

Eliana M. G. Rodrigues acknowledges FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo/Brazil) and CAPES (Brazil) for a Master of Science fellowship. The authors also acknowledge the financial support from FAPESP and CNPq. They are grateful to Maria Eunice M. Coelho for reviewing this text and to Professors João Batista A. Silva and Inês C. Roberto for helping with the statistical analysis of the results.

References

1. Duran, N., Milagres, A. M. F., Esposito, E., and Haun, M. (1995), in *Enzymatic Degradation of Insoluble Carbohydrates*, Saddler, J. N. and Ponner, M. H., eds., American Chemical Society, Washington, DC, pp. 332–338.
2. Milagres, A. M. F. and Prade, R. A. (1994), *Enzyme Microbiol. Technol.* 16, 627–631.
3. Yang, J. L. and Eriksson, K. E. L. (1992), *Holzforschung* 46, 481–488.
4. Eriksson, K. E. L. (1990), *Wood Sci. Technol.* 24, 79–101.
5. Linko, M., Poutanen, K., and Viikari, L. (1989), in *Enzyme Systems for Lignocellulose Degradation*, Coughan, M. P., ed., Elsevier Applied Science, NY, pp. 331–346.

6. Vicuna, R., Oyarzun, E., and Osses, M. (1995), *J. Biotechnol.* 40(3), 163–168.
7. Wong, K. K. Y., Nelson, S. L., and Saddler, J. N. (1996), *J. Biotechnol.* 48(1–2), 137–145.
8. Senior, D. J., Hamilton, J., Bernier, R. L., and Dumanoir, J. R. (1992), *Tappi J.* 11, 125–130.
9. Tolan, J. S. and Canovas, R. V. (1992), *Pulp Paper Can.* 93, 39–40.
10. Viikari, L., Sundquist, J., and Kettunen, J. (1991), *Paper Timber* 73, 384–389.
11. Mutsaers, J. H. G. M. (1991), in *Xylans and Xylanases International Symposium*, Amsterdam, Elsevier, p. 48.
12. Biely, P. (1985), *Trends Biotechnol.* 3, 286–290.
13. Wong, K. K. Y., Tan, L. U. L., and Saddler, J. N. (1988), *Microbiol. Rev.* 52(13), 305–317.
14. Gattinger, L. D., Duvnjak, Z., and Khan, A. W. (1990), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33, 21–25.
15. Palma, M. B., Milagres, A. M. F., Prata, A. M. R., and Mancilha, J. M. (1996), *Process Biochem.* 141–145.
16. Brandani, V., Di Giacomo, G., and Spera, L. *Process Biochem.* 31(2), 125–128.
17. Krei, G. A. and Hustedt, H. (1992), *Chem. Eng. Sci.* 47, 99–111.
18. Dekker, M., Van't Riet, K., and Weijers, S. R. (1986), *Chem. Eng. J.* 33, B-27–B-33.
19. Pessoa, A., Jr. and Vitolo, M. (1997), *Biotechnol. Tech.* 11(6), 421–422.
20. Leser, M. E. and Luisi, P. L. (1990), *Chimia* 44, 270–282.
21. Jolival, C., Minier, M., and Renon, H. (1990), *J. Coll. Inter. Sci.* 135, 85–96.
22. Pessoa, A., Jr. (1995), Tese de Doutorado, USP, São Paulo.
23. Krei, G. A., Meyer, U., Borner, B., and Hustedt, H. (1995), *Bioseparation* 5, 175–183.
24. Krei, G. A. (1993), PhD Thesis, Technical University Braunschweig, Braunschweig, Germany.
25. Brandani, V., Di Giacomo, G., and Spera, L. (1994), *Process Biochem.* 29, 363–367.
26. Barros Neto, B., Scarminio, I. S., and Bruns, R. E. (1995), *Planejamento e Otimização de Experimentos*, Editora da Unicamp, Campinas.
27. Milagres, A. M. F. (1988), Tese de Mestrado, UFV, Viçosa.
28. Vogel, H. J. (1956), *Microbial Genet. Bull.* 13, 42–43.
29. Milagres, A. M. F. and Lacis, L. S. (1991), *Biotechnom. Lett.* 13, 113–118.
30. Bailey, M. J., Biely, P., and Poutanen, K. (1992), *J. Biotechnol.* 23(3), 257–270.
31. Miller, G. L. (1959), *Anal. Chem.* 31, 426–428.
32. Tsujibo, H., Sakamoto, T., Nishino, N., and Hasegawa, T. (1990), *J. Appl. Bacteriol.* 69, 398–405.
33. Honda, H., Kudo, T., Ikura, Y., and Hori'oshi, K. (1985), *Can. J. Microbiol.* 31, 538–542.
34. Gorbacheva, I. V. and Rodionova, N. A. (1977), *Biochem. Biophys. Acta* 484, 79–83.
35. Subramani, S., Shah, C., and Madamwar, D. (1996), *Appl. Biochem. Biotechnol.* 60, 33–39.
36. Blanch, H. W. (1990), *Ferment. Technol. Ind. Appl.* 329–336.

Short Communication

Selective Recovery of Xylanase from *Penicillium janthinellum* Using BDBAC Reversed Micelles

RODRIGUES, E. M., MILAGRES*, A. M. F., PESSOA, Jr. A.

Depto. Biotecnologia/FAENQUIL
Rod. Itajubá, Lorena, Km 74,5. 12.600-000
Lorena/SP, Brazil

Summary

A xylanase was removed from crude extract of the fungus *Penicillium janthinellum* under optimized conditions: 0.10M phosphate buffer, pH 7.0, 0.2 M BDBAC (N-benzyl-N-dodecyl-N-bis(2-hydroxyethyl) ammonium chloride), 7.5% hexanole, 30 °C and an agitation time of 1 minute. At 1.42 mg per ml protein concentration, 73% of the xylanase activity was recovered and a 7-fold enrichment factor was obtained. The enzyme had a molecular weight (MW) of 20.1 kDa and the isoelectric point (PI) revealed the presence of two protein bands with a PI of 6.0 and 6.5. The optimum pH and optimum temperature were 4.2 and 50 °C, respectively. The low pH differential between the aqueous medium and the protein PI seemed to influence the xylanase transportation into the reversed micelles.

Introduction

Xylanases could potentially be applied to the production of hydrolysate from agro-industrial wastes [1], to the nutritional improvement of lignocellulosic feed [2] and to the processing of agrofibre [3, 4] and pulp [5]. Xylanases produced by *Penicillium* can be used to reduce the chlorine charge in *Eucalyptus* pulp bleaching with a simultaneous increase in brightness [6]. For applications in cellulosic pulps, xylanases are only useful if the cellulosic fibre is not affected by the presence of cellulolytic activities [7]. The preparation of cellulase-free xylanases can be obtained by purification, and several methods are possible.

In this paper, we report on the purification of a small xylanase, isolated from liquid cultures of *P. janthinellum* by micelle reverse. This technique involves the aggregates of surfactant molecules containing an inner water core dispersed in an organic solvent medium. The polar microenvironment inside the reverse micelles permits the solubilization of protein while maintaining its native structure [8–11]. For a better understanding of this process, the molecular weight and the isoelectric point of the purified xylanase were determined.

* Corresponding author

Materials and Methods

Pretreatment of Sugar Cane Bagasse

In order to prepare the hydrolysate for cultivation, 800 g of dry milled bagasse was mixed with 8 litres of sulphuric acid solution (0.25%) and autoclaved for 45 min at 121 °C. The liquid fraction was separated by filtration and the pH adjusted to 5.5 with NaOH.

Enzyme Production.

P. janthinellum was isolated from decaying wood [12] and cultivated on a medium consisting of the above sugar cane bagasse hydrolysate supplemented with 2% (v/v) concentrated salt solution based on VOGEL's medium [13] and 0.1% yeast extract. The medium was autoclaved for 15 min at 112 °C and poured into 125 ml ERLLENMEYER flasks for cultivation. Each flask containing 25 ml of the medium was inoculated with 10^5 spores per ml and then incubated at 30 °C with an agitation rate of 60 rpm for 96 h.

Liquid-Liquid Extraction

The crude extract was precipitated by adding ammonium sulphate (50% of saturation concentration) and, after dialysis, the concentrated proteins were extracted in two steps. In the first one (forward-extraction), 4.0 ml of the xylanase solution with 0.03 M phosphate buffer at pH 7.0 was mixed with an equal volume of micellar microemulsion containing 0.2 M BDBAC in isooctane (92.5%) and hexanol (7.5%). After stirring vigorously (1 min), the phases were separated after centrifugation at 2,800 g for 5 min. Two millilitres of the xylanase-BDBAC-micellar phase was mixed with 2.0 ml of fresh aqueous phase (1.0 M acetate buffer at pH 5.5 with 0.5 M NaCl), in order to transfer the enzyme from the micelles to this aqueous phase (backward-extraction), which was finally collected by centrifugation ($2,800 \times g$; 5 min). Both aqueous phases were assayed to determine the enzyme activity and protein concentration. The extraction results are reported in terms of total activity recovered [%] in the strip phase, using the xylanase content of the initial aqueous phase for reference. The total protein concentrations tested (2.75, 2.32, 1.42 and 0.83 mg/l) were obtained by diluting the sample with deionized water, and the ionic strengths tested (9.0, 7.8, 7.5 and 7.7 mS/cm) were obtained by adding NaCl to the deionized enzyme solution.

Analytical Methods

Water Content

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

Protein Content

Protein was analyzed using a modified LOWRY assay [14], as follows: 0.4 ml of the sample was added to a 4 ml fresh solution (1 ml 1% $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, 1 ml 2% tartrate of Na and K, 10 ml 1% SDS-Na and 88 ml 2% Na_2CO_3 in 0.1 N NaOH). After 10 minutes, 0.4 ml FOLIN CIOCALTEAU Reagent was added (dilution of 1:2) and the absorbance was measured at 578 nm, after 30 minutes. Bovine serum albumin was used as a protein standard.

Assay for Xylanase

Xylanase activity was assayed according to BAILEY [15] using 1% birch-wood xylan (SIGMA, USA). The release of reducing sugars was determined using the 3,5 dinitrosalicylic acid (DNS) method [16].

using xylose solution as a standard reference. One unit [U] of enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to liberate 1 micromol of reducing sugars per minute.

Optimum Temperature and Optimum pH Values

The optimum temperature for xylanase was determined by incubation of 1% [w/v] birch-wood xylan in 50 mM sodium acetate buffer at pH 5.0 and at 3, 40, 45, 50 and 60 °C for 1 hour. The optimum pH value for xylanase was determined at 50 °C in citrate-phosphate buffer in a pH range of 3.0 to 7.0. After pre-incubation, birch-wood xylan was added to a final concentration of 1% [w/v] and the mixtures were incubated for 5 min at 50 °C.

Molecular Weight Estimation and Isoelectric Point

The molecular weights of the proteins were estimated by SDS-gel electrophoresis (12%) [17]. The following molecular weight markers were used: bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumine (45 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), lactoglobulin (18.4 kDa) and lysozyme (14.3 kDa). The isoelectric point was determined by electrophoresis on a polyacrylamide gel containing ampholytes from pH 3.5–10. The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue.

Results and Discussion

A small xylanase was recovered from liquid cultures of *P. janthinellum* containing different protein concentrations. Xylanase recovery varied slightly when the concentration of proteins was changed, and the highest level of xylanase transfer into the reversed micelles was 26.9 % (Tab. 1). Under this condition, the enrichment factor obtained was 7-fold in WP_I ($E_f = 7.0$) and it was higher than in WP_{II} ($E_f = 4.7$). Most of the enzyme recovery was kept out of the micelles, whereas the other kinds of proteins were transferred into them. Analysis of the WP_I phase by SDS electrophoresis revealed a homogeneous protein of approx. 20.1 kDa in WP_I, with xylanase activity. An isoelectric focusing was performed, using the enzyme purified in WP_I and two bands were found with isoelectric points of 6.0 and 6.5 and with the same molecular weight. These isoelectric points are similar to the pH (7.0) used for the extractions and can explain the presence of the enzyme in WP_I, without its transportation into the reversed micelles.

The profile of the proteins present in the initial culture medium was quite similar to that obtained for the fraction after back-extraction. This fact indicates that there was no enzyme purification in WP_{II}. Thus, the W_0 value of the reversed micelles was determined as $W_0 = 45.2$ and the radius value was calculated as 6.76 nm. Therefore, since this micelle size allows the encapsulation of proteins with a molecular weight of up to 100 kDa [8], it appears that the effect of size exclusion is not the cause of the low transfer of xylanase inside the micelles.

The enzyme purified in water phase I (WP_I) was characterized and the highest enzyme activity was attained at pH values between 4.0 and 4.5 and at a temperature of 50 °C (Tab. 2). This temperature has been described as optimal for most xylanases, specifically for endoxylanases [18].

Tab. 1. Effect of protein concentration on xylanase recovery by BDBAC-reversed micelles

Samples	Conductivity [mS/cm]	Total protein [mg/ml]	Enzymatic activity [U/ml]	S_E [U/mg]	E_f	Recovered activity [%]
I	9.0	2.75	191.6	69.7	—	—
1 WP _I	—	0.25	176.8	707.2	10.1	87.4
WP _{II}	—	0.19	19.4	102.1	1.5	12.6
I	7.8	2.32	121.9	52.5	—	—
2 WP _I	—	0.17	114.2	671.8	12.8	82.7
WP _{II}	—	0.14	16.9	120.7	2.3	17.3
I	7.5	1.42	74.7	52.6	—	—
3 WP _I	—	0.13	48.2	370.8	7.0	73.1
WP _{II}	—	0.12	29.8	248.3	4.7	26.9
I	7.7	0.83	68.6	82.7	—	—
4 WP _I -	—	0.084	42.4	504.8	6.1	76.8
WP _{II}	—	0.076	25.7	338.2	4.1	23.2

I = initial
 WP_I = water phase remaining after extraction
 WP_{II} = water phase after re-extraction
 S_E = specific activity
 E_f = enrichment factor

Tab. 2. Characteristics of the purified xylanase from *Penicillium janthinellum*

Characteristics	Values
MW	20.100 Da
PI	6.0 and 6.5
Optimum pH values	4.2
Optimum temperature	50 °C

Conclusion

The extraction using the BDBAC cationic surfactant in the reversed micelle was efficient since two different xylanases with the same molecular weight (20.1 kDa) and isoelectric points of 6.0 and 6.5 were isolated in WP_I. The extraction efficiency was 73% and the enrichment factor 7-fold. The proximity of the enzyme pI to the extraction pH confirmed the absence of the enzyme inside the micelles. Reversed micelle extraction is also feasible for xylanase purification using the neutral charge of the enzyme to retain it in water phase I, while the other proteins present in the medium are all transported into the micelles. The most promising application for xylanase is in the pre-bleaching of KRAFT pulps. The small size of the xylanase purified by us (20 kDa) and the speed of the purification procedure (only two steps) facilitate their access to the xylan matrix wood.

Acknowledgements

Eliana M. G. RODRIGUES would like to thank FAPESP (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo/Brazil) and CAPES (Brazil) for a Master of Science fellowship.

Received 24 September 1998

Received in revised form 24 March 1999

Accepted 31 March 1999

References

- [1] JEFFRIES, T. W.: Emerging technology for fermenting *D*-xylose. *Trends Biotechnol.* **3** (1985), 208–212.
- [2] BENGTSOON, S.: Ph.D. Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 1991
- [3] ZAMOST, B. L., NIELSEN, H. K., STARNES, R. L.: Thermostable enzymes for industrial applications. *J. Ind. Microbiol.* **8** (1991), 71–82.
- [4] MILAGRES, A. M. F., PRADE, R. A.: Production of xylanases from *Penicillium janthinellum* and its use in the recovery of cellulosic textile fibres. *Enzyme Microb. Technol.* **16** (1994), 627–631.
- [5] ERIKSSON, K. E. L.: Biotechnology in the pulp and paper industry. *Wood Sci. Technol.* **24** (1990), 79–101.
- [6] DURAN, N., MILAGRES, A. M. F., ESPOSITO, E., HAUN, M.: Xylanase delignification in traditional and chlorine-free bleaching sequences in hardwood KRAFT pulps In: SADDLER, J. N., PENNER, M. – *Enzymatic Degradation of Insoluble Carbohydrates (ACS Symposium Series)* **618** (1995), 332–338.
- [7] VIIKARI, L., SUNDQUIST, J., KETTUNEN, J.: Xylanase enzymes promote pulp bleaching. *Paper Timber* **73** (1991), 384–389.
- [8] KREI, G. A., HUSTEDT, H.: Extraction of enzymes by reverse micelles. *Chem. Eng. Sci.* **47** (1992), 99–111.
- [9] BRANDANI, V., DI GIACOMO, G., SPERA, L.: Recovery α -amylase extracted by reversed micelles. *Process Biochem.* **31** (1996) 2, 125–128.
- [10] DEKKER, M., VAN'T RIET, K., WEIJERS, S. R.: Enzyme recovery by liquid-liquid extraction using reversed micelles. *Chem. Eng. J.* **33** (1986), B-27-B-33.
- [11] PESSOA, Jr. A., VITOLO, M.: Separation of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using reversed micellar extraction. *Biotechnol. Technol.* **11** (1997) 6, 421–422.
- [12] MILAGRES, A. M. F., LACIS, L. S., PRADE, R. A.: Characterization of xylanase production by a local isolate of *Penicillium janthinellum*. *Enzyme Microb. Technol.* **15** (1993), 248–253.
- [13] VOGEL, H. J.: A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (Medium N). *Microb. Genet. Bull.* **13** (1956), 42–43.
- [14] LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J.: Protein measurement with the FOLIN phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** (1951), 265–275.
- [15] BAILEY, M. J., BIELY, P., POUTANEN, K.: Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnol.* **23** (1992) 3, 257–270.
- [16] MILLER, G. L.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31** (1959), 426–428.
- [17] WEBER, K., PRINGLE, J. R., OSBORN, M.: Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamid gel. *Method Enzymol.* **26** (1972), 3–27.
- [18] WOODWARD, J.: Xylanases: Functions, properties and applications. In: WISEMAN, A. – *Top. Enzyme Ferment. Biotechnol.* (1984), 9–30.

Optimization of pH and temperature for β -xylosidase recovery by reversed micelles

Francislene A. Hasmann¹, Adalberto Pessoa Jr² & Inês C. Roberto^{1,*}

¹Dept. of Biotechnology/FAENQUIL, Rod. Itajubá-Lorena, Km 74,5, 12.600-000, Lorena/SP, Brazil

²Biochemical and Pharmaceutical Dept./FCF/University of São Paulo, P.O.Box 66083, CEP 05315-970, São Paulo, SP, Brazil

*Author for correspondence (Fax: (0055):125533165; E-mail: ines@easygold.com.br)

Received 23 December 1998; Accepted 23 January 1999

Key words: β -xylosidase, enzyme recovery, liquid-liquid extraction, reversed micelles, surface response methodology

Abstract

A mathematical model was found to represent the enzyme yield (Y) as a function of pH (X_1) and temperature (X_2): $Y = 36.89 + 10.83X_1 - 12.17X_2 - 6X_1X_2 - 17.24X_1^2 - 13.24X_2^2$. The optimum values for pH and temperature to attain the maximum β -xylosidase recovery (42%) were 3.3 and 24 °C, respectively.

Introduction

Reversed micelles are water-in-oil microemulsion droplets stabilized by surfactants in apolar solvents (Göklen & Hatton 1985). Recovery of proteins from an aqueous solution using reversed micellar system is a promising method that provides a favourable environment for protein solubilization in an organic phase with retention of biological activity (Pessoa & Vitolo 1998, Luisi *et al.* 1988). Xylans are major components of the hemicellulosic fraction of lignocellulosic biomass and their hydrolysis can be performed using a xylanolytic complex (Biely 1985). The enzyme complex contains β -xylosidase that releases xylosyl residues by endwise attack of xylooligosaccharides (Biely 1985, Wong *et al.* 1988). The principal industrial application of this enzyme complex is in Kraft pulp bleaching (Palma *et al.* 1996) to reduce the chlorine charge in *Eucalyptus* pulp bleaching with a simultaneous gain in brightness (Durán *et al.* 1995). A factorial design (Box *et al.* 1978) was employed to study the separation of β -xylosidase from the xylanolytic complex using the reversed micellar system of the cationic surfactant BDBAC (n-benzyl-n-dodecyl-n-bis (2-hydroxyethyl) ammonium chloride).

Materials and methods

Cultivation medium and enzyme production

The procedures described by Costa *et al.* (1998) were adopted both for the preparation of the cultivation medium and for the enzyme production.

β -xylosidase activity and precipitation

β -xylosidase activity was measured by the method described by Kumar & Ramón (1996). The enzyme was precipitated with ethanol at 20 and 60% (v/v). The pH value of the precipitation medium was adjusted to 4.5 by adding 1 M acetate buffer (pH 4.0) in the ratio of 9:1 (v/v). The ethanol was slowly mixed with the medium in a refrigerated bath at –4 °C and the mixture was centrifuged (2,000 g for 15 min) at 2 °C. To prepare the aqueous phase, samples of the precipitate formed were separately solubilized in acetate buffer (0.03 M) to obtain pH 3.0 and 4.0, and in glycine/HCl buffer (0.03 M) to obtain pH 2.0. The electrical conductivity of the solubilized samples was adjusted to 4.0 mS/cm by adding NaCl.

Table 1. Matrix for a 2^2 -full factorial design with centered face and experimental results.

Run number	Coded levels		Actual values		β -xylosidase recovery (%)
	pH	T (°C)	pH	T (°C)	
1	-1	-1	2	22	0
2	+1	-1	4	22	24
3	-1	+1	2	30	0
4	+1	+1	4	30	0
5	-1	0	2	26	0
6	+1	0	4	26	41
7	0	-1	3	22	49
8	0	+1	3	30	0
9	0	0	3	26	38
10	0	0	3	26	40
11	0	0	3	26	31

Reversed micellar liquid-liquid extraction

The enzyme was extracted at different temperatures and pH values, according to the method of reversed micelles described by Pessoa & Vitolo (1998) using 0.2 M n-benzyl-n-dodecyl-n-bis(2-hydroxyethyl)ammonium chloride prepared with a solution containing hexanol and isooctane in the ratio of 1:9 (v/v).

Experimental design and statistical analyses

To verify the influence of pH and temperature on the enzyme recovery (Y) a 2^2 -full factorial design with centered face with 2 repetitions at the center point was employed (Table 1). For each of the two factors, high (coded value: +1), center (coded value: 0) and low (coded value: -1) set points were selected. Extractions representing all 8 (2^2 + centered face) set point combinations were made, as well as three extractions representing the center point in which the value of all factors was in between (coded value: 0). Assays were conducted randomly. To analyse the results the Statgraphic software version 6.0 was employed.

Results and discussion

The recovery of β -xylosidase by BDBAC reversed micelles was evaluated under different conditions of pH and temperature (Table 1).

Table 2. Variables, Coefficients, t -values and p -values of the 2^2 -full factorial regression.

Variables	Coefficients	t -values	p -values
Average	36.89	5.74	<0.005
X_1	10.83	2.12	0.08
X_2	-12.17	-2.38	0.06
$X_1 X_2$	-6	-0.96	0.38
X_1^2	-17.24	-2.18	0.08
X_2^2	-13.24	-1.68	0.15

A 2^2 -full factorial design with centered face was employed to attain optimal enzyme extraction conditions. The choice of the variables (pH and temperature) was made based on their importance to this kind of process.

Table 1 shows that, independently of the temperature utilized, at pH 2.0 there was no enzyme recovery, probably owing to protein denaturation. The same result was observed for all the pH values employed when the temperature was 30 °C. According to Pessoa & Vitolo (1998) the temperature directly affects the stability and size of the micelles, since at 5 °C their diameters and adsorption capacities are reduced. These authors also observed that at 45 °C the micellar pseudophase disappear, which hinders the extraction. This may have been the case of the extractions at 30 °C described in this work. On the other hand, under the center point conditions (pH 3.0 and 26 °C) the recov-

Table 3. Analysis of variance of the model regression.

Source of variations	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F-value	p-value
Model	3356.36	5	671.27	4.27	0.068
Residue	785.82	5	157.16		
Total	4142.18	10			

$$R^2 = 0.81.$$

ery value was around 40%. This suggests the existence of quadratic effects for both variables as well as a maximum recovery point in the experimental region studied.

Cationic surfactants, such as BDBAC, normally favours enzyme transport to the micelle core when it is negatively charged, i.e., at pH values higher than the β -xylosidase isoelectric point (pI between 4.9 and 6.0). However, in this work the situation was quite the opposite, since higher yields were obtained at pH values lower than pI. This suggests that the enzyme was transferred to the micellar phase by hydrophobic interaction with the surfactant (Luisi *et al.* 1988).

The parameters of the second-order model (quadratic), used to estimate the percentage of enzyme recovery as a function of pH and temperature, were obtained after multiple regression analysis (Table 2).

The statistical significance of the quadratic model (Table 3) was evaluated by the F-test, which revealed that this regression is statistically significant at 10% probability level. The model did not show lack-of-fit and the determination coefficient ($R^2 = 0.81$) indicates that 81% of the variability in the recovery can be explained by the model. So, the mathematical model representing the β -xylosidase extraction process in the experimental region studied can be expressed by Equation (1).

$$Y = 36.89 + 10.83X_1 - 12.17X_2 - 6.00X_1X_2 - 17.24X_1^2 - 13.24X_2^2, \quad (1)$$

where Y = enzyme recovery (%); X_1 and X_2 coded values for pH and temperature, respectively.

The maximum recovery value of β -xylosidase (42%) corresponded to the point defined by pH 3.4 ($X_1 = 0.41$) and to a temperature of 24 °C ($X_2 = -0.55$). A detailed presentation of the optimum value predicted from the results using the response surface model is given in Figure 1.

Extraction runs of β -xylosidase were performed twice under the optimum conditions predicted by the

Fig. 1. Surface response and contour lines described by Equation (1).

model, and the average recovery value was about 43%, which confirms the prediction made by the same model.

Acknowledgements

We acknowledge Maria Eunice M. Coelho for revising this manuscript. This work was financially supported by FAPESP, CNPq and CAPES, Brazil.

References

- Biely P (1985) *Trends Biotechnol.* 3: 286–290.
- Box GEP, Hunter WG, Hunter JS (1978) *Statistics for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building*. New York: John Wiley and Sons Inc.
- Costa SA, Pessoa Jr A. & Roberto IC (1998) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 70–72: 629–639.
- Durán N, Milagres AMF, Esposito E, Haun M (1995) Enzymatic degradation of insoluble carbohydrates. advances bioconversion of lignocellulosics. In: Saddler JN, Penner MH, *ACS Symposium Series*, Chapter 21, pp. 332–338.
- Göklen KE, Hatton TA (1985) eds. *Biotechnol. Progr.* 1: 69–74.

- Kumar S, Ramón D (1996) *FEMS Microbiol. Lett.* **135**: 287–293.
- Luisi PL, Giomini M, Pilati MP, Robinson BH (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **947**: 209–246.
- Palma MB, Milagres AMF, Prata AMR, Mancilha IM (1996) *Process Biochem.* **31**: 141–145.
- Pessoa Jr A, Vitolo M (1998) *Process Biochem.* **33**: 291–297.
- Wong KKY, Tan LUL, Saddler JN (1988) *Microbiol. Rev.* **52**: 305–317.

LIQUID-LIQUID EXTRACTION BY REVERSED MICELLES IN BIOTECHNOLOGICAL PROCESSES

B. V. Kilikian¹, M. R. Bastazin¹, N. M. Minami¹,
E. M. R. Gonçalves² and A. P. Junior^{3*}

¹Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, Faculdade de Engenharia Química, São Paulo - SP, Brazil

²Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Departamento de Biotecnologia,
CEP 12.600-000, Lorena - SP, Brazil

³Biochemical and Pharmaceutical Department, RCP/USP, PO Box 66083, CEP 05315-970,
Phone: (011)818-3710, Fax: (011)815-6386, São Paulo - SP, Brazil.
E-mail: pessoajr@usp.br

(Received: January 15, 1999; Accepted: August 10, 1999)

Abstract - In biotechnology there is a need for new purification and concentration processes for biologically active compounds such as proteins, enzymes, nucleic acids, or cells that combine a high selectivity and biocompatibility with an easy scale-up. A liquid-liquid extraction with a reversed micellar phase might serve these purposes owing to its capacity to solubilize specific biomolecules from dilute aqueous solutions such as fermentation and cell culture media. Reversed micelles are aggregates of surfactant molecules containing an inner core of water molecules, dispersed in a continuous organic solvent medium. These reversed micelles are capable of selectively solubilizing polar compounds in an apolar solvent. This review gives an overview of liquid-liquid extraction by reversed micelles for a better understanding of this process.

Keywords: liquid-liquid extraction, reversed micelles.

INTRODUCTION

Liquid-liquid extraction is of great importance in the isolation of chemical and biological products. It is interesting that many of the systems being studied today are rewrapped packages of old principles. Due to the interest in biologicals for human use and consumption around the world, many novel separation schemes are being developed. Proteins and peptides are areas of high interest as a result of the rapid advancement of molecular biology and genetics. The isolation and purification of these molecules is a natural and logical requirement in order to allow their prescribed use.

Liquid-liquid extraction is the transfer of certain components from one phase to another when immiscible or partially soluble liquid phases are

brought into contact with each other. Liquid-liquid extraction by reversed micelles is a useful and very versatile tool for separating biomolecules and shows a close similarity with liquid-liquid extraction since both are diphasic processes which consist in partitioning a targeted solute between an aqueous feed phase and an organic phase and then operating the back transfer to a second aqueous stripping phase (Harrison, 1993; Rodrigues et al, 1999a; 1999b).

Reversed micelles are aggregates of surfactant molecules in the organic solvents (Figure 1). These surfactant aggregates consist of a polar inner core and an inner layer made of the surfactant hydrophilic head (Chang et al., 1997). Reversed micelles are known as water-in-oil microemulsions. A microemulsion is a thermodynamically stable

* To whom correspondence should be addressed

isotropic dispersion of two immiscible liquids consisting of microdomains of one or both liquids stabilized by an interfacial film of surfactant molecules. An important property of a microemulsion is its water or oil solubilization as microdroplets dispersed in the continuous phase (Rabie and Vera, 1996). Some proteins can be solubilized in these polar cores and thus in the hostile organic solvent without denaturation (Pessoa Jr and Vitolo, 1998). At the early stages of downstream processing, reversed micelles can be used in lieu of solvents for protein separation and purification (Regalado et al., 1996). Liquid-liquid extraction using reversed micelles is an efficient and selective process that works continuously, saves energy and can be easily scaled up (Pessoa Jr. and Vitolo, 1997; Chang et al., 1997). Besides, it can be used to recover peptides, intra- and extracellular proteins, nucleic acids, organic acids, antibiotics and steroids.

Hanahan (1952) discovered that phosphatidylcholine, a surfactant as well as a substrate, can form a complex with phospholipase in diethylether solvent without loss of enzyme activity. Later Misirowsky and Wells (1974) investigated the influence of environmental conditions on the activity of the enzyme contained in a reversed micellar system. Since then, various aspects of the reversed micellar extraction for protein purification have been studied by many researchers.

Extraction Process

A reversed micellar extraction cycle is basically composed of two steps: forward and backextraction. In the forward extraction process, biomolecules are transferred from the initial aqueous phase to the reversed micelles. In the backextraction process, biomolecules are transferred from the reversed micelles back to the aqueous stripping solution. The extractions can be performed batchwise on a bench scale employing different procedures. Chang et al. (1997) performed forward extraction of α -amylase with a solution contained in a tightly stoppered 50 mL glass flasks agitated at 250 rpm for 2 min and centrifuged at 3,500 rpm for 5 min.

Continuous extraction using reversed micellar systems is an efficient process with a reduced number of steps in the purification of biomolecules. However, few examples of this type of extraction can be found in the literature, namely, the extraction

of an α -amylase in aqueous solution by TOMAC(tri octyl methyl ammonium chloride)-reversed micellar phase using two mixer-settler units (Dekker et al., 1989), the extraction of a pure recombinant *cutinase* by AOT(sodium di-2-ethylhexyl sulfosuccinate)-reversed micelles with a perforated rotating disc contactor (Carneiro-da-Cunha et al., 1994; 1996) and the recovery of intracellular proteins from *Candida utilis* in a spray column (Han et al., 1994).

During the backextractions, the enzyme-loaded reversed micellar solution from the forward extraction can be mixed with a fresh stripping. The mixture is then centrifuged, and the two phases are separated. The backextraction of proteins is affected by pH value and by the salt concentration in the feed solution and in the aqueous solution used for the backextraction. (Shiomori et al. 1995). High ionic strength is desirable in the new aqueous phase where the backextraction is performed. The pH should be similar to the isoelectric point of the protein to be purified (Pessoa Jr. and Vitolo, 1997).

FACTORS THAT AFFECT PROTEIN TRANSFER TO REVERSED MICELLES

Water Content in Reversed Micelles (w_o)

The amount of water solubilized in reversed micelles is called w_o (water in oil), i.e., the molar ratio between water and surfactant ($[H_2O]/[surfactant]$) (Luisi, et al., 1988). This parameter is very important to determine the structure and size of the reversed micelles and the number of surfactant molecules per reversed micelle. The variables that clearly influence the w_o value are the type of surfactant, temperature, co-solvent concentration, ionic strength and surfactant concentration (Krei et al., 1995). In addition to proteins, several water-soluble vitamins can be selectively extracted by reversed micelles by adjusting the micellar size properly (Ihara et al., 1995). More information on w_o can be found in the following sections: Types of Water in Reversed Micelles; Temperature; Surfactant and Critical Micellar Concentration; Surfactants; and Shape and Size of Reversed Micelles.

Water Phase pH

The pH determines the protein net charge, since it annuls the positive or the negative charges of the

molecule surface. The pH must be at a level that generates a protein net charge opposite in sign to the surfactant headgroup, so that there is an attraction between the protein surface and the polar headgroups on the internal surface of the reversed micelle. This difference in charge is the driving force of the process. Studies on the influence of pH value on protein extraction by the reversed micelle process indicate that the difference between the pH and the pI of the protein must oscillate between 1 and 2 points for a higher extraction efficiency (Pessoa and Vitolo, 1997; Pessoa and Vitolo, 1998; Krei et al., 1995; Andrews et al., 1993) and lower loss by denaturation.

Ionic Strength and Type of Ion

In micellar structures (Figure 2) repulsion occurs between the surfactant molecules. This repulsion is caused by the surfactant charge and ions of the opposite charge present in the micellar water phase. These ions control the repulsion force of the surfactant headgroups and consequently the micellar radius. So, the variation in ionic strength interferes with the size of the reversed micelles, selecting proteins according to their sizes (Pessoa Jr. and Vitolo, 1998; Regalado et al., 1996). Increased ionic strength reduces the repulsive interactions between the surfactant charged heads; they come close to one another and the size of the reversed micelles decreases. In experiments using different types of salts (NaCl, NaSCN, Na₂CO₃, KCl, CsCl and BaCl₂), a big decrease in water uptake was observed (Rabie and Vera, 1996). These authors detected a decrease in the micelle water concentration greater than 3.5 M when the NaCl concentration increased by 0.6 M. This fact caused a water uptake (w_o) decrease from 50 to around 15 moles of water/mol of surfactant. The dependence of water content upon electrolyte concentration was also studied by Krei et al. (1995).

The presence of concentrated ions around the surfactant headgroups may cause the formation of an electrostatic shield that reduces the intensity of the electrostatic interaction between protein and surfactant. This effect, called the screening effect by Andrews et al. (1993), decreases protein extraction. Flechter (1986), cited by Rabie and Vera (1996), pointed out that the ratio of water concentration to AOT concentration in the organic phase strongly depends on the external NaCl concentration. In an AOT-NaCl-water reversed micellar system, a linear

relation exists between water uptake and surfactant concentration, with the proportionality constant being a function of the aqueous phase ionic strength only.

Ion size is another variable in the process, as reported by Marcozzi et al. (1991), Andrews et al. (1993) and Andrews and Haywood (1994). Andrews and Haywood (1994) studied the effects of ions of different sizes on the extraction of ribonuclease A and thaumatin and found that larger ions such as K⁺ cause more screening, and hence less solubilization, than smaller ions such as Na⁺. Rabie and Vera (1996) concluded that the water uptake of AOT reversed micellar systems is not affected by the anion of a salt, but is strongly dependent on the type of cation and on its concentration. The cations in the aqueous phase are exchangeable with the surfactant counterion, thus altering the nature of the surfactant, which results in a dramatic change in water uptake.

Protein Charge

The overall protein charge is determined by the pH of the aqueous phase and protein pI. If the pH of the aqueous phase is higher than the protein pI, the charge is negative, but if the pH is lower than the pI, the charge is positive.

The choice of type of surfactant and the kinetics of reversed micelle formation are determined by protein pI and consequently by protein charge. Protein extraction in a given reversed micelle system may or may not be favored by the protein charge and by the interaction between protein and surfactant, i.e., the protein charge needs to be opposite in sign to that of the surfactant headgroup charge to form the reversed micelles and then encapsulate protein inside them (Kadam, 1986).

In the backextraction process, the protein charge needs to be the same as that of the surfactant headgroup to permit the freeing of protein from the reversed micelles.

Water in Reversed Micelles

Water is present in reversed micelles in two forms: water bonded to the surfactant and free water. Water trapped inside reversed micelles can have physicochemical properties that are different from those of bulk water, mainly at low w_o values. In AOT systems, for example, when w_o is smaller than 10, the water is strongly hydrogen-bonded to

the negative surfactant headgroups, altering the water structure and increasing its viscosity. When w_0 increases, i.e., when the amount of solubilized water increases, the properties of this water become similar to those of bulk water. This trapped water can be compared to biological membrane water with regard to its physicochemical properties (Castro and Cabral, 1988; Luisi, et al., 1988). According to Politi and Chaimovich (1986), an accepted model for reversed micelles describes the water in the pool using a two-state model. A very viscous water close to the interface would be in equilibrium with that at the center of the pool, which exhibits properties similar to those of bulk water. Increasing the molar ratio of water to surfactant of AOT reversed micelles (w_0) results in discontinuity of several physical properties at w_0 around 12. These data are consistent with the hydration of AOT headgroups (and their counterions) at low w_0 , resulting in a highly structured water and in the formation of an aqueous bulklike water core at higher w_0 .

The nature of the water inside the reversed micelle is very important because it depends on the retention of proteins with the same properties as those of pure water. The melting point of trapped water is significantly lower than 0°C (Kadam, 1986).

Temperature

Temperature has much influence on the physicochemical properties of reversed micelles. Protein solubility in the organic phase and backextraction efficiency can both be enhanced by raising the temperature. For example, Marcozzi et al. (1991) observed a significant increase in α -chymotrypsin recovery when carrying out backextraction at 38°C, and when Forney and Glatz (1995) conducted the backextraction of glucoamylase at 35°C, the recovery of enzymatic activity increased from 40% (at room temperature) to 90%. The reduced w_0 value at 35°C caused the size-exclusion effect. The effect of temperature on inulinase extraction was also studied by Pessoa Jr. and Vitolo (1998). These authors reported that w_0 values increased as a function of temperature, but at temperatures higher than 37°C (range tested: 4 to 50°C) the inactivation of inulinase adversely affected the yield of active enzyme. The w_0 value of 120 required for nearly complete inulinase solubilization was high, owing to the high molecular weight or molecular size of the enzyme. While studying the effect of temperature on the solubilization of this enzyme using a cationic surfactant, Dekker (1990) observed the same effect on the recovery of α -amylase. The increase in w_0 with temperature was also reported by Regalado et al. (1994) for an AOT/iso-octane microemulsion.

Figure 1: Reversed micelle structure.

Figure 2: Schematic representation of the liquid-liquid extraction of a biomolecule between an aqueous phase and an apolar phase containing reversed micelles.

Surfactant and Critical Micellar Concentration (CMC)

CMC is the lowest concentration of surfactant needed for reversed micelle formation. CMC depends on the surfactant chemical structure, solvent, temperature and pressure. Rabie and Vera (1996) reported the effect of surfactant concentration on the molar ratio of water to AOT (w_o). With an increase in surfactant concentration from 0.02 to 0.3 M, water uptake was not constant and the mole water/mole surfactant ratio increased from 10 to 27. The enlargement of micelle size was directly proportional to surfactant concentration as observed by Krei et al. (1995). These authors affirm that water concentration in the organic phase increases to the square of the surfactant concentration.

Volume Ratio

Volume ratio is the ratio between the volume of the water phase (V_{aq}) and the volume of the organic phase (V_{org}). The lower the volume ratio, the higher the concentration generated by the process. Regalado et al. (1994) used two different volume ratios to recover the enzyme peroxidase. According to these authors, when the phase ratio was 5:1 the extraction yield was only 5% less than with a 1:1

phase ratio, whereas the purification factor was essentially the same. Pessoa Jr and Vitolo (1998) increased the volume ratio from 1 to 4 in the inulinase recovery experiments, but the yield dropped from 87% to ~63%.

Solvents

The type of solvent can influence the protein transfer from aqueous phase to organic phase. The solvents that can be used in reversed micelle systems (e.g., n-octane, isooctane, heptane, cyclohexane, benzene, kerosene and chloroform) are immiscible in water (Luisi, et al., 1988; Chang and Chen, 1995b).

Chang and Chen (1995b) reported the influence of several solvents on trypsin extraction. Using isooctane, octane, heptane, hexane, cyclohexane and kerosene as solvents, they observed that a higher percentage of protein transfer (about 70%) occurred with kerosene, whereas with cyclohexane this value decreased to 35%. Kadam (1986) stated that this influence occurs because all these solvents are capable of denaturing the reversed micelle structure and form.

Surfactants

In reversed micellar systems, the surfactant plays an important role: a spherical shell surrounding the micelle. Surfactants are amphiphilic molecules with polar headgroups (hydrophilic part) and hydrophobic tails. They can be anionic, cationic or nonionic according to the charge of the hydrophilic headgroups. They can also form aggregates when dissolved in apolar solvents whose size will depend on the type of surfactant to be used.

Examples of surfactants are (Krei and Hustedt, 1992; Pires et al., 1996; Chang and Chen, 1995b; Brandani et al., 1996; Hu and Gulari, 1996):

Cationic:

Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB);
Tri Octyl Methyl Ammonium Chloride (TOMAC);
Didodecyl Dimethyl Ammonium Bromide (DDAB);
Benzil Dodecyl Bis(hydroxyethyl) Ammonium Chloride (BDBAC);
Cetyl Pyridinium Bromide (CPB);

Anionic:

Sodium Di-2-ethylhexyl Sulfosuccinate (AOT);
Sodium Bis(diethylhexyl) Phosphate (NaDEHP);

Nonionic:

Rewopal HV5;
Tergitol NP-4.

According to Hatton (1987), solubilization of α -amylase by TOMAC-reversed micelles ($w_o < 10$) probably occurs by simple ion pairing, whereas solubilization of proteins in large reversed micelles, e.g., AOT in octane, is envisioned as the inclusion of macromolecules in the aqueous core of the reversed micelle. In some cases it is possible to add a nonionic surfactant to a cationic surfactant system to enhance the reversed micelle size (Hilhorst, et al., 1995).

Surfactant concentration affects protein transfer (forward extraction) to the reversed micelles and its backextraction. High concentrations of surfactant can hamper the protein backextraction. Small proteins can be more easily extracted to the micellar phase than high molecular weight proteins, using low surfactant concentrations (Pires, et. al., 1996).

Co-surfactants

Co-surfactant (or co-solvent) is a type of solvent that helps surfactants dissolve in the organic solvent and is necessary for establishing the reversed micelles (or microemulsions) thereafter (Krei et al., 1995). Cationic surfactants form very small micelles ($w_o < 3$); thus a co-surfactant is added to the system to make them grow (Pessoa Jr and Vitolo, 1998). Anionic surfactants form large micelles ($w_o = 20$ to 115), so the addition of co-surfactant is not necessary (Castro and Cabral, 1988; Kadam, 1986). Although the exact mechanism of the co-surfactant is still not quite clear, it has been proposed that co-surfactant molecules might be inserted between the molecules of the surfactant, thereby producing two important effects. Firstly, the interaction between the surfactant hydrophiles is changed. Secondly, the arrangement of surfactant molecules in the solvent is loosened; it is then possible to overcome the steric difficulty and arrange the big surfactant molecules in a looser manner. The results of these two effects may lead to the collapse of the cohesive force of the surfactant, which is generally followed by the dissolution of the surfactant in solvent (Chang et al., 1997). According to Krei et al. (1995) the co-solvent acts by increasing the solubility of the surfactant in the organic phase and, in the case of 1-hexanolee, by stabilizing the microemulsion. Reversed micelles formed by cationic surfactants are smaller than those formed by anionic surfactants. To enlarge the micellar size when a cationic surfactant is used, a co-surfactant, usually an alcohol, is added to the organic phase (Chang et al., 1997; Castro et al., 1988; Pessoa Jr. and Vitolo, 1997). On the contrary, Krei et al. (1995) found that, in the extraction of α -amylase, there is an accentuated decrease in micelle size with increased hexanole contents, especially those in the range of 5 to 10%. Hexanole probably reduces the electrostatic repulsion between the charged surfactant headgroups and gives rise to weak hydrophobic interactions between the hydrophobic tails of the surfactant molecules; both effects would lead to a denser packing of the surfactant molecules in the reversed micelle and consequently to a reduction in w_o . Generally, not-so-short chain alcohols such as n-butanol, benzyl alcohol, n-pentanol, n-hexanole, n-heptanol, n-octanol and n-decanol are used as co-surfactants (Chang et al.; 1997; Chang and Chen, 1995a; Pires, et al., 1996; Luisi et al., 1988; Pessoa Jr. and Vitolo, 1997).

Different co-surfactants have different properties that affect the microstructures of the reversed

micelles. Chang and Chen (1995a) and Chang et al. (1997) used several alcohols (n-butanol, n-pentanol, n-hexanol, n-heptanol, n-octanol and n-decanol) as co-surfactants in Aliquat 336 reversed micelles to extract α -amylase and obtained the highest recovery level of enzymatic activity with n-butanol. In their study only low solubility alcohols were utilized.

Shape and Size of Reversed Micelles

Reversed micelles are almost spherical, but some are elliptical, and their dimensions are 200 Å maximum. The hydrophobic interactions between surfactant and solvent determine the reversed micelle curvature which, in turn, influences the reversed micelle size (Kadam, 1986).

There are several experimental methods to determine reversed micelle size, such as light scattering, nuclear magnetic resonance and ultracentrifugation (Castro and Cabral, 1988). The radius (R_m) of the aqueous core of the empty micelle can be approximately represented by the following equation (Krei et al, 1995):

$$R_m = (3 w_o M H_2O) / (a_{surf} N_{AV} \rho H_2O)$$

where

$M H_2O$ = molecular weight of water, N_{AV} = Avogadro constant, and ρH_2O = density of water. The a_{surf} value denotes the area per surfactant molecule in the interface, which depends on the properties of the surfactant as well as on those of the aqueous and the organic phase. For ionic surfactants at room temperature, its value can be assumed to be in the range of 0.5-0.7 nm² (Evans and Ninham, 1983; Krei and Hustedt, 1992). When R_m is greater than protein radius, the absorption phenomenon can occur.

Mathematical Modelling

The microemulsion phase is described as the dispersion of two populations of spherical droplets surrounded by surfactant, one of which contains one protein solubilized in the middle of the water core, a so-called filled micelle which coexists with another population of monodispersed empty micelles. The main purposes of some experiments have been to check this representation and to measure the size of both filled and empty micelles. Different techniques, which focus on AOT systems

(ultracentrifugation, small angle neutron scattering and quasi-elastic light scattering) have been used. However, they have the weakness of assumptions necessary for interpreting the experimental data that influence the results. According to Caselli et al. (1988), these experimental approaches are relevant enough to form the basis of the first thermodynamic treatment of the solubilization of protein in reversed micelles. The simplicity of the model proposed by these authors arises mostly from the choice of reference system. The system chosen by them allows the parameters of the micellar phase to be taken into account, but does not permit any extraction or separation process to be described, since it does not account for the phase transfer of the protein from the aqueous excess phase into the micellar phase.

The phenomenological model developed by Woll and Hatton (1989) is an improvement in this direction, since it permits the calculation of the partition coefficient of proteins between the excess aqueous phase and the micellar phase. The basic concept of this model is the description of solubilization according to a pseudo-chemical equilibrium at which a protein interacts with empty micelles to form a protein-micelle complex. The advantage of this model is that all the assumptions necessary for its elaboration make it a very simple and promising tool for the quantification of protein solubilization thermodynamics.

Models have been proposed for the maximum water solubilization obtained by titration with cationic surfactants. The effects of temperature and of the type and concentration of salt on the maximum water uptake by Aerosol-OT (AOT) reversed micellar phases before the formation of excess aqueous phase have been investigated. The effect of ionic strength on the phase behaviour of AOT-water-oil systems, taking into account water uptake, AOT and sodium salt distribution between the two phases, size of reversed micelles and values of interfacial tension, has also been reported. A chemical theory has been proposed as well, to describe the equilibrium of ion distribution in reversed micellar systems. The effects of different variables on this equilibrium have been formulated in terms of dimensionless groups, using the initial conditions of the systems as independent variables. In this model, different ions could be distinguished via the equilibrium constants of their ion-exchange reactions with the surfactant counterion. A general model has been proposed to calculate water

solubilization in water-in-oil microemulsions based on surfactant concentration, the volume ratio of the two phases and the nature and concentration of salts and surfactant counterions in mixed-salt systems (Rabie and Vera, 1996).

The models proposed refer to some theoretical studies on microemulsions. Indeed, reversed micelles are one of the various possible association structures of the microdomains that compose the microemulsions. The most fundamental questions in this field are related to the mechanism of formation of microemulsions and their thermodynamic stability. In particular, it was demonstrated that the systems of interest for the extraction, i.e., water-in-oil microemulsions in equilibrium with an excess phase, are governed by the bending stress of the interfacial film. In spite of the fact that they are often only theoretical, these approaches provide a good understanding of the factors characterizing the reversed micellar phase.

Extraction in the Presence of Cells

Reversed micelle extractions of α -amylase from original fermentation broth containing about 1% wet biomass and from clarified broth were performed by Krei *et al.* (1995), giving identical results. Similar results were attained by Pessoa Jr. and Vitolo (1997) when extracting inulinase from *Kluyveromyces marxianus*. All these authors found cells in the organic phase after centrifugation, as a layer between the aqueous phase and the organic phase. This layer, which could make large-scale operations somewhat more difficult, probably results from the adsorption of the surfactant molecules onto the oppositely charged cell surface by electrostatic interactions or ion-pair binding (Krei *et al.*, 1995). In the aforementioned experiments there was no evidence of cell lysis, whereas Giovenco *et al.* (1987) lysed *Acetobacter vinelandii* cells in a reversed-micellar medium with CTAB used as the surfactant. Intracellular proteins were extracted directly from *Candida utilis* cells using CTAB, anionic sodium dodecyl-sulfate and nonionic Triton X-100 with a reducing agent as surfactants (Han *et al.*, 1993). Rahaman *et al.* (1988) studied the extraction of alkaline protease from an alkalophilic bacillus strain using anionic AOT as the surfactant, but commented on neither cell lysis nor cell partitioning. In any event, extraction of biomolecules by reversed micelles in

the presence of cells can eliminate the step of cell separation from downstream processing.

Extraction Scale-Up

A preliminary scale-up experiment was performed by Krei *et al.* (1995), who extracted α -amylase from 2 L of clarified fermentation broth with BDBAC microemulsion. The extraction was carried out in a baffled 4L-vessel with a paddle stirrer, and the activity yield was approximately 15-20% lower than in 10 mL-scale experiments. Similar results were obtained by Pessoa Jr. and Vitolo (1997) in scale-up experiments on inulinase extraction. Augmenting the scale from 10 mL to 5 L reduced the activity yield from ~90% to 77%. The enzyme denaturation was probably due to the longer time required for separation. The difference in transfer rate between small-scale and large-scale experiments can also contribute to activity losses via extended complexation with the surfactant in the aqueous phase (Krei *et al.*, 1995).

CONCLUSION

A number of recent studies in reversed micellar methodology clearly demonstrate the interest in reversed micelles for the separation of biotechnological products. Both intra- and extracellular biomolecules can be extracted from various sources and at the same time purified and concentrated to some extent by relatively simple means, using processes which are easy to scale up. Further work is necessary to learn whether reversed micellar methodology can compete with current downstream processes of biomolecules.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to FAPESP, CNPq, and CAPES (Brazil) for their financial assistance. Thanks are also due to Maria Eunice Machado Coelho for revising this paper.

REFERENCES

- Andrews, B.A. and Haywood, K., Effect of pH, ion Type and Ionic Strength on Partitioning of Proteins in Reversed Micelle Systems, *J. Chromat. A*, 668, 55-60 (1994).

- Andrews, B.A., Pyle, D.L. and Asenjo, J.A., Effect of pH and Ionic Strength on the Partitioning of Four Proteins in Reversed Micelle Systems. *Biotechnol. Bioeng.*, 43, 1052-1058 (1993).
- Brandani, V., Di Giacomo, G. and Spera, L., Recovery of α -Amylase Extracted by Reversed Micelles. *Proc. Biochem.*, 31, 2, 125-128 (1996).
- Carneiro-da-Cunha, M.G., Aires-Barros, M.R., Tambourgi, E.B. and Cabral, J.M.S., Continuous Extraction of a Recombinant Cutinase from *Escherichia coli* Disrupted Cells with Reversed Micelles Using a Perforated Rotating Disc Contactor. *Bioproc. Eng.*, 15, 253-256 (1996).
- Carneiro-da-Cunha, M.G., Aires-Barros, M.R., Tambourgi, E.B. and Cabral, J.M.S., Recovery of a Recombinant Cutinase with Reversed Micelles in a Continuous Perforated Rotating Disc Contactor. *Biotechnol. Techn.*, 8, 413-418 (1994).
- Caselli, M., Luisi, P.L., Maestro, M. and Roselli, R., Thermodynamics of the Uptake of Proteins by Reversed Micelles - A First Approximation Model. *J. Phys. Chem.*, 92, 3899-3905 (1988).
- Castro, M.J.M. and Cabral, J.M.S., Reversed Micelles in Biotechnological. *Proc. Biotech. Adv.*, 6, 151-167 (1988).
- Chang, Q.L. and Chen, J.Y., Purification of Industrial α -amylase by Reversed Micellar Extraction. *Biotechnol. Bioeng.*, 48, 745-748 (1995a).
- Chang, Q.L. and Chen, J.Y., Reversed Micellar Extraction of Trypsin: Effect of Solvent on the Protein Transfer and Activity Recovery. *Biotechnol. Bioeng.*, 46, 172-174 (1995b).
- Chang, Q.L., Chen, J.Y., Zhang, X.F. and Zhao, N.M., Effect of the Cosolvent Type on the Extraction of α -Amylase with Reversed Micelles: Circular Dichroism Study. *Enz. Microb. Technol.*, 20, 87-92 (1997).
- Dekker, M., Hilhorst, R. and Laane, C., Isolating enzymes by reversed micelles. *Anal. Biochem.*, 178, 217-226 (1989).
- Dekker, M., Enzyme recovery using reversed micelles. Ph.D. diss., Agricultural University of Wageningen. Department of Food Engineering, Wageningen, Netherlands (1990).
- Evans, D.P. and Ninham, B.W., Ion Binding and the Hydrophobic Effect. *J. Phys. Chem.*, 87, 5025-5032 (1983).
- Forney, C.E. and Glatz, C.E., Extraction of Charged Fusion Proteins in Reversed Micelles: Comparison Between Different Surfactant Systems. *Biotechnol. Prog.*, 11, 260-264 (1995).
- Giovenco, S., Verheggen, F. and Laane, C., Purification of intracellular enzymes from whole bacterial cells using reversed micelles. *Enz. Microb. Technol.*, 9, 470-473 (1987).
- Han, D.H., Lee, Y.S. and Hong, W.H., Direct Recovery of Intracellular Proteins from *Candida utilis* Using Reversed Micelles in Combination with a Reducing Agent. *Biotechnol. Techn.*, 8, 545-550 (1993).
- Han, D.H., Lee, S.J. and Hong, W.H., Separation of Intracellular Proteins from *Candida utilis* Using Reversed Micelles in a Spray Column. *Biotechnol. Techn.*, 8, 105-110, 1994.
- Hanahan, D.J., The Enzymatic Degradation of Phosphatidyl Choline in Diethyl Ether. *J. Biol. Chem.*, 195, 199-206 (1952).
- Harrison, R.G., Protein Purification Process Engineering. New York: Marcel Dekker Inc. (1993). 381p.
- Hatton, T.A., Extraction of Proteins and Amino Acids Using Reversed Micelles in "Ordered Media in Chemical Separations," Hinze, W. L. and Armstrong, D.W. (eds), ACS Symposium Series, 342, 170-182. ACS. Washington, D.C. (1987).
- Hilhorst, R., Sergeeva, M., Heering, D., Rietveld, P., Fijneman, P., Wolbert, R.B.G., Dekker, M. and Bijsterbosch, B.H., Protein Extraction from an Aqueous Phase into a Reversed Micellar Phase: Effect of Water Content and Reversed Micellar Composition. *Biotechnol. Bioeng.*, 46, 375-387 (1995).
- Hu, Z. and Gulari, E., Protein Extraction Using the Sodium Bis(2-ethylhexyl) Phosphate (NaDEPH) Reversed Micellar System. *Biotechnol. Bioeng.*, 50, 203-206 (1996).
- Ihara, T., Suzuki, N., Maeda, T., Sagara, K. and Hobo, T., Extraction of Water-Soluble Vitamins from Pharmaceutical Preparations Using AOT (Sodium di-2-ethylhexyl sulfosuccinate)/pentane reversed micelles. *Chem. Pharm. Bull.*, 43(4), 626-630 (1995).
- Kadam, K.I., Reversed Micelles as a Bioseparation Tool. *Enzyme Microb. Technol.*, 8, 266-273 (1986).
- Krei, G.A., Extraktion von Enzymen mit Inversen Mizellen. Ph.D. diss. Technical University, Braunschweig (1993).
- Krei, G., Meyer, U., Börner, B. and Hustedt, H., Extraction of α -Amylase Using BDBAC-

- Reversed Micelles. *Bioseparation*, 5, 175-183 (1995).
- Krei, G.A. and Hustedt, H., Extraction of Enzymes by Reversed Micelles. *Chem. Eng. Sci.*, 47, 1, 99-111 (1992).
- Laane, C., Boeren, S. Vos. and Veeger, C., Rules for Optimization of Biocatalysis in Organic Solvents. *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 81-87 (1987).
- Luisi, P.L., Giomini, M., Pileni, M.P. and Robinson, B.H., Reversed Micelles as Hosts for Proteins and Small Molecules. *Biochim. Biophys. Acta*, 47, 209-246 (1988).
- Marcozzi, G., Correa, N., Luisi, P.L. and Caselli, M., Protein Extraction by Reversed Micelles: a Study of the Factors Affecting the Forward and Backward Transfer of α -Chymotrypsin and its Activity. *Biotechnol. Bioeng.*, 38, 1239-1246 (1991).
- Misiorowski, R.L. and Wells, M.A., The Activity of Phospholipase A₂ in Reversed Micelles of Phosphatidylcholine in Diethyl Ether: Effect of Water and Cations. *Biochem.*, 13, 4921-4927 (1974).
- Pessoa Junior, A. and Vitolo, M., Separation of Inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using Reversed Micellar Extraction. *Biotechnol. Techn.*, 11(6), 421-422 (1997).
- Pessoa Jr, A. and Vitolo, M. Recovery of Inulinase Using BDBAC Reversed Micelles. *Proc. Biochem.*, 33(3), 291-297 (1998).
- Pileni, M.P., Zemb, T. and Petit, C., Solubilization by Reversed Micelles: Solute Cocalization and Structure Perturbation. *Chem. Phys. Lett.*, 118, 414-420 (1985).
- Pires, M.J., Aires-Barros, M.R. and Cabral, J.M.S., Liquid-Liquid Extraction of Proteins with Reversed Micelles. *Biotechnol. Prog.*, 12, 290-301 (1996).
- Politi, M.J. and Chaimovich, H., Water Activity in Reversed Sodium bis(2-ethylhexyl) Sulfosuccinate Micelles. *J. Phys. Chem.*, 90, 282-287 (1986).
- Rabie, H.R. and Vera, J.H. Generalized Water Uptake Modelling of Water-in-Oil Microemulsions. New experimental results for Aerosol-ot-Isooctane-water-salts systems. *Fluid Phase Equilibria*, 122, 169-186 (1996).
- Rahaman, R.S., Chee, J.Y., Cabral, J.M.S. and Hatton, T.A., Recovery of an Alkaline Protease from Whole Fermentation Broth Using Reversed Micelles. *Biotechnol. Prog.*, 4, 218-224 (1988).
- Regalado, C., Asenjo, J.A., Pyle, D.L., Studies on the Purification of Peroxidase from Horseradish Roots Using Reversed Micelles. *Enz. Microb. Technol.*, 18, 332-339 (1996).
- Regalado, C., Asenjo, J.A. and Pyle, D.L., Protein Extraction by Reversed Micelles: Studies on the Recovery of Horseradish Peroxidase. *Biotechnol. Bioeng.*, 44, 674-681 (1994).
- Rodrigues, E.M.G., Pessoa Jr, A. and Milagres, A.M.F., Screening of Variables in Xylanase Recovery Using BDBAC Reversed Micelles. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 77-79, 779-788 (1999a).
- Rodrigues, E.M.G., Milagres, A.M.F. and Pessoa Jr, A., Xylanase Recovery: Effect of Extraction Conditions on the AOT-Reversed Micellar Systems Using Experimental Design. *Proc. Biochem.*, 34, 121-125 (1999b).
- Shiomori, K., Kawano, Y., Kuboi, R. and Komazawa, I., Effective Purification Method of Large Molecular Weight Proteins Using Conventional AOT Reversed Micelles. *J. Chem. Eng.*

β -Xylosidase Recovery by Reversed Micelles

Use of Cationic Surfactant

FRANCISLENE ANDREA HASMANN,¹ ADALBERTO PESSOA, JR.,^{*,2}
AND INES CONCEICAO ROBERTO¹

¹Department of Biotechnology/FAENQÜIL, Rod. Itajubá-Lorena,
Km 74.5, CEP 12.600-000, Lorena/SP, Brazil;
and ²Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology/FCF/
University of São Paulo, PO Box 66083, CEP 05315-970,
São Paulo/SP, Brazil, E-mail: pessoajr@usp.br

Abstract

β -Xylosidase, an enzyme produced by *Penicillium janthinellum* fungus, was prepurified by fractionated precipitation with ethanol and extracted by reversed micelles of *N*-benzyl-*N*-dodecyl-*N*-bis(2-hydroxyethyl) ammonium chloride (BDBAC) cationic surfactant. A 2⁵⁻¹ fractional factorial design was employed to evaluate the influence of the following factors on the enzyme extraction: pH (A), conductivity (B), surfactant concentration (C), cosolvent concentration (D) and temperature (E). A statistical analysis of the results revealed that, of the five variables studied, pH, surfactant concentration, and temperature had significant main effects ($p < 0.05$) on the recovery of β -xylosidase (Y). However, the interactions between pH and temperature, conductivity and cosolvent concentration, conductivity and temperature, BDBAC concentration and temperature also had significant influences. A first-order model ($R^2 = 0.98$) expressed by the equation $Y = 7.73 - 5.55A - 0.67B + 3.49C - 0.41D + 5.26E + 2.05AB - 3.26AC + 0.96AD - 7.07AE - 3.93BD - 2.19BE + 0.99CD + 0.78CE$ was proposed to represent the enzyme recovery as a function of the effects that were really significant. This model predicts a recovery value of about 40%, which is similar to that obtained experimentally (39.5%).

Index Entries: Reversed micelles; liquid-liquid extraction; β -xylosidase; cationic surfactant; downstream processing.

Introduction

Xylans are major components of the hemicellulosic fraction of ligno-cellulosic biomass, and their hydrolysis can be performed using xylanases (1). The enzyme complex is composed of endoxylanases that cleave internal xylosidic linkages on the xylan backbone and β -xylosidase, which releases

*Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed.

xylosyl residues by endwise attack of xylooligosaccharides (1,2). The principal industrial application of this enzyme complex is in kraft pulp bleaching (3). The xylanases produced by *Penicillium janthinellum* can be used to reduce the chlorine charge in *Eucalyptus* pulp bleaching with a simultaneous gain in brightness (4). Some studies on xylanolytic complex recovery have been conducted employing techniques such as ethanol and salt precipitation, which have industrial applications (5), and liquid-liquid extraction by aqueous two-phase systems (6). However, these purification techniques did not improve the purification factor of the enzyme satisfactorily.

Reverse micellar systems have been extensively studied as a technique for the extraction and purification of proteins (7–10). This technique allows the recovery and concentration of proteins from a dilute aqueous solution containing other bioproducts (8). A reverse micellar system consists of aggregates of surfactant molecules containing an inner water core dispersed in an organic solvent medium. The polar microenvironment inside the reverse micelle permits the solubilization of protein while maintaining its native structure. The overall liquid-liquid extraction process by reverse micelles is conducted in two fundamental steps: a forward extraction, by which a protein is transferred from an aqueous solution to a reverse micellar organic phase; and a back extraction, by which the protein is released from the reversed micelles and transferred to an aqueous phase, so that it can be subsequently recovered (10). The extraction process is mainly governed by electrostatic interaction between the charged protein and the micellar wall, and protein transfer can take place only during the forward extraction when the value of the aqueous phase pH is such that the net surface charge of the protein is electrically opposite to that of the surfactant head groups. Protein can also be extracted by hydrophobic interaction between the apolar regions of the molecule and surfactant tail (11). In the back extraction, however, the pH value must be such that the protein has the same charge as the surfactant molecules, and the ionic strength is increased by adding salts; in this way repulsion forces are created and the micelles' diameter is diminished, causing the release of protein from the reverse micelles. Low ionic strength favors protein transfer to reverse micelles whereas high values promote protein release (8,10,12). The reverse micellar technique is therefore particularly interesting for the recovery of extracellular enzymes.

The extraction and recovery of β -xylosidase have been investigated with a particular reference to the yield of the extraction process and the recovery of enzymic activity. The common approach of studying one variable at a time, while keeping the others constant within a set of selected values, has the drawbacks of requiring a large number of experiments and missing the interaction among the variables. An alternative is the use of experimental designs (13). This methodology allows not only study of the variables but also verification of the effects of the factors individually and their interactions. The selective separation of the xylanolytic enzymes can

favor the hemicellulose hydrolysis, since this process can be performed later in two stages under the most appropriate conditions for each enzyme.

In this article, we describe the transfer of extracellular β -xylosidase from the xylanolytic complex produced by *P. janthinellum* to a reversed micellar phase of *N*-benzyl-*N*-dodecyl-*N*-bis(2-hydroxyethyl) ammonium chloride (BDBAC) cationic surfactant. We chose this surfactant because in previous studies on extracellular inulinase extraction, it promoted high recovery yields (~90%) (10). We evaluated the influence of the following factors on the extraction: pH, temperature, solvent/cosolvent volume ratio, electrical conductivity, and surfactant concentration.

Materials and Methods

Preparation of Sugar Cane Bagasse Acid Hydrolysate

To prepare the hydrolysate for cultivation, 800 g of dry milled bagasse was mixed with 8 L of sulfuric acid solution (0.25%) and autoclaved for 45 min at 121°C. The liquid fraction was separated by filtration and the pH adjusted to 5.5 with 1.0 N NaOH.

Cultivation Medium and β -Xylosidase Production

P. janthinellum was isolated from decaying wood (14). This micro-organism was identified by the Biosystematic Research Center in Canada and deposited in its collection under the designation of CRC 87M-115. The strain was initially stored in silica and then transferred to agar slants. The fungus, used for the inoculum production, was cultivated at 30°C for 5 d in medium containing 2% glucose, 0.25% yeast extract, 2% (v/v) concentrated salt solution based on Vogel's medium (15), and 2% agar-agar. The medium was sterilized at 121°C for 15 min. The inoculum (at a final concentration of 10^5 spores/mL) was obtained by suspending the spores in water and filtering the mixture through gauze placed on Erlenmeyer flasks.

The cultivation medium for enzyme production consisted of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate supplemented with 2% (v/v) concentrated salt solution based on Vogel's medium and 0.1% yeast extract. The medium was autoclaved for 15 min at 121°C. The cultivation was carried out in Erlenmeyer flasks (125 mL) containing 25 mL of medium at an initial pH of 5.5 (uncontrolled). The flasks were agitated for 96 h (60 rpm) at 30°C.

β -Xylosidase Precipitation

The enzyme was precipitated with 20 and 60% (v/v) ethanol. The pH value of the initial medium was adjusted to 4.5 by adding 1 M acetate buffer (pH 4.0) at a ratio of 9:1 (v/v). The ethanol was slowly mixed with the medium in a refrigerated bath (HETO-Holten, model CB15-25, Allerød, Denmark) at -4°C. The mixture was centrifuged (2000g) at 2°C for 15 min (Jouan Centrifuge Model 1812, Saint-Herblain, France). To prepare the

aqueous phase (first aqueous phase), samples of the precipitate were separately dissolved in acetate buffer (0.03 M) to obtain pH 3.0 and in Tris-HCl buffer (0.03 M) to obtain pH 9.0. β -Xylosidase activities in the aqueous phases and in the initial medium were measured by the method described in ref. 16.

Liquid-Liquid Extraction

Liquid-liquid extraction was performed using an experimental design. The enzyme previously precipitated with ethanol was extracted from the first aqueous phase by BDBAC-reversed micelles in isooctane, by a two-step procedure. In the first step (forward extraction), 5.0 mL of the first aqueous phase (containing β -xylosidase) was mixed with an equal volume of micellar phase (BDBAC in isooctane/hexanol/water). This mixture was agitated on a vortex for 1 min, to obtain the equilibrium phase, and again separated into two phases by centrifugation at 1677g for 10 min (Jouan Centrifuge Model 1812). Two milliliters of the micellar phase (containing β -xylosidase) were mixed with 2.0 mL of fresh aqueous phase (1.0 M acetate buffer at pH 5.5 with 1.0 M NaCl), to transfer the enzyme from the micelles to this fresh aqueous phase, called the second aqueous phase (backward extraction), which was finally collected by centrifugation (1677g for 10 min). Both aqueous phases (first and second) were assayed to determine enzyme activity. The extraction results are reported in terms of total activity recovered (%) in the second aqueous phase using the β -xylosidase content of the first aqueous phase as a reference.

Enzyme Activity

β -Xylosidase activity was measured by the amount of *p*-nitrophenol released after the enzyme action in a *p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside water solution (16). The reaction medium containing 250 μ L of 2 mM *p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside (in water) and 250 μ L of fermented medium at pH 5.5 (adjusted with 50 mM acetate buffer) was incubated at 50°C for 30 min. The reaction was stopped by adding 1 mL of 2 M sodium carbonate solution. The absorbance of the released *p*-nitrophenol after the β -xylosidase action was measured spectrophotometrically at 400 nm and compared with a standard reference. Activity units were expressed as micromoles of *p*-nitrophenol/(min $\cdot$ mL) at 50°C.

Factorial Design and Optimization of the System

The fraction of enzyme recovered (Y%), which is the response factor, was measured as a function of pH (A), electrical conductivity (B), BDBAC concentration (C), hexanol concentration (D), and temperature (E). For each of the five factors, high and low set points (coded values +1 and -1, respectively) were selected (Table 1); Table 1 presents the actual variable values. Extractions representing all the 16 (2^{5-1}) set-point combinations were made twice (13). The assays were made by allotment to minimize eventual systematic errors. A statistical examination of the results and a response sur-

Table 1
Variables, Levels, and β -Xylosidase Recovery Using a 2^{5-1} Statistical Factorial Design

Assay number	Coded variables					Experimental conditions					Recovery (Y[%])
	pH	Conductivity (mS/cm)	BDBAC (M)	Hexanol (%)	Temperature (°C)	pH	Conductivity (mS/cm)	BDBAC (M)	Hexanol (%)	Temperature (°C)	
1	-1.0	-1	-1	-1	+1	3.0	4.0	0.1	5.0	26	19.3
2	+1.0	-1	-1	-1	-1	9.0	4.0	0.1	5.0	4	0.2
3	-1.0	+1	-1	-1	-1	3.0	10.0	0.1	5.0	4	2.8
4	+1.0	+1	-1	-1	+1	9.0	10.0	0.1	5.0	26	0.2
5	-1.0	-1	+1	-1	-1	3.0	4.0	0.2	5.0	4	0.0
6	+1.0	-1	+1	-1	+1	9.0	4.0	0.2	5.0	26	0.0
7	-1.0	+1	+1	-1	+1	3.0	10.0	0.2	5.0	26	36.4
8	+1.0	+1	+1	-1	-1	9.0	10.0	0.2	5.0	4	6.1
9	-1.0	-1	-1	+1	-1	3.0	4.0	0.1	10.0	4	1.0
10	+1.0	-1	-1	+1	+1	9.0	4.0	0.1	10.0	26	0.4
11	-1.0	+1	-1	+1	+1	3.0	10.0	0.1	10.0	26	3.0
12	+1.0	+1	-1	+1	-1	9.0	10.0	0.1	10.0	4	7.0
13	-1.0	-1	+1	+1	+1	3.0	4.0	0.2	10.0	26	43.7
14	+1.0	-1	+1	+1	-1	9.0	4.0	0.2	10.0	4	2.6
15	-1.0	+1	+1	+1	-1	3.0	10.0	0.2	10.0	4	0.0
16	+1.0	+1	+1	+1	+1	9.0	10.0	0.2	10.0	26	0.9

face study were carried out using the STATGRAPH 6.0 statistical program package.

Chemicals

Birchwood 4-*o*-methyl- β -D-glucoroxylan (90% xylose) was obtained from Sigma (St. Louis, MO). The cationic surfactant BDBAC (purity >99%) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and used without further purification. All the other chemicals were of analytical grade.

Results and Discussion

Table 1 shows the recovery ($Y[\%]$) of β -xylosidase obtained from the BDBAC reversed micelle extractions performed according to a 2^{5-1} fractional factorial design. As can be seen, changes in the pH and temperature affect the β -xylosidase recovery by reversed micelles. All the experiments performed at pH 9.0 provided recovery values lower than 7%, independently of the other factors. At pH 9.0, the enzyme is denatured because it presents low stability. Low enzyme recovery values were also found in the experiments conducted at 4°C. At this temperature the radius of the micelles is small (Table 2), and, consequently, their capacity for enzyme encapsulation is reduced. Micelle size, as well as its capacity and stability, strongly depends on temperature (8,10). The high molecular weight (~110 kDa) of the β -xylosidase obtained from *P. janthinellum* may be responsible for its low extraction.

The highest enzyme recovery values (19.3, 36.4, and 43.7%) were obtained in assays 1, 7, and 13, respectively (see Table 1). The simultaneous increases in conductivity and BDBAC concentration (assays 1 and 7) from 4 to 10 mS/cm and from 0.10 to 0.20 M, respectively, provided an enzyme recovery augmentation of 88.5%. An even greater increase (126.1%) was observed in assay 13 in comparison with assay 1 (the BDBAC and the hexanol concentrations increased from 0.10 to 0.20 M and from 5 to 10%, respectively). This direct analysis of the results shows different combinations and interactions between the variables studied. Thus, the main effects of the factors and their interactions (pH, BDBAC, hexanol concentration, electrical conductivity, and temperature) can be better evaluated by statistical analysis.

Table 3 presents the estimated effects, standard errors, and Student's *t*-test values for the 2^{5-1} factorial design. Statistical analysis of the results confirms the effects of the factors and their interactions, as previously suggested. According to Table 3, pH and temperature had the highest effects on enzyme recovery: -11.10 and +10.52, respectively. A significant interaction between these two factors, with a high effect (-14.13), was also observed. This negative interaction means that the enzyme recovery can be enhanced by lowering the pH value to 3.0 and raising the temperature to 26°C (Fig. 1A).

Table 2
Water Content, w_o , and Micellar Radius, R_m ,
of BDBAC Reversed Micelles in Micellar Phase

	Micellar phase ^a			
	After forward extraction		After backward extraction	
	4°C	26°C	4°C	26°C
W_o	26.2	84.2	7.1	11.4
R_m (nm)	4.3	13.8	1.2	1.8

^aExtraction conditions: pH = 3.0; conductivity = 4.0 mS/cm; BDBAC = 0.20 M; hexanol = 10%; and temperature = 4 and 26°C.

Table 3
Estimated Effects, Standard Errors,
and Student's *t*-Test Values for the 2⁵⁻¹ Factorial Design

Effect	Estimated effect	Standard error	Student's <i>t</i> -test value
Average	7.73	±0.39	19.49
Factor A (pH)	-11.10	±0.79	14.00 ^a
Factor B (conductivity)	-1.34	±0.79	1.70
Factor C (conc. BDBAC)	6.99	±0.79	8.81 ^a
Factor D (% hexanol)	-0.81	±0.79	1.03
Factor E (temperature)	10.52	±0.79	13.26 ^a
AB	4.09	±0.79	5.16 ^a
AC	-6.51	±0.79	8.21 ^a
AD	1.92	±0.79	2.42 ^a
AE	-14.13	±0.79	17.82 ^a
BC	0.62	±0.79	0.78
BD	-7.86	±0.79	9.92 ^a
BE	-4.38	±0.79	5.53 ^a
CD	1.98	±0.79	2.50 ^a
CE	7.55	±0.79	9.52 ^a
DE	-1.17	±0.79	1.48

^aSignificant at the 5% level with 16 degrees of freedom (*t* = 2.12).

Figure 1A–D show the surface responses of the most significant interactions obtained after statistical analysis. According to the significant main effect shown in Table 3, the higher the BDBAC concentration the higher the β -xylosidase recovery. However, the interactions between this factor and all the other variables do not allow its isolated analysis. Figure 1B,C show response surfaces that correlate the BDBAC concentration (factor C) with temperature (factor E) and pH (factor A). All the interactions with factor C show that the enzyme recovery increases directly as a function of the BDBAC concentration. Nevertheless, the most evident effects of interaction were observed at 26°C (Fig. 1B) and pH 3.0 (Fig. 1C).

Fig. 1. (A) Effect of temperature and pH on β -xylosidase extraction by reversed micelles. BDBAC = 0.15 M; electrical conductivity = 7.0 mS/cm; hexanol = 7.5%. (B) Effect of temperature and BDBAC concentration on β -xylosidase extraction by reversed micelles: pH = 6.0; electrical conductivity = 7.0 mS/cm; hexanol = 7.5%. (C) Effect of BDBAC concentration and pH on β -xylosidase extraction by reversed micelles. electrical conductivity = 7.0 mS/cm; hexanol = 7.5%; temperature = 15°C. (D) Effect of electrical conductivity and hexanol concentration on β -xylosidase extraction by reversed micelles. BDBAC = 0.15 M; pH = 6.0; temperature = 26°C.

The highest β -xylosidase recovery value was attained at higher temperature and BDBAC concentration values (Fig. 1B), because this enzyme has a high molecular weight (~110 kDa), thus requiring larger reversed micelles for its encapsulation (5,17). The diameter of the reversed micelles can be increased by increasing the BDBAC concentration and/or temperature (8,10).

Figure 1C shows the β -xylosidase recovery as a function of the pH value and of the BDBAC concentration. The enzyme recovery increased at a low pH value (3.0). For a cationic surfactant such as BDBAC, a good extraction is expected at pH values higher than the enzyme pI, which for β -xylosidase ranges from 4.9 to 6.0 (17,18). In general, under these conditions, the net charge of the enzyme is negative and its electrostatic inter-

action with the surfactant is favored. In the present work, however, this was not observed, since the highest extraction yields were obtained at pH values lower than *pI*. This behavior can be explained by the hydrophobic interaction between the enzyme and the surfactant (11,19).

Significant interactions could also be observed between pH and conductivity (AB), pH and hexanol concentration (AD), conductivity and hexanol concentration (BD), and BDBAC and hexanol concentration (CD). The highest interaction effect (-7.86) occurred between factors B and C. The surface response for this interaction is shown in Fig. 1D. As can be seen, the recovery increases at the levels +1 for hexanol concentration (maximum level = 10%) and -1 for conductivity (minimum level = 4.0 mS/cm). There is no clear explanation for such behavior, but this antagonistic effect can occur owing to the addition of cosolvents to the cationic reversed micellar system to increase the micelle size, which is also affected by the high ionic strength (8). The effect of the ionic strength is primarily to mediate the electrostatic interactions between the protein surface and the surfactant head groups. The Debye screening effect determines the electrical double-layer properties adjacent to any charged surface, and affects the range above which electrostatic interactions can overcome thermal motion of the soluble molecules. The characteristic distance for these electrostatic interactions is the Debye length, which is inversely proportional to the square root of the ionic strength. Thus, increased ionic strength will decrease this interaction distance, and hence inhibit the solubilization of the protein.

In this work, the ionic strength also had an effect on the micelle formation and its size, although the extraction occurred at a pH value lower than the *pI* value and depended only on hydrophobic interactions. Likewise the electrostatic interactions influenced the formation and the size of the micelle, but not their capacity for protein encapsulation. The results indicate that the apolar region of the enzyme interacted with the surfactant tail and was transferred to the micellar phase. Nevertheless, as can be seen in Table 2, water content, w_o , values varied according to the temperature (extractions performed at 4°C provided a micelle radius smaller than that obtained at 26°C). As expected, the reversed micelles in the first micellar phase were higher than in the second micellar phase. The water content of the reversed micelles (w_o) or size of the reversed micelles strongly increased, as also reported by Regalado et al. (20) for AOT/isooctane microemulsion and by Pessoa and Vitolo (10) for BDBAC/isooctane-hexanol microemulsion.

After an analysis of variance (ANOVA) of the significant factors (Table 4), a linear mathematical model was adjusted to the results (Eq. 1):

$$Y = 7.73 - 5.55A - 0.67B + 3.49C - 0.41D + 5.26E + 2.05AB - 3.26AC + 0.96AD - 7.07AE - 3.93BD - 2.19BE + 0.99CD + 0.78CE \quad (1)$$

where Y = β -xylosidase recovery (%); A = pH; B = electrical conductivity (mS/cm); C = BDBAC concentration (M); D = hexanol concentration (%); and E = temperature (°C).

Table 4
ANOVA of Significant Factors^a

Variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	f Value	p Value
Factor A	987.01	1	987.01	189.74	0.0000
Factor B	14.47	1	14.47	2.78	0.1136
Factor C	390.88	1	390.88	75.14	0.0000
Factor D	5.33	1	5.33	1.02	0.3256
Factor E	885.36	1	885.36	170.19	0.0000
AB	133.91	1	133.91	25.74	0.0001
AC	339.17	1	339.17	65.20	0.0000
AD	29.49	1	29.49	5.67	0.0292
AE	1598.10	1	1598.10	307.21	0.0000
BD	494.87	1	494.87	95.13	0.0000
BE	153.91	1	153.91	29.59	0.0000
CD	31.52	1	31.52	6.06	0.0248
CE	456.17	1	456.17	87.69	0.0000
Block	6.27	1	6.27	1.2	0.2877
Total error	94.71	18	5.03		
Total	5614.90	31			

^a $R^2 = 0.98$.

Table 5
ANOVA for Total Regression^a

	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	f Value	p Value
Model	5520.20	13	424.631	80.7106	0.0000
Total error	94.70	18	5.26115		
Total	5614.90	31			

^a $R^2 = 0.98$.

The coefficient of correlation between the data and the model (R^2) was 0.98, and the validity of the model was verified by the ANOVA for the total regression (Table 5). This model was shown to be highly significant, according to the f -test ($f_{\text{model}} = 80.71 \gg f_{\text{table}} = 2.3$). In addition, it presents no lack of fit, since the differences between the values experimentally obtained and the values predicted by the model can be explained by the experimental errors.

Equation 1 predicts 40% of β -xylosidase recovery (Y) under the following conditions: pH = 3.0; electrical conductivity = 4.0 mS/cm; BDBAC concentration = 0.20 M; hexanol = 10%; and temperature = 26°C. Using these conditions, an assay was performed and the result was 39.5% of enzyme recovery, which confirms the validity of the model.

In conclusion, a BDBAC/isooctane/hexanol reversed micellar system was efficiently used as a recovery method of β -xylosidase from *P. janthinellum*.

The recovery was controlled by hydrophobic interactions. The response surface methodology was useful for understanding the enzyme extraction.

Acknowledgments

We thank Maria Eunice M. Coelho for revising this text. Francislene A. Hasmann acknowledges the receipt of a Master of Science fellowship from FAPESP (Brazil). We also acknowledge the financial support of CAPES, CNPq.

References

1. Biely, P. (1985), *Trends. Biotechnol.* **3**, 286–290.
2. Wong, K. K. Y., Tan, L. U. L., and Saddler, J. N. (1988), *Microbiol. Rev.* **52**, 305–317.
3. Palma, M. B., Milagres, A. M. F., Prata, A. M. R., and Mancilha, I. M. (1996), *Proc. Biochem.* **31**, 141–145.
4. Durán, N., Milagres, A. M. F., Esposito, E., Curotto, E., Aguirre, C., Teixeira, M. F. S., Carvalho, S. M. S., and Fernandes, C. C. (1995), *Appl. Biochem. Biotechnol.* **53**, 155–162.
5. Cortez, E. V. (1998), *Recuperação de enzimas xilanolíticas por precipitação*. Lorena: FAENQUIL (Tese de mestrado).
6. Costa, S. A., Pessoa, A., Jr., and Roberto, I. C. (1998), *Appl. Biochem. Biotechnol.* **70–72**, 629–639.
7. Brandani, V., Di Giacomo, G., and Spera, L. (1994), *Proc. Biochem.* **29**, 363–367.
8. Krei, G. and Hustedt, H. (1992), *Chem. Eng. Sci.* **47**, 99–111.
9. Pessoa, A., Jr. and Vitolo, M. (1997), *Biotechnol. Techn.* **11**, 421–422.
10. Pessoa, A., Jr. and Vitolo, M. (1998), *Proc. Biochem.* **33(3)**, 291–297.
11. Luisi, P. L., Giomiri, M., Pileni, M. P., and Robinson, B. H. (1988), *Biochim. Biophys. Acta* **947**, 209–246.
12. Leser, M. E. and Luisi, P. L. (1990), *Chimia* **44**, 270–282.
13. Box, G. E. P., Hunter, G. W., and Hunter, J. S. (1978), *Statistics for experimenters—an introduction to design, data analysis, and model building*. New York: John Wiley & Sons.
14. Milagres, A. M. F. (1988), *Alguns aspectos da regulação de β -xilanases extracelulares de *Penicillium janthinellum**. Master of Science Thesis, Federal University of Viçosa, Viçosa, Brazil.
15. Vogel, H. J. (1956), *Microb. Genet. Bull.* **13**, 42–43.
16. Kumar, S. and Ramón, D. (1996), *FEMS Microbiol. Lett.* **135**, 287–293.
17. Sulistyo, J., Kamiyama, Y., and Yasui, T. (1995), *J. Ferment. Bioeng.* **79(1)**, 77–82.
18. Puls, J. and Pountanen, K. (1989), in *Enzyme Systems for Lignocellulose Degradation*, Coughlan, M. P., ed., London: Elsevier, pp. 151–165.
19. Pires, M. J. and Cabral, J. M. S. (1993), *Biotechnol. Prog.* **9**, 647–650.
20. Regalado, C., Asenjo, J. A., and Pyle, D. L. (1996), *Enzym. Microb. Technol.* **18**, 332–339.

Copyright © 2001 by Humana Press Inc.
All rights of any nature whatsoever reserved.
0273-2289/01/91-93/0001/\$11.75

Extraction by Reversed Micelles of the Intracellular Enzyme Xylose Reductase

<Au: Pls.
proofread
carefully.

ELY V. CORTEZ,¹ MARIA DAS GRAÇAS DE ALMEIDA FELIPE,²
INÊS C. ROBERTO,² ADALBERTO PESSOA JR,¹
AND MICHELE VITOLOA^{*,1}

¹Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP, PO Box 66083,
São Paulo, SP, Brazil, E-mail: ines@debiq.faequil.br;
and ²Faculdade de Engenharia Química de Lorena,
CEP 12.600-970, PO Box 116, Lorena, SP, Brazil

<Au:
Correct
e-mail?

Abstract

Xylose reductase enzyme (EC 1.1.1.21) produced by *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse was extracted by reversed micelles of *N*-benzyl-*N*-dodecyl-*N*-bis (2-hydroxyethyl) ammonium chloride cationic surfactant. An experimental design was employed to evaluate the influences of the following factors on the enzyme extraction: temperature, cosolvent, and surfactant concentration. A model was used to represent the enzyme recovery and fit of the experimental data. The extraction yielded a total recovery of 130%, and the purity increased 4.8-fold.

<Au:
Can you
lengthen
abstract to
100–200
words?

>Au: OK?

Index Entries: Reversed micelles; xylose reductase; liquid-liquid extraction.

Introduction

Liquid-liquid extraction by reversed micelles is a useful and very versatile tool for separating biomolecules. This process shows a close similarity to the liquid-liquid extraction process, because both are biphasic and consist in partitioning a targeted solute between an aqueous feed phase and an organic phase, with a subsequent back transfer to a second aqueous stripping phase (1).

Reversed micellar systems have great potential for industrial application, because they provide a favorable environment for protein solubilization in the organic phase with preservation of biologic activity (2). A number of recent studies on reversed micellar methodology clearly demonstrate the interest in reversed micelles for the separation of biotechnologic products. Both intra- and extracellular biomolecules can be extracted from

*Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed.

various sources and at the same time purified and concentrated to the same extent by relatively simple means, using processes that are easy to scale up (1).

Xylitol is a sweetener with important properties such as anticarcinogenicity, low caloric value, and negative dissolution heat. Because it can be used successfully in food formulations and in the pharmaceutical industry, its production is in great demand (3). Xylitol can be obtained by microbiologic processes, because many yeasts and filamentous fungi synthesize the xylose reductase (XR) enzyme, which catalyzes the xylose reduction into xylitol as the first step in xylose metabolism. Xylitol production by biotechnologic means has several economic advantages in comparison to the conventional process based on the chemical reduction of xylose. The efficiency and productivity of this fermentation chiefly depend on the microorganism and the process conditions employed (3). The present study evaluates the effectiveness of reversed micelles in extracting XR enzyme produced by *Candida guilliermondii* grown in sugarcane bagasse hydrolysate.

Materials and Methods

Microorganism

The cells were obtained from fermentations conducted with *C. guilliermondii* FTI 20037 as described by Barbosa et al. (4). The yeast was maintained on malt-extract agar slants at 4°C.

Preparation of Hemicellulosic Hydrolysate

Sugarcane bagasse was hydrolyzed in a 250-L reactor at 121°C for 20 min with H₂SO₄ (solid:liquid ratio of 1:10). A portion of the hydrolysate was further concentrated under vacuum at 70°C to increase xylose concentration fourfold. The vacuum procedure was used to avoid sugar degradation. The hydrolysate was then treated as described by Alves et al. (5), to reduce the concentrations of toxic substances.

Inoculum Preparation, Medium, and Fermentation Conditions

A medium containing 3.0 g/L of xylose supplemented with 20.0 g/L of rice bran extract, 2.0 g/L of (NH₄)₂SO₄, and 0.1 g/L of CaCl₂·2H₂O was used for growing the inoculum. Erlenmeyer flasks (125 mL), each containing 50 mL of medium with inoculum (initial pH 5.5), were incubated on a rotary shaker (200 rpm) at 30°C for 24 h.

For the fermentation, concentrated bagasse hemicellulosic hydrolysate containing 42 g/L of xylose was employed. The hydrolysate was supplemented with the same nutrients as used for the inoculum preparation. Cultivation was done by a batch process in a 1.25-L fermentor (BIOFLO III; New Brunswick, Edison, NJ) under agitation of 300 rpm and aeration rate of 0.6 vvm ($K_La = 22.5 \text{ h}^{-1}$) at 30°C and an initial pH of 5.5.

<Au: Pls.
give g force.

<Au: Pls.
give g force.

Extraction by Reversed Micelles of Enzyme XR

3

Preparation of Cell-Free Extracts

Cells were harvested by centrifuging at 800g and washed in phosphate buffer (50 mM, pH 7.2). Cell pellets were stored in a freezer. For enzymatic analysis, cell extracts were thawed and disrupted by a sonic disruption technique using a Sonics & Materials disrupter. The cell homogenate was then centrifuged at 10,000g (Jouan MR 1812) at 4°C for 10 min, and the supernatant solution was used for enzymatic assays.

Enzyme Assays

XR activity was determined spectrophotometrically at 340 nm at room temperature (6). One enzyme unit was defined as 1 μmol of NADPH oxidized using an extinction coefficient of 6.22×10^{-3} . Specific activity was expressed as units/milligram of protein based on protein determination, according to the method of Lowry et al. (7), using bovine serum albumin as the standard.

<Au: 1 μmol
correct?

Liquid-Liquid Extraction

Liquid-liquid extraction was performed using an experimental design. The enzyme, from the crude extracts, was extracted by *N*-benzyl-*N*-dodecyl-*N*-bis (2-hydroxyethyl) ammonium chloride (BDBAC) reversed micelles in isooctane, by a two-step procedure. In the first step (forward extraction), 3.0 mL of the crude extract (containing XR) was mixed with an equal volume of micellar microemulsion (BDBAC in isooctane/hexanol/water). This mixture was agitated on a vortex for 1 min, to obtain the equilibrium phase, and again separated into two phases by centrifuging at 657g for 10 min (Jouan Centrifuge Model 1812; Saint-Herblain, France). Next, 2 mL of XR-BDBAC-micellar phase was mixed with 2.0 mL of fresh aqueous phase (1.0 M acetate buffer at pH 5.5 with 1.0 M NaCl), to transfer the enzyme from the micelles to this fresh aqueous, called the second aqueous phase (backward extraction), which was finally collected by centrifugation (657g for 10 min). Both aqueous phases (first and second) and the crude extract were assayed to determine enzyme activity and protein concentration. The extraction results are reported in terms of total activity recovered (percent) in the second aqueous phase using the XR content of the crude extract as a reference.

<Au:
Company?

Experimental Design and Statistical Analysis

To verify the influence of temperature, cosolvent, and surfactant concentrations on the enzyme recovery (Y), a 2^3 full factorial design with centered face and three repetitions at the center point was employed (Table 1). For each of the three factors, high (coded value: +1), center (coded value: 0) and low (coded value: -1) set points were selected. Extractions representing all 14 set point combinations (2^3 + centered face) were performed, as well as three extractions representing the center point (coded value: 0). Assays were conducted randomly.

Table
1

Table 1
 Matrix for a 2³ Full Factorial Design with Centered Face

Run no.	Coded values			Actual values		
	Temp. (°C)	Cosolvent (%)	Surfactant (%)	Temp. (°C)	Cosolvent (%)	Surfactant (%)
1	-1	-1	-1	5	6	0.1
2	+1	-1	-1	30	6	0.1
3	-1	+1	-1	5	9	0.1
4	+1	+1	-1	30	9	0.1
5	-1	-1	+1	5	6	0.2
6	+1	-1	+1	30	6	0.2
7	-1	+1	+1	5	9	0.2
8	+1	+1	+1	30	9	0.2
9	0	0	0	17.5	7.5	0.15
10	0	0	0	17.5	7.5	0.15
11	0	0	0	17.5	7.5	0.15
12	-1	0	0	5	7.5	0.15
13	+1	0	0	30	7.5	0.15
14	0	-1	0	17.5	6	0.15
15	0	+1	0	17.5	9	0.15
16	0	0	-1	17.5	7.5	0.1
17	0	0	+1	17.5	7.5	0.2

Results and Discussion

Table 2 gives the results of experiments based on a 2³ full factorial matrix. A high recovery of XR activity could be observed in many experiments.

The isoelectric point (pI) of XR produced by *C. guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate is unknown. However, XR produced by *Pachysolen tannophilus* NRRL Y-2460 has a pI equal to 4.9 (8) and XR produced by *Candida tropicalis* has a pI between 4.1 and 4.15 (9). Therefore, the XR described in the present study could have the same pI range and a negative global charge at pH 7.0. This would improve the electrostatic interaction between enzyme and cationic surfactant BDBAC (1). The electrostatic interaction is one of the most predominant factors in the reversed micelle extraction, and this explains the high recovery of XR in our experiments (Table 2). This interaction can cause the enzyme migration to the micellar core, when it is opposite to the electrical charge between enzyme and surfactant. The XR recovery was above 100% since all enzyme activity present in the crude extract was transferred to the fresh aqueous phase after backward-extraction, and the process reduced the concentration of several enzyme inhibitors (mainly hydrophobic compounds such as furfural, hydroxymethyl furfural, phenols) present in the crude extract. Using BDBAC reversed micelles, Hasmann et al. (10) recovered about 50% of β -xylosidase from fermented medium and Pessoa and Vitolo (2) recovered 90% of inulinase.

Table
2

<Au:
Correct?

Extraction by Reversed Micelles of Enzyme XR

5

Table 2
Results of a 2³ Full Factorial Design with Centered Face

Experiment no.	Initial activity (U/mL)	Backward extraction activity (U/mL)	Recovery (%)
1	0.23	0.36	140
2	0.52	0.42	81
3	0.35	0.56	145
4	0.41	0.49	118
5	0.45	0.21	47
6	0.52	0.0	0
7	0.54	0.63	116
8	0.38	0.38	94
9	0.55	0.66	122
10	0.55	0.68	123
11	0.55	0.72	131
12	0.31	0.37	122
13	0.39	0.43	110
14	0.28	0.40	142
15	0.35	0.41	120
16	0.35	0.44	126
17	0.39	0.41	104

Table 3
Variance Analysis of Significant Factors and Interactions
for XR Extraction Process by Reversed Micelles of BDBAC^a

Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F Value	p Value
X ₁ : temperature	2798.9	1	2798.9	6.28	0.0407
X ₂ : cosolvent	3319.7	1	3319.7	7.45	0.0294
X ₃ : surfactant	6170.2	1	6170.2	13.84	0.0075
X ₂ X ₃	1830.1	1	1830.1	4.10	0.0824
X ₁ X ₃	2924.4	1	2924.4	8.20	0.0169
X ₃ X ₃	1020.7	1	1020.7	2.86	0.1216
Residue	3567.2	10	356.7		
Total (corr.)	21,631.37	16			

^aR² = 0.84.

<Au: Data available for empty cell?

Considering that there is no literature on XR extraction with reversed micelles, we can say that our results were quite good.

In our work the pH was maintained at 7.0 and electrical conductivity at 14 mS/cm. Our objective was to avoid loss of activity, and with these two values we attained good results, with no need to test other values.

Table 3 gives the variance analysis of the factors and interactions that were important for the XR extraction process by reversed micelles. All the factors (X₁, X₂, and X₃) and the interaction X₁X₃ were significant

Table 3

Table 4
 Regression Coefficients

Average	129.24
Temperature— X_1	-16.73
Cosolvent— X_2	18.22
Surfactant— X_3	-24.84
X_1X_1	-17.21
X_2X_3	15.12
X_3X_3	-18.36

Fig. 1. Surface response described by Eq. 1 for temperature (X_1) and surfactant (X_3). Cosolvent concentration was maintained at superior level ($X_2 = 1$).

<Au: Figure
 caption
 OK?

at a 95% confidence level. The interactions X_2X_3 and X_3X_3 , although less significant (Table 4), were also taken into account for establishing the model.

Table 4 gives the regression coefficients of the second-order model (quadratic), which was used to estimate the percentage of enzyme recovery as a function of temperature, cosolvent, and surfactant concentration.

The statistical significance of the quadratic model was evaluated by the F test, which revealed that this regression is statistically significant at the 5% probability level. The model did not show lack of fit, and the determination coefficient ($R^2 = 0.84$) indicates that 84% of the variability in the recovery can be explained by the model. Thus, the mathematical model representing the XR extraction process in the experimental region studied can be expressed by Eq. 1 and by Fig. 1:

$$Y = 129.2 - 16.7X_1 + 18.2X_2 - 24.8X_3 + 15.1X_2X_3 - 17.2X_1^2 - 18.4X_3^2 \quad (1)$$

in which Y is the enzyme recovery (%); and X_1 , X_2 , and X_3 are coded values for temperature, cosolvent, and surfactant concentrations, respectively.

Table
 4

Fig. 1

Table 5
 Purification of XR Produced by *C. guilliermondii* Using Reversed Micelles

Purification step	Total protein (mg/mL)	Total activity (U/mL)	Specific activity (U/mg)	Purification factor
Crude extract	1.38	0.41	0.30	1.0
Aqueous phase after back-extraction	0.39	0.55	1.42	4.8

The maximum recovery value of XR (152%) corresponded to the point defined by the temperature of 11.4°C ($X_1 = -0.49$), cosolvent concentration of 9% ($X_2 = 1$), and surfactant concentration of 0.14 M ($X_3 = -0.26$). Triplicate XR extraction runs were performed at these optimum conditions predicted by the model, and the average recovery value was about $135 \pm 3\%$, which is close to that predicted by the model ($152 \pm 23\%$).

Table 5 gives the results of total protein analysis regarding a point of maximal extraction. The purification factor increased 4.8-fold.

Table
5

Conclusion

This study demonstrates that liquid-liquid extraction by reversed micelles is a process able to recover and increase the enzymatic activity and purity of XR produced by *C. guilliermondii* cultivated in sugarcane bagasse hydrolysate. It was possible to obtain a representative model for the extraction of XR.

Acknowledgments

We are grateful to Maria Eunice M. Coelho for revising the manuscript. This work was supported financially by FAPESP and CNPq, Brazil.

<Au: Pls.
spell out
FAPESP
and CNPq.

References

1. Kilikian, B. V., Bastazin, M. R., Minami, N. M., Gonçalves, E. M. R., and Pessoa A. Jr. (2000), *Braz. J. Chem. Eng.* 17, 29–38.
2. Pessoa A. Jr. and Vitolo, M. (1998), *Process Biochem.* 33, 291–297.
3. Silva, S. S., Felipe, M. G. A., and Mancilha, I. M. (1998), *Appl. Biochem. Biotechnol.* 70–72, 331–339.
4. Barbosa, M. F. S., Medeiros, M. B., Mancilha, I. M., Scheneider, H., and Lee, H. (1988), *J. Ind. Microbiol.* 3, 241–251.
5. Alves, L. A., Felipe, M. G. A., Almeida e Silva, J. B., Silva, S. S., and Prata, A. M. R. (1998), *Appl. Biochem. Biotechnol.* 70/2, 89–98.
6. Alexander, N. J. (1985), *Biotechnol. Bioeng.* 37, 1739–1744.
7. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951), *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
8. Ditzelmüller, G., Kubicek, C. P., Woehrer, W., and Roehr, M. (1984), *Can. J. Microbiol.* 30, 1330–1336.
9. Yokoyama, S. I., Suzuki, T., Kawai, K., Horitsu, H., and Takamizawa, K. (1995), *J. Ferment. Bioeng.* 79, 217–223.
10. Hasmann, F. A., Pessoa A. Jr., and Roberto, I. C. (1999), *Biotechnol. Techn.* 13, 239–242.

<Au (4):
Spelling OK
for
Scheneider?

<Au (10):
Pls. spell
out *Techn.*

Screening of Variables in β -Xylosidase Recovery Using Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide Reversed Micelles

FRANCISLENE-ANDRÉIA HASMANN,¹ ADALBERTO PESSOA JR.,²
AND INÊS-CONCEIÇÃO ROBERTO*,³

¹IPT/Butantan/USP, PO Box 66083, São Paulo/SP, Brazil;

²Biochemical and Pharmaceutical Department/FCF/USP, PO Box 66083,
São Paulo/SP, Brazil; and ³Department of Biotechnology,
Faculty of Chemical Engineering of Lorena, PO Box 116, Lorena/SP, Brazil,
E-mail: ines@debiq.fcenquil.br

Abstract

β -Xylosidase recovery by micelles using cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) cationic surfactant was verified under different experimental conditions. A 2^{5-1} fractional factorial design with center points was employed to verify the influence of the following factors on enzyme extraction: pH (x_1), CTAB concentration (x_2), electrical conductivity (x_3), hexanol concentration (x_4), and butanol concentration (x_5). Statistical analysis of the results shows that of the five variables studied only hexanol and electrical conductivity did not have significant effects on the recovery of β -xylosidase. The other factors had significant effects in increasing order: (x_1) > (x_4) > (x_5). The model predicts a recovery value of about 45%, which is similar to that obtained experimentally (43.5%).

Index Entries: Reversed micelles; β -xylosidase; liquid-liquid extraction; statistical design.

Introduction

Xylans are major components of the hemicellulosic fraction of lignocellulosic biomass and their hydrolysis can be performed using xylanases (1). The enzyme complex is composed of endoxylanases, which cleave internal xylosidic linkages on the xylan backbone, and β -xylosidase, which releases xylosyl residues by endwise attack of xylooligosaccharides (1,2).

*Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed.

Plants are the source of renewable natural fibers used in the paper and textile industries. Normally, the cellulosic fibers are bleached by chemical processes, which are harmful to the environment. Environmental problems could be avoided by replacing the chemical bleaching processes with biologically oriented processes, such as the use of xylanase (3–5). In fact, using xylanases facilitates pulp bleaching, lowers chlorine consumption, and reduces toxic discharges (6,7). In addition, xylanases also can be employed in the clarification of beer and juice (6–8) and in baking processes, increasing the loaf volume (8). At present, β -xylosidase is produced by *Penicillium janthinellum* from processed or refined substrates, such as sugars, cellulose, and xylan.

Some studies on xylanolytic complex recovery have been conducted employing techniques such as ethanol and salt precipitation, which have industrial applications, and liquid-liquid extraction by aqueous two-phase systems (9–12). However, these purification techniques did not improve the purification factor of the enzyme satisfactorily.

Reverse micellar systems have been extensively studied as a technique for the extraction and purification of proteins (13–15). This technique allows the recovery and concentration of proteins from a dilute aqueous solution containing other bioproducts (13–16). A reverse micellar system consists of aggregates of surfactant molecules containing an inner water core dispersed in an organic solvent medium. The polar microenvironment inside the reverse micelle permits the solubilization of protein while maintaining its native structure. The overall liquid-liquid extraction process by reverse micelles is conducted in two fundamental steps: a forward extraction, by which a protein is transferred from an aqueous solution to a reverse micellar organic phase; and a back extraction, by which the protein is released from the reversed micelles and transferred to an aqueous phase, so that it can be recovered subsequently (13–15). The extraction process is mainly governed by electrostatic interaction between the charged protein and the micellar wall, and protein transfer only takes place during the forward extraction, when the value of the pH of the aqueous phase is such that the net surface charge of the protein is electrically opposite of that of the surfactant head groups. Protein can also be extracted by hydrophobic interaction between the apolar regions of the molecule and the surfactant tail (13). In the back-extraction, however, the pH value must allow the protein to have the same charge as the surfactant molecules and the ionic strength to be increased by the addition of salts. In this way, repulsion forces are created and the micellar diameter is diminished, causing the release of protein from the reverse micelles. Low ionic strength favors protein transfer to reverse micelles, and high values promote protein release (17). This technique is therefore particularly interesting for the recovery of extracellular enzymes (13–17).

The present study describes the transfer of extracellular β -xylosidase from *P. janthinellum* to a reversed micellar phase of the cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) cationic surfactant and the influence of the

following factors: pH, CTAB concentration, electrical conductivity, hexanol concentration, and butanol concentration. The extraction and recovery of β -xylosidase enzymic protein has been investigated with particular attention to the recovery of the enzymatic activity.

Materials and Methods

Chemicals

Birchwood 4-O-methyl- β -D-glucoroxylan (90% xylose) was obtained from Sigma (St. Louis, MO). The cationic surfactant CTAB was purchased from Merck (Darmstadt, Federal Republic of Germany) and used without further purification. All other chemicals were of analytical grade.

Preparation of Sugarcane Bagasse Hydrolysate

To prepare the hydrolysate for cultivation, 800 g of dry milled bagasse was mixed with 8 L of sulfuric acid solution (0.25%) and autoclaved for 45 min at 121°C. The liquid fraction was separated by filtration and the pH adjusted to 5.5 with 1.0 N NaOH.

Microorganism and Growth Conditions

The isolation of *P. janthinellum* (CRC 87M-115) from decaying wood was as described by Milagres (18). The fungi, initially maintained in silica stocks and then transferred to agar slants, were cultivated at 30°C for 5 d in medium containing 2% glucose, 0.25% yeast extract, 2% concentrated salt solution (v/v) based on Vogel's (19), medium and 2% agar-agar. The medium was autoclaved at 112°C for 5 min. To obtain the inoculum, the spores were suspended in water and the suspension was filtered through gauze placed in Erlenmeyer flasks. The final spore concentration was 10^5 /mL.

Cultivation Medium and β -Xylosidase Production

The cultivation medium for enzyme production consisted of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate supplemented with 2% concentrated salt solution (v/v) based on Vogel's medium and 0.1% yeast extract. The medium was autoclaved for 15 min at 121°C. The cultivation was carried out in Erlenmeyer flasks (125 mL) containing 25 mL of medium at an initial pH of 5.5 (uncontrolled). The flasks were agitated for 96 h (60 rpm) at 30°C.

β -Xylosidase Activity and Precipitation

β -Xylosidase activity was measured by the method described by Kumar and Ramón (20). The enzyme was precipitated with ethanol at 20 and 60% (v/v). The pH value of the precipitation medium was adjusted to 4.5 by adding 1 M acetate buffer (pH 4.0) at a ratio of 9:1 (v/v). The ethanol was slowly mixed with the medium in a refrigerated bath at -4°C, and the mixture was centrifuged (2000g for 15 min) at 2°C. To prepare the aqueous

phase, samples of the precipitate formed were separately solubilized in acetate buffer (0.03 M) to obtain pH 3.0 and 4.0, and in glycine/HCl buffer (0.03 M) to obtain pH 2.0. The electrical conductivity of the solubilized samples was adjusted to 4.0 mS/cm by adding NaCl.

Reversed Micellar Liquid-Liquid Extraction

Different values of CTAB concentration, electrical conductivity, hexanol and butanol concentrations, and pH were used in the enzyme extraction, according to the method of reversed micelles described by Pessoa and Vitolo (15) using CTAB prepared with a solution containing hexanol, isooctane, and butanol.

Experimental Design and Statistical Analyses

A 2^{5-1} fractional factorial design with center points was employed to evaluate the influence of the following factors on the enzyme extraction: pH, CTAB concentration, electrical conductivity, and hexanol and butanol concentrations (Table 1). For each of the factors, high (coded value: +1), center (coded value: 0) and low (coded value: -1) set points were selected. Extractions representing all 16 (2^{5-1}) set point combinations were made, as well as three extractions representing the center point (coded value: 0). Assays were conducted randomly. To analyze the results, STATGRAPHIC[®] software version 6.0 was used.

Results and Discussion

Table 1 shows the factor levels and the recovery results (Y[%]) of β -xylosidase obtained from the CTAB reversed micelle extractions performed according to a 2^{5-1} fractional factorial design with center points. Experiments 4, 6, 10, 12, 14, and 16 (pH 8.0) provided recovery values >15%. On the other hand, all the experiments performed at pH 3.0 provided recovery values <8%, independently of the levels of the other factors. The highest enzyme recovery values (39.3, 32.3, and 35.3%) were obtained in experiments 4, 12, and 16, respectively, with a CTAB concentration of 0.2 M. Comparison of assays 12 and 4 shows that when butanol concentration was increased from 10 to 20% and hexanol concentration was decreased from 10 to 5%, the enzyme recovery increased by 84%.

The results show that different combinations among the variables studied (pH, CTAB concentration, hexanol and butanol concentrations, and electrical conductivity) can be better evaluated by statistical analysis.

Table 2 gives the estimated effects, standard errors, and student's *t*-test. According to the results, pH and butanol concentration had the most significant main effects (+20.26 and +8.86) on enzyme recovery ($p < 0.10$ and $R^2 = 0.95$). A significant interaction between the factors AB, with a high effect (+10.32), and AE (+10.92), can also be observed. The positive interaction means that the enzyme recovery was enhanced when high levels of pH (8.0), CTAB concentration (0.2 M), and butanol concentration (20%)

Table 1
Variables, Levels, and β -Xylosidase Recovery
Using a 2⁵⁻¹ Statistical Factorial Design

Assay no.	pH	CTAB (M)	Electrical conductivity (mS/cm)	Hexanol (%)	Butanol (%)	Recovery (%)
1	3.0	0.1	4.0	5.0	20	0.0
2	8.0	0.1	4.0	5.0	10	0.6
3	3.0	0.2	4.0	5.0	10	0.0
4	8.0	0.2	4.0	5.0	20	59.3
5	3.0	0.1	10.0	5.0	10	7.0
6	8.0	0.1	10.0	5.0	20	18.7
7	3.0	0.2	10.0	5.0	20	1.7
8	8.0	0.2	10.0	5.0	10	0.0
9	3.0	0.1	4.0	10.0	10	7.3
10	8.0	0.1	4.0	10.0	20	17.5
11	3.0	0.2	4.0	10.0	20	2.9
12	8.0	0.2	4.0	10.0	10	32.3
13	3.0	0.1	10.0	10.0	20	1.5
14	8.0	0.1	10.0	10.0	10	18.8
15	3.0	0.2	10.0	10.0	10	0.0
16	8.0	0.2	10.0	10.0	20	35.3
17	5.5	0.15	7.0	7.5	15	5.1
18	5.5	0.15	7.0	7.5	15	4.5
19	5.5	0.15	7.0	7.5	15	9.5

Table 2
Estimated Effects, Standard Errors, and Student's *t*-Test
for 2⁵⁻¹ Factorial Design

Variable	Estimated effect	Standard error	<i>t</i> -Value
A (pH)	20.26	±3.117	6.50 ^a
B (CTAB)	7.50	±3.117	2.41 ^b
C (electrical conductivity)	-4.61	±3.117	1.48
D (hexanol)	3.53	±3.117	1.13
E (butanol)	8.86	±3.117	2.84 ^b
AB	10.32	±3.117	3.31 ^a
AC	-4.61	±3.117	1.48
AD	2.79	±3.117	0.89
AE	10.92	±3.117	3.50 ^a
BC	-9.77	±3.117	3.14 ^b
BD	-1.17	±3.117	0.37
BE	7.88	±3.117	2.52 ^b
CD	3.51	±3.117	1.12
CE	-1.02	±3.117	0.32
DE	-9.17	±3.117	2.95 ^b
Average	11.68	±1.430	8.17

^aSignificant at the 5% level with 3 (t = 3.182).

^bSignificant at the 10% level with 3 (t = 2.353).

were used. A possible explanation for this is the electrostatic interaction between the enzyme and the surfactant (13,21). Concerning the interaction between CTAB and electrical conductivity (BC), the negative effect (-9.77) shows that β -xylosidase recovery increased when a high CTAB concentration and a low electrical conductivity were used (0.2 M and 4 mS/cm, respectively).

Figure 1A–E shows the response surfaces of the significant interactions obtained after statistical analysis. Figure 1A, 1C, and 1D show response surfaces that correlate the CTAB concentration with pH, electrical conductivity, and butanol concentration, respectively. The highest β -xylosidase recovery value (59.3) was attained at the highest CTAB concentration (0.2 M), probably because this enzyme has a high molecular weight (~ 110 kDa), thus requiring reversed micelles with large diameters for its encapsulation. This can be explained by increasing the surfactant concentration (16). The influences of pH and electrical conductivity on extraction suggest that the effect of the ionic strength primarily consists of mediating the electrostatic interactions between the protein surface and the surfactant head groups.

The interaction between butanol concentration (E) and pH (A) (Fig. 1B) shows that β -xylosidase recovery increased when pH and butanol concentration were maintained at the highest levels (8.0 and 20%, respectively). However, the interaction between butanol concentration (E) and hexanol concentration (D) suggests that an antagonistic effect occurred, owing to the addition of cosolvents to the cationic reversed micellar system to increase the micellar size, which is also affected by the high ionic strength (16,21). The Debye screening effect determines the electrical double-layer properties adjacent to any charged surface and affects the range above which electrostatic interactions can overcome thermal motion of the soluble molecules. The characteristic distance for these electrostatic interactions is the Debye length, which is inversely proportional to the square root of the ionic strength. Thus, increased ionic strength will decrease this interaction distance and, hence, inhibit the solubilization of the protein. In the present study, the ionic strength also had influenced the micellar formation and size. The extraction was conducted at a pH value higher than the enzyme pI (isoelectric) value and its extraction depended only on electrostatic interactions.

After analysis of variance (ANOVA) including the significant factors (Table 3), a mathematical model was adjusted to the results (Eq. 1), and the coefficient of correlation between the data and the model (R^2) was 0.90. The validity of the model was verified by the ANOVA for total regression (Table 4). According to the F test ($F_{\text{model}} = 11.86 \gg F_{\text{table}} = 3.35$), the model was highly significant. In addition, it had no lack of fit, since the differences between the values experimentally obtained and the values predicted by the model were owing to experimental errors:

$$Y = 11.69 + 10.13A + 3.75B + 4.43E + 5.16AB + 5.46AE - 4.89BC - 3.94BE - 4.58DE \quad (1)$$

Fig. 1. (A) Effect of pH and CTAB concentration on β -xylosidase extraction by reversed micelles: electrical conductivity = 7.0 mS/cm, hexanol = 7.5%, and butanol = 15%; (B) effect of pH and butanol concentration on β -xylosidase extraction by reversed micelles: electrical conductivity = 7.0 mS/cm, hexanol = 7.5%, and CTAB = 0.15 M (continued on next page).

in which Y is the β -xylosidase recovery (%), A is the pH, B is the CTAB concentration (M), C is the electrical conductivity (mS/cm), D is the hexanol concentration (%), and E is the butanol concentration (%).

Fig. 1. (continued) (C) effect of electrical conductivity and CTAB concentration on β -xylosidase extraction by reversed micelles: pH = 5.5, hexanol = 7.5%, and butanol = 15%; (D) effect of CTAB concentration and butanol concentration on β -xylosidase extraction by reversed micelles: electrical conductivity = 7.0 mS/cm, pH = 5.5, and hexanol = 7.5% (continued on next page).

Equation 1 predicts a 44% β -xylosidase recovery (Y) under the following conditions: pH = 8.0, electrical conductivity = 4.0 mS/cm, CTAB concentration = 0.2 M, hexanol concentration = 5%, and butanol concentration = 20%. The result experimentally obtained (about 39%) strengthens the promise of validity of the model for interpolations.

E

Fig. 1. (continued) (E) effect of butanol concentration and hexanol concentration on β -xylosidase extraction by reversed micelles: electrical conductivity = 7.0 mS/cm, pH = 5.5, and CTAB = 0.15 M.

Table 3
ANOVA of Significant Factors

Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F Values	p Values
A (pH)	1642.48	1	1642.48	218.49	0.004 ^c
B (CTAB)	225.53	1	225.53	30.00	0.032 ^c
E (butanol)	313.91	1	313.91	41.76	0.023 ^c
AB	426.32	1	426.32	56.71	0.017 ^c
AE	477.31	1	477.31	63.50	0.015 ^c
BC ^c	382.11	1	382.11	50.83	0.019 ^c
BE	248.30	1	248.30	33.03	0.029 ^c
DE ^c	336.26	1	336.26	44.73	0.021 ^c
Lack of fit	411.98	8	51.50	6.85	0.133
Pure error	15.04	2	7.52		
Total	4479.23	18			

^aC, electrical conductivity.

^bD, hexanol.

^cSignificant at the 5% level $R^2 = 0.90$.

Table 4
ANOVA for Total Regression^a

Variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F Value
Modelo	4052.22	8	506.53	11.86
Erro	427.02	10	42.70	—
Total	4479.24	18		

^a $R^2 = 0.90$; $F = 3.35$.

Conclusion

A CTAB/isooctane/hexanol and butanol reversed micellar system was efficiently used as a recovery method of β -xylosidase from *P. janthinellum*. The recovery was controlled by electrostatic interactions. The response surface methodology helped (qualitatively) us to understand the mechanism of enzyme extraction. The recovery value obtained experimentally (39%) was very close to one predicted by the model (44%). This demonstrates that the use of reversed micellar solutions as extractants is an efficient way to recover the enzyme without reducing its activity, because the enzyme is not denatured by reagents.

Acknowledgments

We wish to thank Maria Eunice M. Coelho for revising the manuscript. This work was supported by a fellowship from FAPESP (Brazil). We also acknowledge the financial support of CAPES and CNPq.

References

1. Biely, P. (1985), *Trends Biotechnol.* 3, 286–290.
2. Wong, K. K. Y., Tan, L. U. L., and Saddler, J. N. (1988), *Microbiol. Rev.* 52, 305–317.
3. Durán, N., Milagres, A. M. F., Esposito, E., Curotto, M. E. S., Carvalho, S. M. S., Fernandes, E., Aguirre, C., and Teixeira, O. C. C. (1995), *Appl. Biochem. Biotechnol.* 53, 55–162.
4. Milagres, A. M. F. and Prade, R. A. (1994), *Enzyme Microb. Technol.* 16, 627–631.
5. Yang, J. L. and Eriksson, K. E. L. (1992), *Holzforschung* 46, 481–488.
6. Costa, S. A., Pessoa, A. Jr., and Roberto, I. C. (1998), *Appl. Biochem. Biotechnol.* 70/72, 629–639.
7. Brandani, V., Di Giacomo, G., and Spera, L. (1994), *Process Biochem.* 29, 363–367.
8. Mutsaers J. H. G. M. (1991), in *Xylans and Xylanases International Symposium*, Elsevier, Amsterdam, p. 48.
9. Cortez, E. V. and Pessoa, A. Jr. (1999), *Process Biochem.* 35, 271–283.
10. Pessoa, A. Jr. and Vitolo, M. (1998), *Process Biochem.* 33, 291–297.
11. Costa, A. S., Pessoa, A. Jr., and Roberto, I. C. (2000), *J. Chromatogr. B* 743, 339–348.
12. Hasmann, F. A., Pessoa, A. Jr., and Roberto, I. C., (2000), *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84–86, 1101–1111.
13. Rodrigues, E. M. G., Pessoa, A. Jr., and Milagres, A. M. F. (1999), *Appl. Biochem. Biotechnol.* 77–79, 779–788.
14. Hasmann, F. A., Pessoa, A. Jr., and Roberto, I. C. (1999), *Biotechnol. Techn.* 13, 239–242.
15. Pessoa, A. Jr. and Vitolo, M. (1991), *Biotechnol. Techn.* 11, 421, 422.
16. Krei, G. A. and Hustedt, H. (1992), *Chem. Eng. Sci.* 47, 99–111.
17. Pessoa, A. Jr. (1995), PhD thesis, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.
18. Milagres, A. M. F. (1988), MS thesis, Federal University of Viçosa, Viçosa, Brazil.
19. Vogel, H. J. (1956), *Microbiol. Genet. Bull.* 13, 113–118.
20. Kumar, S. and Ramón, D. (1996), *FEMS Microbiol. Lett.* 135, 287–293.
21. Pires, M. J. and Cabral, J. M. S. (1993), *Biotechnol. Prog.* 9, 647–650.

Anexo III

Artigos publicados ou em fase de publicação sobre as enzimas em estudo, mas não estão relacionados com o tema "Extração Líquido-Líquido de Enzimas", como fermentação, precipitação e cinética enzimática.

1. Silva, S.S.; Vitolo, M.; **Pessoa Jr, A.**; Felipe, M.G. Xylose Reductase and Xylitol Dehydrogenase Activities of D-xylose-xylitol-fermenting *Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**, 36(3), 187-191, 1996.
2. Cortez, E.V.; **Pessoa Jr, A.**; Assis, A.N. Xylanase Recovery By Ethanol and Na₂SO₄ Precipitation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 70-72:661-666, 1998.
3. Hasmann, F. A.; Silva, R.R.P. **Pessoa Jr. A.**; Roberto, I.C. β -Xilosidase: Avaliação da Estabilidade e Determinação de Parâmetros Cinéticos. **Farmácia e Química**. 32(2):28-31, 1999.
4. Cortez, E. V.; **Pessoa Jr, A.** Xylanase and β -xylosidase separation by fractional precipitation. **Process Biochemistry**. 35:277-283, 1999.
5. Silva, D. P.; Pessoa-Jr, A.; Vitolo, M. Effect of Agitation and Aeration on the Production of Hexokinase by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 91-93, 2001 (no prelo).
6. Lojudice, F. H.; Silva, D. P.; Zanchin, N. I. T.; Oliveira, C.C.; Pessoa-Jr, A. Overexpression of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) in Genetically Modified *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 91-93, 2001 (no prelo).

(Department of Biotechnology, Faculty of Chemical Engineering of Lorena, C. Postal 116, Lorena, Brazil and 'Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil)

Xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities of D-xylose-xylitol-fermenting *Candida guilliermondii*

S. S. SILVA, M. VITOLO, A. PESSOA Jr. and M. G. A. FELIPE

(Received 1 November 1995/Accepted 29 January 1996)

The effect of the inoculum age and initial xylose concentration on the activities of xylose reductase (XR) and xylitol dehydrogenase (XD) of *Candida guilliermondii* FTI 20037 were investigated. Under the experimental conditions used, the XR and XD activities were, respectively, NADPH and NAD or NADP dependent. The NADP/NADPH ratio for XR was not substantially influenced by the age of inoculum or the initial xylose concentration. The K_m of XR (0.18 M) was about 4-folds smaller than the K_m of XD NAD-dependent. A renewable xylose-xylitol conversion was obtained with 40 h aged inoculum of *Candida guilliermondii* FTI 20037 grown in a medium containing an initial xylose concentration of 120 g/l.

Xylitol, presents high economic value for food, odontological and pharmaceutical industries, due to its high sweetening power and anticariogenic properties. This sugar-alcohol is conventionally produced by chemical means through catalytic hydrogenation of highly purified xylose, which, in turn, is obtained from the hydrolysis of lignocellulosic raw materials (HYVÖNEN *et al.* 1982).

Nevertheless, the xylose-xylitol conversion could also be accomplished by using xylose-fermenting yeasts and fungi. Such conversion, as already well established, occurs due to the action of the intracellular enzymes xylose reductase (XR) (E.C.1.1.1.21) and xylitol dehydrogenase (XD) (E.C.1.1.1.9), which are responsible for the first and second step of xylose metabolism, respectively (HEIKKILÄ *et al.* 1991, ROSEIRO *et al.* 1991, WEEB and LEE 1992, NOLLEAU *et al.* 1993). Both enzymes are inducible by xylose and inhibited by hexoses (WEEB and LEE 1992, Skoog and HAHN-HÄGERDAL 1988). According to BICHO *et al.* (1988) the hexose repression, still not fully understood, constitutes in a major regulatory system in xylose-fermenting yeasts, which could reduce the fermentation potential of pentoses present in lignocellulosic hydrolysates.

The main advantage of the fermentative process of production of xylitol, over the chemical one, is that the microorganism converts the xylose present in the lignocellulosic hydrolysate directly to xylitol, without previous purification of xylose. However, the efficiency and productivity of the fermentation, which are in some extension related to the intracellular XR and XD activities, depends on the microorganism and the culture conditions employed (SILVA *et al.* 1994).

This paper deals with the effect of initial xylose concentration and the age of inoculum, two important culture condition parameters, on the XR and XD activities of *Candida guilliermondii* FTI 20037 grown in synthetic medium.

Materials and methods

Microorganism: *Candida guilliermondii* FTI 20037, described by BARNHSA *et al.* (1988) was used in all experiments. The stock culture was maintained at 4 °C on malt-extract agar slants.

Inoculum and fermentation conditions: A loopful of the stock culture was transferred into a 500 ml Erlenmeyer flask containing 200 ml of the following medium (SM): $5.0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $1.0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ yeast extract, $0.5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, $0.1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, $1.0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ KH_2PO_4 and $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ xylose. The flask was incubated into a rotary shaker at 200 min^{-1} and 30°C for desired time (15 h, 26 h, 40 h or 70 h). Then the cell suspension was inoculated into a bench fermentor containing 1.5 l of the SM medium with a initial xylose concentration ranging from 30 to $350 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. The culture condition were: temperature: 30°C , aeration rate: 20 ml air/min and stirring rate: 300 min^{-1} .

Culture harvesting: Samples of cells from different experimental conditions were harvested by centrifugation at 15300 rpm for 15 min at 10°C , washed twice with 50 mM phosphate buffer, pH 7.2. The cell pellets were then stored frozen until required for enzymatic analysis.

Preparation of cell-free extracts: The cell extract prepared from 50 ml of cell suspension in PBS buffer (pH 7.2) was thawed and disrupted using a sonifier cell disruptor (BRANSON B-15) at 20 kHz, in an ice bath, for 20 min. Cell homogenates were centrifuged at 15300 rpm for 15 min (10°C) and the supernatant solution was used for enzymatic assays.

Analytical methods: Xylose and xylitol were determined by HPLC using a Sugar-Pak (WATERS, USA) column and a refractive index detector. Cell concentration was measured by turbidimetry at (600 nm). The optical density was related to the cell dry weight through a suitable standard curve. Xylose reductase (XR) and xylitol dehydrogenase (XD) activities were determined spectrometrically at 340 nm at room temperature as described by SMILEY and BOLEN (1982), using NADPH, NADH, NADP or NAD (SIGMA, purity grade >90%) as cofactor. The reaction was initiated by the addition of xylose or xylitol and the variation of absorbance was monitored against the reaction time.

Protein in the cell extracts was determined by the dye-binding technique using Coomassie Blue reagent (BRADFORD 1976) and bovine serum albumin (SIGMA >99% purity) as the standard protein. Enzyme units (IU) were defined as micromol of NAD(P)H oxidized or NAD(P) reduced per minute at room temperature. Specific activities are expressed as IU/mg of protein.

Results and discussion

As shown in Fig. 1, xylitol is the first product formed through the pentose-phosphate pathway in which xylose is reduced by NADH or NADPH-dependent xylose reductase (EC.1.1.1.21). The xylitol is oxidized to xylulose by NAD or NADP-dependent xylitol deshydrogenase (EC.1.1.1.9), following the formation of xylulose-5-P, which can finally be converted to pyruvate (an intermediary connecting pentose-phosphate and glycolytic pathways) (TAYLOR *et al.* 1990, ROSEIRO *et al.* 1991, WEBB and LEE 1992). According to this scheme, xylitol formation by xylose-fermenting yeasts depends on the NAD/NADH ratio.

Fig. 1
Scheme of D-xylose fermentation by xylose-fermenting yeasts (BARBOSA *et al.* 1988)

Table 1
Influence of age of inoculum on the enzymatic activities¹⁾ of xylose reductase linked-NADPH and NADH and xylitol dehydrogenase linked-NAD and NADP

Age of inoculum (h)	Xylose reductase Activity-dependent		NADH/NADPH Ratio ²⁾	Xylitol dehydrogenase Activity-dependent		NAD/NADP Ratio ³⁾
	NADPH	NADH		NAD	NADP	
15	230	0	0	57	12	4.7
26	262	0	0	89	22	4.1
40	564	0	0	189	55	3.4
70	438	0	0	139	4	3.4

¹⁾ Specific activity U/mg of total protein.

²⁾ NADH/NADPH ratio = quotient between the enzymatic activity of xylose reductase dependent of NADH and NADPH.

³⁾ NAD/NADP ratio = quotient between the enzymatic activity of xylitol dehydrogenase dependent of NAD and NADP.

Xylose reductase (XR) and xylitol dehydrogenase (XD) are affected by the age of the inoculum (Table 1). Using an inoculum after a 40 h incubation in the shaker, it was attained cells with the highest XR (564 U/mg protein) and XD (189 U/mg protein) activities.

The increase of enzymatic activities as the age of the inoculum increased could result from the activation of the pentose-phosphate pathway. According to GONG (1983) such activation should be linked to the global intracellular oxi/red balance. The production of NADP during the reduction of xylose can activate the glucose-6-P-dehydrogenase, which, activates the pentose-phosphate pathway. Thus, the xylose metabolism in yeasts operates in a coordinated and closed cycle, assuring the generation of the NADPH necessary for the xylose/xylitol conversion. The yeast catabolizes an amount of xylitol sufficient to produce glucose-6-P needed for regenerating NADPH and maintaining the cycle.

From Table 1 it is clear that XR is strictly NADPH-dependent, whereas XD can act in presence of NAD or NADP. Nevertheless, in a 40 h aged inoculum NAD-linked XD has an activity fourfold higher than NADP-linked one. According to GURIO *et al.* (1989) and ROSEIRO *et al.* (1981) the accumulation of xylitol by xylose-fermenting yeasts is associated with the complete absence of NADH-XR activity. It must be pointed out that in a 70 h aged inoculum the NADP-XD activity is significantly diminished. In regards to the NAD/NADP ratio it is practically constant for aged inocula between 15 h and 40 h, increasing markedly for cells older than the upper limit of this interval. As no study was found in the literature describing the effect of the age of the inoculum on xylose bioconversion into xylitol, thereby there are no data for comparison with our results. So that, we can assume a 40 h aged inoculum as being the best inoculum for attaining a suitable xylose-xylitol conversion.

TAYLOR *et al.* (1990) reported that xylitol production is favored by a NADH overproduction during the xylose catabolism. However, few works describe quantitative aspects related to the production and consumption of NADPH in yeasts. Thereby, the production of xylitol by yeasts appears to be essentially related to the pool of NADPH (THORNAT *et al.* 1987). According to these authors, the xylose-xylitol conversion occurs mainly for the regeneration of the coenzymes and, secondarily, as a cellular detoxification mechanism.

In Table 2 are presented the XR activities against the initial xylose concentration in the medium. The highest values for those activities, 636 U/mg protein and 229 U/mg protein, respectively, for XR-NADPH and XD-NAD occurs in a medium containing $117 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ of initial xylose. Moreover, the NADH/NADPH ratio is not markedly influenced by xylose concentration, since NADH-linked XR activity remains systematically low. Nevertheless, the NAD/NADP ratio is the highest at $117 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ of initial xylose concentration in the medium.

Table 2

Effect of xylose concentration on enzymatic activities¹⁾ of xylose reductase dependent of NADPH and NADH and xylitol dehydrogenase dependent of NAD and NADP

Xylose concentration (g/L)	Xylose reductase Activity-dependent		NADH/NADPH Ratio ²⁾	Xylitol dehydrogenase Activity-dependent		NAD/NADP Ratio ³⁾
	NADPH	NADH		NAD	NADP	
30	299	14	0.05	98	19	5.2
50	252	14	0.06	78	11	7.1
70	370	8	0.02	116	19	6.1
90	492	0	0	133	36	3.7
120	636	0	0	229	8	28.6
170	333	0	0	67	9	7.4
230	311	0	0	0	0	0
350	0	0	0	0	0	0

¹⁾ Specific activity U/mg of total protein.

²⁾ NAD/NADPH ratio = quotient between the enzymatic activity of xylose reductase dependent of NADH and NADPH.

³⁾ NAD/NADP ratio = quotient between the enzymatic activity of xylitol dehydrogenase dependent of NAD and NADP.

NOLLEAU *et al.* (1993) found similar results for *Candida guilliermondii* NRC 5778 and *Candida parapsilosis*, and that XR was strictly NADPH-dependent. Our data lead to the conclusion that *C. guilliermondii* FTI 20037 shows a good fermentative performance for xylitol production and high XR and XD activities in the range of 70–170 g · L⁻¹ of xylose. Although the highest xylitol production occurs at 225 g · L⁻¹ of xylose (Table 3), the volumetric productivity and XR activity are 23 and 51% lower than that found at 117 g · L⁻¹ of xylose. Thus, this initial xylose concentration appears to be indicate as the start point for the development of an efficient microbiological process for xylitol production.

In the yeast *C. guilliermondii* FTI 20037 the NADH/NADPH ratio for XR is not significantly influenced by the age of the inoculum or the xylose concentration. These results suggest that under these conditions only one NADPH-linked XR, and not two enzymes exists with two different specificities. Similar results were observed in culture of *Candida shehatae* grown in xylose (GIRIO *et al.* 1989).

In Table 4 are presented the V_{max} and K_m values related to XR and XD in presence of each coenzyme (NAD or NADP: NADH or NADPH). As can be seen, K_m for XR is about 4-folds smaller than the K_m of NAD-linked XD. This fact could be explain the accumulation of xylitol inside the cytoplasm of *C. guilliermondii* FTI 20037, with further excretion to the culture medium.

Table 3

Effect of xylose concentration on xylitol formation by *Candida guilliermondii*

Xylose concentration (g/L)	Time (h)	x (g/L)	Δx (%)	γ x/s (g/g)	Xylitol (g/L)	Qs (g/(g · h))
30	90	2.39	100	0.07	16.61	0.07
50	90	2.80	100	0.06	28.72	0.18
70	90	2.39	100	0.03	46.70	0.33
90	112	2.88	100	0.03	63.43	0.28
120	166	2.45	97	0.02	91.82	0.28
170	220	2.17	99	0.01	113.31	0.23
230	296	2.41	85	0.01	127.40	0.27
350	296	2.03	30	0.01	33.80	0.06

Table 4

Kinetic parameters of the xylose reductase and xylitol dehydrogenase enzymes

Enzyme	Coenzyme	Coefficients ¹⁾			V_{max} (U/ml)	K_m (mM)
		linear	angular	correlation		
Xylose reductase	NADPH	0.00410	0.00077	0.996	243	0.18
Xylitol dehydrogenase	NAD	0.00594	0.00449	0.996	168	0.75
	NADP	0.01670	0.01160	0.995	60	0.69

¹⁾ Coefficients of the straight line obtained by adjustment employing the minimum square method and plotting the inverse of the enzymatic activity as a function of the inverse of the substrate concentration.

Finally, the data presented enable us to conclude that the yeast employed in the present study has a significative potential in xylitol production, mainly due to its high XR activity, the fundamental enzyme for this bioconversion.

References

- BARBOSA, M. F. S., MEDEIROS, M. B., MANCILHA, I. M., SCHNEIDER, H. and LEE, H., 1988. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. *Journal of Industrial Microbiology*, **3**, 241–251.
- BICHO, P. A., RENNALS, P. L., CUNNINGHAM, J. D. and LEE, H., 1988. Induction of xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities in *Pachysolen tannophilus* and *Pichia stipitis* on mixed sugars. *Applied and Environmental Microbiology*, **54**, 50–54.
- BRADFORD, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle for protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248–254.
- GIRIO, F. M., PEITO, A. M. and AMARAL-COLLAÇO, M. T., 1989. Enzymatic and physiological study of D-xylose metabolism by *Candida shehatae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **32**, 199–204.
- GONG, C. S., 1983. Recent advances in D-xylose conversion by yeasts. In: TSAO, G. T. (ed.), *Annual Reports on Fermentation Process*. New York: Academic Press, vol. 6, 253–296.
- HEIKKILÄ, H., HYÖKY, G., RAHKILÄ, L., SARKKI, M.-L. and VILJALA, T., 1991. A process for the simultaneous production of xylitol and ethanol. FI patente WO 91/10740, 25/07/1991.
- HYVÖNEN, L., KOIVISTOINEN, P. and VOIRO, F., 1982. Food technological evaluation of xylitol. *Advances in Food Research*, **28**, 373–403.
- NOLLEAU, V., PREZIOSI-BELLOY, L., DELGENES, J. P. and NAVARRO, J. M., 1993. Xylitol production from xylose by two yeast strains: Sugar tolerance. *Current Microbiology*, **27**, 191–197.
- ROSEIRO, J. C., PEITO, M. A., GIRIO, F. M., AMARAL-COLLAÇO, M. T., 1991. The effects of the oxygen transfer coefficient and substrate concentration on the xylose fermentation by *Debaryomyces hansenii*. *Arch. Microbiology*, **156**, 484–490.
- SILVA, S. S., MANCILHA, I. M., QUEIROZ, I. M., FELIPE, M. G. A., ROBERTO, I. C. and VITOLO, M., 1994. Xylitol formation by *Candida guilliermondii* in media containing different nitrogen sources. *J. Basic Microbiol.*, **34**, 205–208.
- SKOOG, K. and HAHN-HÄGERDAL, B., 1988. Xylose fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, **10**, 66–80.
- SMILEY, K. L. and BOLEN, P. L., 1982. Demonstration of D-xylose reductase and D-xylitol dehydrogenase in *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnology Letters*, **5**, p. 607–610.
- TAYLOR, K. B., BECK, M. J., HUANG, D. H. and SAKAI, T. T., 1990. The fermentation of xylose: studies by carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Industrial Microbiology*, **6**, 29–41.
- THORNAT, P., GUERREIRO, J. G., FOUCART, M. and PAQUOT, M., 1987. Bioconversion of xylose into xylitol by *Pachysolen tannophilus*. Mededelingen. Faculteit. Landbouwwetenschap Rijkuniversiteit Gent, **52**, 1517–1528.
- WEBB, S. R. and LEE, H., 1992. Characterization of xylose reductase from the yeast *Pichia stipitis*: evidence for functional thiol and histidyl groups. *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 1857–1863.

Mailing address: Dr. S. S. SILVA, FAENQUIL/DEBIQ, 12600.000 Lorena SP, Brazil
E-mail: hfsilva@buriti.ibict.br

Xylanase Recovery by Ethanol and Na₂SO₄ Precipitation

ELY V. CORTEZ, ADALBERTO PESSOA JR,*
AND ADILSON N. ASSIS

Depto. Biotecnologia/FAENQUIL, Rod. Itajubá-Lorena, Km 74,5,
12.600-000, Lorena/SP, Brazil

ABSTRACT

Xylans are the major components of the hemicellulosic fraction of lignocellulosic biomass and their hydrolysis can be obtained using xylanases from *Penicillium janthinellum*. In this work, sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate was used as the substrate for producing xylanase. The precipitation of these enzymes was studied using ethanol and Na₂SO₄ as precipitating agents. Ethanol precipitation experiments were performed batchwise in concentrations ranging from 10 to 80%, pH 4.0 to 7.0, at 4°C. The concentrations used in the precipitations with Na₂SO₄ were from 5 to 60% at pH 5.5 and 25°C. Solubility curves as a function of xylanase activity and total protein for both precipitating agents were made. According to the results, Na₂SO₄ is not appropriate for precipitating xylanases in this medium since at salt concentrations higher than 25%, the enzyme was denaturated and at this concentration less than 80% of the enzyme and total protein were precipitated. Because of differences in xylanase and total protein solubility, a fractionated precipitation using ethanol can be performed, since with 40% ethanol, 49% of the total protein was precipitated and more than 95% of the enzyme was kept in solution. On the other hand approx 100% of the xylanases were recovered by precipitation after adding 80% ethanol.

Index Entries: Xylanase; ethanol; precipitation; sodium sulfate.

INTRODUCTION

Xylans are the major components of the hemicellulosic fraction of lignocellulosic biomass and their hydrolysis can be obtained using xylanases (1). The enzymatic complex is composed of endoxylanases that cleave internal xylosidic linkages on the xylan backbone and β -xylosidases that release xylosyl residues by endwise attack of xylooligosaccharides (1,2). Efforts have been made in the pulp and paper industries to reduce

* Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed.

the amount of chlorine used for bleaching. Studies have been conducted on the effluent treatment and the use of less toxic bleaching agents are under study (3). The residual lignin removal by enzymatic method is a very active research area (4,5). According to Durán et al. (6), xylanases produced by *Penicillium janthinellum* can be used to reduce the chlorine charge in *Eucalyptus*-pulp bleaching with a simultaneous brightness gain. Xylanases have also been used in bread making (7), clarification of beer and juice (1), and partial xylan hydrolysis in animal feed (2). According to Gättinger et al. (8), xylanases are produced from processed or refined substrates such as sugars, cellulose, and xylan. All of these methods are expensive for industrial-scale production and to lower production costs, cheaper substrates must be employed. Sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate, composed mainly of xylose oligomers, is a potential substrate. Optimal conditions for cultivation parameters (like agitation and aeration rates) have been investigated (9). However, xylanase recovery from the cultivated medium using a scalable technique has to be studied.

Precipitation and recovery of protein precipitates by centrifugation are widely practiced in the biotechnological industry. Ethanol precipitation is a promising technique since it has been applied to other types of proteins on an industrial scale (10,11). Because of their low dielectric constants (compared to water) organic solvents increase Coulombic attraction between protein molecules. Aggregates are formed until the particle size reaches macroscopic proportions and precipitation occurs. Ethanol is by far the most important of the solvents owing to its good physicochemical properties, like complete miscibility with water, good freezing-point depression, no explosive mixtures, high volatility, chemical inertness, low toxicity, and low cost (especially in Brazil). Protein precipitation by salting out is the oldest type of precipitation and is still used regularly on a laboratory scale. The mechanism is, nevertheless, not completely understood although it is clear that high-salt concentrations remove water associated with protein. The most commonly used salts are ammonium sulfate and sodium sulfate. Ammonium sulfate, although widely used, presents waste disposal problems because of the nitrogen content and corrosive properties. Sodium sulfate is an alternative to salt precipitation since it constitutes a simple means of recycling by reduction of the temperature and separation of the salt crystals. The present study was carried out to examine the xylanase and total protein precipitation using ethanol and sodium sulfate. Ethanol and salt precipitations are used in xylanase precipitations, but the experiments are performed exclusively for laboratory applications (11–16).

MATERIALS AND METHODS

Preparation of Sugarcane Bagasse Acid Hydrolysate

In order to prepare the hydrolysate for cultivation, 800 g of dry-milled bagasse was mixed with 8 L sulfuric acid solution (0.25%) and autoclaved

for 45 min at 121°C. The liquid fraction was separated by filtration adjusted to pH 5.5 with NaOH.

Cultivation Medium and Enzyme Production

The isolation of *P. janthinellum* from the decaying wood was described by Milagres (17). This microorganism was identified by the Biosystematic Research Center of Canada (Ottawa, Ontario) and deposited in their collection with the designation of CRC 87M-115. The strain was maintained in silica stocks and, by transfer, on agar slants. The fungus was cultivated at 30°C for 5 d in medium containing 1% glucose, 0.1% yeast extract, 2% (v/v) concentrated complete salts solution based on Vogel's medium (18), and 2% agar-agar. The medium was sterilized at 121°C for 15 min. The spore inocula were obtained by suspending spores in water and filtering through gauze into Erlenmeyer flasks. The final concentration of spores was 10^7 /mL. The cultivation medium for enzyme production contained sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate supplemented with 2% (v/v) concentrated salt solution based on Vogel's medium and 0.1% yeast extract. The medium was then autoclaved for 15 min at 121°C. The cultivation was carried out in Erlenmeyer flasks (125-mL) containing 25 mL of medium. Standard cultivation conditions were: temperature 30°C; initial pH 5.5 (uncontrolled); and 96 h of cultivation time. In general, xylanase produced by *P. janthinellum* in an aqueous solution is stable at a range between pH 4.0 and 8.0; it is rapidly inactivated below pH 4.0 and above pH 8.0 (17). At temperatures above 30°C, the enzyme is also unstable.

Enzyme Activity and Protein Determination

Extracellular xylanase activities were determined by incubating 0.1 mL of diluted culture filtrate with 0.9 mL of a "Birchwood" xylan suspension (10 g/L) in 0.05 M phosphate buffer (pH 5.5) for 5 min at 50°C, according to Bailey et al. (19). The released reducing equivalents were measured by a colorimetric assay (20) using xylose solution as a standard reference. Activity units were expressed as micromoles of reducing equivalents released per min at 50°C. The amount of total protein was determined according to the Coomassie blue method described by Bradford (21) using bovine serum albumin (BSA) as a protein concentration standard.

Protein and Enzyme Precipitation

The concentrations of Na_2SO_4 used in the precipitations were: 5, 15, 25, 40, and 60% (w/w). The calculated amount of salt in the solid form was added slowly to a 15-mL centrifuge tube containing culture medium. After the addition of salt, all of the tubes contained 5.0 g of the mixture, which was agitated for 15 s in a vortex at pH 5.5 at room temperature (25°C). The precipitate was collected by centrifugation (6000 g, for 20 min) and then dissolved in 0.05 M acetate buffer (pH 5.5) up to the initial mass (5.0 g).

The ethanol concentrations employed in the precipitation experiments were: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, and 80%. The pH of the precipitation medium was adjusted to the desired value by adding 0.10 M acetate buffer (pH 4.0 and 5.5) or phosphate buffer (pH 7.0). The ethanol was slowly added to the medium under agitation (200 rpm) and the temperature was maintained at 4°C. After the addition of ethanol, the agitation was stopped for 30 min and the mixture was centrifuged (2000 g for 30 min, Centrifuge Jouan Mod. [Saint-Herblain, France] 1812) under refrigeration (4°C). The pellet was resuspended using 0.05 M acetate buffer (pH 5.5) at room temperature (~25°C). The total protein content was determined in triplicate: in the supernatant, in the pellet, and in the initial sample for both precipitations. Enzymatic activities were determined only in the resuspended pellet and in the initial sample since the ethanol and the Na₂SO₄ present in the supernate could interfere with the methodology.

Chemicals

Birchwood 4-O-methyl-D-glucoroxylan (90% xylose) were obtained from Sigma (St. Louis, MO). All of the other chemicals were of analytical grade.

RESULTS AND DISCUSSION

In large-scale enzyme precipitations, organic solvents were more successful than protein salting out (22,23). The efficiencies of two compounds (ethanol and sodium sulfate) to recover *P. janthinellum* xylanase were studied. The cell-free filtrate of acid hemicellulose hydrolyzate culture was used as a crude enzyme mixture. The results shown in Figs. 1 and 2 indicate that recovered xylanase fractions ranged from 18 to 72% in the precipitations conducted with sodium sulfate, and from 0 to 100% in the precipitations with ethanol. In the precipitations performed with sodium sulfate, the maximal xylanase recovery (71.8%) was attained at 25% concentration (Fig. 1). At higher salt concentrations the enzyme redissolved in the supernate and the recovery yield decreased. The total protein precipitation curve showed a different behavior. The highest recovery level (68%) was observed at 40% salt concentration. A comparison between the behaviors of the curves for total protein and xylanase activity reveal that the only benefit derived from the precipitation studies is the concentration factor. A fractionation is not recommended in this case since a satisfactory increase in the purification factor cannot be achieved. As can be seen in Fig. 2, at 40% ethanol concentration, approx 30% of the total protein was precipitated, whereas 95% of the xylanase remained in the solution; however at 80% ethanol concentration, 100% of the xylanase precipitated and approx 30% of the total protein remained in the solution. These results suggest a fractionated precipitation when using ethanol as a precipitating agent. The fractionation can be performed in two steps; the first at 40% and the second

Fig. 1. Xylanase recovery (—■—) and total protein recovery (—●—) as a function of sodium sulfate concentration (%).

Fig. 2. Xylanase recovery (—■—) and total protein recovery (—●—) as a function of ethanol concentration (%).

one at 80% ethanol concentration. The purification factor can increase twofold.

CONCLUSIONS

The precipitation of xylanase from *P. janthinellum* using ethanol and Na₂SO₄ as precipitating agents was studied. Sodium sulfate proved to be inappropriate for enzyme purification, since the xylanase and total protein precipitations occurred similarly in all the concentrations tested. The ethanol precipitation showed promising results. A fractionated precipita-

tion is possible since at 40% ethanol, 30% of the total protein precipitates, whereas 95% of the enzyme keeps soluble. On the other hand, at 80% ethanol concentration, 30% of the total protein keeps soluble and 100% of the enzyme is precipitated. In this way the purification factor can increase twofold for the concentrated enzyme.

ACKNOWLEDGMENTS

Ely V. Cortez acknowledges the financial support of CAPES/Brazil, and FAPESP/São Paulo, in the form of a Master of Science fellowship. Thanks are also due to Maria Eunice M. Coelho for revising this text.

REFERENCES

1. Biely, P. (1985), *Trends Biotechnol.* 3, 286–290.
2. Wong, K. K. Y., Tan, L. U. L., and Saddler, J. N. (1988), *Microbiol. Rev.* 52, 305–317.
3. Parthasarathy, V. R. (1990), *Tappi J.* 73, 243–247.
4. Senior, D. J., Hamilton, J., Bernier, R. L., and Dumanoir, J. R. (1992), *Tappi J.* 11, 125–130.
5. Allison, R. W., Clark, T. A., and Wrathall, S. H. (1993), *Appita J.* 46, 269–273.
6. Durán, N., Milagres, A. M. F., Sposito, E., and Haun, M. in (1993), *ACS Symposium Series*, Saddler, J. N. and Perner, N. H., eds., American Chemical Society, San Diego, CA, pp. 332–338.
7. Mutsaers, J. H. G. M. (1991), in *Xylans and Xylanases International Symposium*, Wageningen, The Netherlands, Novo Nordisk, p. 48.
8. Gättinger, L. D., Duvnjak, Z., and Khan, A. W. (1990), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33, 21–25.
9. Palma, M. B., Milagres, A. M. F., Prata, A. M. R., and Mancilha, I. M. (1996), *Process Biochem.* 31, 141–145.
10. Miranda, E. A. and Berglund, K. A. (1995), *Braz. J. Chem. Eng.* 12, 1–12.
11. El-Helow, E. R. and El-Gazaerly, M. A. (1996), *J. Basic Microbiol.* 36, 75–81.
12. Kang, M. K., Maeng, P. J., and Rhee, Y. J. (1996), *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3480–3482.
13. Chauthaiwale, J. and Rao, M. (1994), *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4495–4499.
14. Kubata, B. K., Suzuki, T., Horitsu, H., Kawai, K., Takamizawa, K. (1994), *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 531–535.
15. He, L., Bickerstaff, G. F., Paterson, A., and Buswell, J. A. (1993), *Enzyme-Microb. Technol.* 15, 13–18.
16. Grabski, A. C. and Jeffries, T. W. (1991), *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 987–992.
17. Milagres, A. M. F. (1988), M. Sc. Thesis, UFV, Brazil.
18. Vogel, H. J. (1956), *Microb. Genet. Bull.* 13, 42–43.
19. Bailey, M. J., Biely, P., and Poutanen, K. (1992), *J. Biotechnol.* 23, 257–271.
20. Miller, G. L. (1959), *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
21. Bradford, M. A. (1976), *Anal. Biochem.* 71, 248–254.
22. Volesky, B. and Luong, J. H. T. (1983), *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 2, 119–146.
23. Dunnill, P. (1983), *Process Biochem.* 18, 9–13.

β -XILOSIDASE: AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE E DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS

β -Xylosidase: Stability Evaluation And Kinetic Parameters Determination

Francislene A. Hasmann⁽¹⁾, Rafael R. Pinho Da Silva⁽²⁾, *Adalberto Pessoa Junior⁽³⁾, Inês C. Roberto⁽⁴⁾

Resumo: A β -Xilosidase, uma enzima pertencente ao complexo xilanolítico, possui importantes aplicações nas indústrias de alimentos e de papel e celulose. No presente trabalho estudou-se a β -Xilosidase produzida pelo fungo *Penicillium janthinellum* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. O complexo xilanolítico obtido, foi submetido a um processo precipitação fracionada com etanol (20 e 60% v/v) visando a separação da enzima β -Xilosidase. Os ensaios de estabilidade e a determinação dos parâmetros cinéticos da enzima foram realizados em diferentes valores de pH (3,0; 6,0; 7,0 e 9,0). A enzima apresentou grande estabilidade na faixa de pH ácido (3,0 a 6,0), para ambas as temperaturas de estocagem avaliadas (-4°C e 4°C). O pNpX (p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo) foi o substrato utilizado para determinação dos parâmetros cinéticos aparentes, K_M e V_m que apresentaram melhores valores 0,19 mM e 1,39 (U/mL) respectivamente, em pH 6,0.

Unitermos: β -xilosidase; estabilidade enzimática; cinética enzimática.

INTRODUÇÃO

A aplicação mais promissora das xilanases consiste da etapa de branqueamento de polpas de celulose, na indústria de papel e celulose [1] como alternativa para redução de 20 a 30% no uso de agentes clorados, no intuito de se diminuir a agressão ao ambiente causada por tais agentes [2]. As xilanases têm como substratos naturais as hemiceluloses, que são polissacarídeos não celulósicos, geralmente localizados no meio da lamela média das plantas, em toda a extensão da fibra e intimamente associados à celulose [3]. A hemicelulose mais comumente encontrada na parede celular de plantas terrestres é a xilana, representando mais de 30% em peso seco [4]. A estrutura da hemicelulose determina a composição do sistema xilanolítico necessário para sua total hidrólise [5]. O sistema enzimático necessário para degradação de xilanas consiste de uma mistura de endo e exo enzimas, sendo a β -xilosidase responsável pela degradação dos oligossacarídeos liberados na hidrólise das ligações glicosídicas pelas endo-enzimas também pertencentes ao complexo [6].

O método empregado para obtenção da enzima consiste de uma purificação de baixa resolução utilizada por

CORTEZ [7], que verificou ser a β -xilosidase precipitada com adição de 60% (v/v) de etanol, obtendo uma recuperação da ordem de 75%.

Os parâmetros cinéticos, K_M (Constante de Michaelis-Menten) e V_m (Velocidade máxima), mesmo não estando a enzima totalmente purificada, expressam características importantes e úteis, que são fundamentais não somente para a descrição matemática da cinética enzimática, mas também para sua purificação e entendimento de mecanismos reguladores de sua atividade catalítica. O K_M demonstra a afinidade da enzima pelo substrato em determinadas condições; sendo que a partir deste parâmetro é possível se comparar a atuação de diferentes enzimas sobre o mesmo substrato, permitindo assim a seleção da enzima a ser utilizada [8]. Para enzimas puras os valores de K_M e V_m podem ser diferentes daqueles encontrados para enzima parcialmente purificada. Entretanto, são valores bem próximos das reais condições das aplicações industriais, pois enzimas xilanolíticas normalmente não são aplicadas na forma pura.

A enzima β -xilosidase, de diferentes microrganismos, é capaz de promover a hidrólise de 48 a 68% da hemicelulose da biomassa [9]. Desta forma, um estudo

⁽¹⁾ Faculdade de Eng. Química de Curitiba - CEP 81280-000, pp. 1 - Curitiba, SP, Brasil.
⁽²⁾ Faculdade de Ciências Farmacéuticas - SP - CEP 05389-070, pp. 00128 - São Paulo, SP, Brasil.

mais aprofundado da enzima e sua melhor caracterização é necessário. Assim este trabalho tem por objetivo melhor caracterizar esta enzima devido suas amplas aplicações.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismo

O microrganismo utilizado para produção da enzima foi o fungo *P. janthinellum*, isolado de madeira em decomposição em Lorena-SP por MILAGRES [10] e identificado pelo Biosystematic Research Center, Canadá. O meio de cultura usado para obtenção de esporos e manutenção do *P. janthinellum* foi composto por 2% de glicose, 0,25% de extrato de levedura, 2% (v/v) de solução mineral [11] e 2% de ágar-ágar.

Meio de Cultura formulado a partir do Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana-de-Açúcar

Para produção do hidrolisado foi utilizado bagaço de cana-de-açúcar proveniente da Usina Nova América, Tarumã-SP, sendo a hidrólise realizada conforme descrito por MILAGRES, LACIS [12]: uma mistura contendo 20 mL de ácido sulfúrico p.a. e 8 L de água para 800 g de bagaço seco e moído foi autoclavada a 121 °C por 45 minutos. A fração líquida, constituída principalmente por hemiceluloses, foi recuperada por filtração em papel de filtro qualitativo (Klablin) e teve seu pH ajustado para 5,5 com NaOH 1N. Com o hidrolisado hemicelulósico foi preparado o meio, suplementando-se o mesmo com solução mineral de Vogel (2% v/v) e extrato de levedura (0,1%). Este meio foi autoclavado por 15 min a 112 °C.

Produção da β -Xilosidase

O complexo de xilanases no qual está presente a β -xilosidase foi obtido cultivando-se o fungo *P. janthinellum*, em "shaker" no meio preparado conforme descrito anteriormente, nas seguintes condições: frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio, 30 °C, agitação orbital de 60 rpm, por 96 horas. O inóculo correspondeu a 1 mL de solução aquosa de esporos (1×10^5 esporos/mL).

Precipitação da β -Xilosidase

A precipitação foi realizada com etanol, descrito por CORTEZ [7]. Numa primeira etapa, as proteínas de baixa massa molar foram precipitadas com etanol 20% (v/v); as amostras foram então centrifugadas (Centrifuga Jouan Mod. 1812) a $2.000 \times g$ por 15 min a 0 ± 2 °C. O sobrenadante obtido foi submetido a uma nova precipitação com a adição de etanol 60% (v/v), para recuperação da β -xilosidase. Após centrifugação sob as mesmas condições anteriores, os peletes contendo a enzima foram solubilizados com tampão acetato ou fosfato

(0,03M), de forma a fornecer o pH desejado, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1—Tampões utilizados para a solubilização da β -Xilosidase

TAMPÃO	pH
Acetato 0,03M	4,0 a 5,0
Fosfato 0,03M	6,0 a 7,5
Tris-HCl 0,03	8,0 a 8,5

Avaliação da Atividade Enzimática da β -Xilosidase

A atividade da β -xilosidase foi determinada através da quantidade de p-nitrofenol liberada após a ação da enzima numa solução de p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (pNpX) em água [13].

O meio de reação constituído por 250 mL de solução 2 mM de pNpX em água e 250 mL do meio fermentado devidamente diluído em tampão acetato de sódio (50 mM, pH 5,5), foi incubado a 50 °C por 30 min. A reação foi interrompida pela adição de 1 mL de solução de carbonato de sódio 2M. A absorvância da amostra foi lida em espectrofotômetro (BECKMAN DU 640B) a 400 nm e comparada com uma curva padrão para determinação do teor de p-nitrofenol liberado. Uma unidade de atividade de β -xilosidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 mmol de p-nitrofenol/min.mL, nas condições descritas acima.

Determinação dos Parâmetros Cinéticos Aparentes: $K_{M(App)}$ (Constante de Michaelis/Menten) e V_m (Velocidade Máxima)

Foi medida a atividade enzimática (conforme descrito anteriormente) da β -xilosidase purificada através da precipitação com etanol, utilizando-se as seguintes concentrações de substrato (pNpX): 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 15,0 e 20,0 mM. Os valores de K_m e V_m foram determinados pelo método de Lineweaver-Burk (LEHNINGER, 1976).

Determinação da Estabilidade da β -Xilosidase em Função do pH e do Tempo

A determinação da estabilidade da enzima β -xilosidase foi feita para diferentes valores de pH nas temperaturas de estocagem de -4 °C e 4 °C. Foi feito o acompanhamento da atividade enzimática, após a precipitação com etanol, seguida de solubilização em tampão de pH desejado: acetato de sódio para pH de 3,0, fosfato de potássio para pH 6,0 e 7,0 e Tris-HCl para pH 9,0.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Figura 1 estão apresentadas as curvas de atividade enzimática (U/mL) da enzima β -xilosidase em função da concentração do substrato (pNpX), para a enzima preci-

pirada com etanol e solubilizada nos valores de pH 3,0; 6,0; 7,0 e 9,0.

A maioria das enzimas apresenta um pH característico em que sua atividade é máxima; acima ou abaixo desse pH, a atividade se reduz. A inter-relação da atividade enzimática com o pH para qualquer enzima depende do comportamento ácido-básico da enzima e do substrato, bem como de muitos outros fatores que são, em geral, difíceis de analisar quantitativamente.

Figura 1 - Atividade da b-xilosidase após precipitação fracionada com etanol em função da concentração de substrato (pNpX) para os valores de pH 3,0; 6,0; 7,0 e 9,0

Na Figura 2, são apresentadas as curvas correspondentes ao inverso dos valores das atividades ($1/v$) em função do inverso das concentrações do substrato ($1/s$) para os valores de pH estudados. Estas curvas foram construídas para a determinação dos valores de $K_{M(app)}$ e V_m , onde a regressão linear dos pontos da permitiu obter as equações das quais extraiu-se os valores de K_M e V_m , que são apresentados na Tabela 2.

Figura 2 - Inverso dos valores da atividade enzimática ($1/v$) em função do inverso dos valores das

atividades ($1/v$) para os valores de pH estudados.

No presente trabalho, os valores de $K_{M(app)}$ foram pouco influenciados pelo pH (Figuras 1 e 2), sendo que o pH de solubilização 6,0, proporcionou menores valores para o parâmetro cinético $K_{M(app)}$, 1,39 mM.

Tabela 2 - $K_{M(app)}$ e V_m da β -xilosidase após precipitação fracionada com etanol em função do inverso das concentrações do substrato para diferentes valores de pH.

pH	V_m (U/mL)	$K_{M(app)}$ (mM)
3,0	0,19	1,42
6,0	0,19	1,39
7,0	0,22	2,01
9,0	0,17	1,47

RISTROPH & HUMPHREY [14] calcularam a velocidade de reação da β -Xilosidase do caldo fermentado produzido por *Thermonospora crassa* e obtiveram um K_M de 0,82 mM e uma V_m de 0,0085 U/mL, utilizando pNpX como substrato nas concentrações de 0,049 a 8,9 mM. KUMAR & RAMÓN [13], utilizando a mesma metodologia de medida de atividade citada no presente trabalho, encontraram para a β -Xilosidase pura do *Aspergillus nidulans*, valores de 1,1 mM e 2,56 U/mL para K_M e V_m , respectivamente.

Comparando os resultados obtidos (para o pH 6,0) com aqueles dos autores acima, verificamos que KUMAR & RAMÓN [13] obtiveram um K_M 21 % menor, e que RISTROPH & HUMPHREY [14] um V_m 95 % menor para um K_M 59 % menor. Estes autores, citam ainda valores de K_M de 0,22, 1,43 e 3,01 respectivamente para *Aspergillus*, *Bacillus* e *Malbranchea*. Desta forma, o K_M da β -Xilosidase encontrado no presente trabalho, é um valor condizente com a literatura, pois este parâmetro apresenta significativa variação (para a enzima β -Xilosidase), quando analisados diferentes microrganismos produtores.

É importante ressaltar, que os valores de $K_{M(app)}$ e V_m obtidos neste trabalho provavelmente seriam diferentes daqueles da enzima pura, pois as determinações foram feitas com a β -xilosidase parcialmente purificada, portanto são valores aparentes (app). Entretanto, são valores com boa aproximação das reais condições de aplicação industrial, pois enzimas xilanolíticas normalmente não são utilizadas na forma pura (CORTEZ, 1998).

Foi realizado também o estudo da estabilidade da enzima β -xilosidase para a mesma faixa de pH a duas

diferentes temperaturas de estocagem, 4°C e -4°C. O estudo consistiu do acompanhamento da atividade enzimática da b-xilosidase precipitada por um período de 96 dias nas temperaturas e valores de pH citados.

Os resultados deste estudo são mostrados nas Tabelas 3 e 4:

Tabela 3 - Atividade da β -Xilosidase em diferentes valores de pH em função do tempo, a 4°C

Atividade da β -Xilosidase [U/mL]

pH	0	1	2	3	6	29	52	96
3.0	0.15	0.20	0.20	0.16	0.19	0.15	0.12	0.16
6.0	0.24	0.29	0.21	0.26	0.26	0.32	0.17	0.20
7.0	0.11	0.12	0.12	0.10	0.11	0.10	0.08	0.12
9.0	0.15	0.13	0.10	0.05	0.03	0	0	0

Tabela 4 - Atividade da b-xilosidase em diferentes valores de pH em função do tempo a -4°C

Atividade da β -Xilosidase [U/mL]

pH	0	1	2	3	6	29	52	96
3.0	0.15	0.14	0.24	0.25	0.20	0.17	0.12	0.17
6.0	0.24	0.16	0.37	0.28	0.31	0.26	0.17	0.27
7.0	0.11	0.14	0.17	0.18	0.14	0.10	0.08	0.12
9.0	0.15	0.14	0.35	0.33	0.29	0.08	0.05	0.03

A maioria das enzimas apresenta um pH característico em que sua atividade é máxima; acima ou abaixo desse pH, a atividade se reduz. A inter-relação da atividade enzimática com o pH para qualquer enzima depende do comportamento ácido-básico da enzima e do substrato, bem como de muitos outros fatores que são, em geral, difíceis de analisar quantitativamente.

RODINOVA *et al.* [15], em estudos da estabilidade desta enzima, para faixa de pH de 4,0 a 6,0, observaram que a mesma é estável por 8 horas quando à temperatura ambiente. Esta faixa muito se assemelha à avaliada neste trabalho, sendo que provavelmente a temperatura exerça grande influência sobre a atividade catalítica da enzima, visto que a faixa de pH avaliada por estes autores, se assemelha à do presente trabalho, em que a enzima β -xilosidase, após 96 dias, teve sua atividade catalítica reduzida somente quando solubilizada e estocada em pH 9,0. Neste caso a enzima perdeu a atividade nas temperaturas estudadas. Tais resultados estão de acordo com a literatura [16] que mostram ter esta enzima melhor atividade catalítica em valores de pH ácido.

Por fim, a enzima β -xilosidase produzida por *P. janthinellum* apresentou grande estabilidade nas condições averiguadas. Sendo uma enzima extracelular, tal comportamento é desejado pois, ao contrário de enzimas intracelulares que estão protegidas pela célula, estas devem possuir resistência às condições adversas do meio onde irão atuar.

Agradecimentos: FAPESP, CNPq e CAPES

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Viikari, L., Kantelinen, A., Sundquist, J., Linko, M.: Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. *FEMS Microbio. Rev.*, v.13, p.335-350, 1994.
- Milagres, A. M. F., DURAN, N.: *Xylanolytic enzymes from Penicillium janthinellum and its applications in bleaching of pulp*. In: Visser, J., Beldman, G., Kusters-van Someren, M. A., Voragen, A. G. J. (eds.). *Xylans and Xylanases*. Amsterdam: Elsevier. *Prog. Biotechnol.*, v.7, p.539-545, 1992.
- Sunna, A., Antranikian, G.: Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, v.17, p.1, 39-67, 1997.
- Josleau, J. P., Comtat, J., Ruel, K.: Chemical structure of xylans and their interaction in the plant cell walls. In: Visser, J., Beldman, G., Kusters-van Someren, M. A., Voragen, A. G. J. (eds.). *Xylans and Xylanases*. Amsterdam: Elsevier, 1992, p.1-15. (Progress in Biotechnology, 7).
- Coughlan, M. P., Hazzewood, G. P.: b-1,4-Dxylan-degrading enzyme systems: biochemistry molecular biology and applications *Biotechnol. Appl. Biochem.*, v.17, p.259 - 289, 1993.
- Biely, P.: Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.*, 3 (1985) 286-90.
- Cortez, E. V.: *Recuperação de enzimas xilanolíticas por precipitação*. Lorena-SP, FAENQUIL 77p, 1998 (Tese de Mestrado).
- Lehninger, A. L.: *Bioquímica*. São Paulo: Edgard Blücher, 1976. p.126-145.
- Deshpande, V., Lachke, A., Mishra, C., Keskar, S., Rao, M.: Mode of action and properties of Xylanase and b-xilosidase from *Neurospora crassa*. *Biotechnol. Bioeng.*, v.28, p. 1832-1837, 1986..
- Milagres, A. M. F.: *Alguns aspectos da regulação de b-xilanases extracelulares de Penicillium janthinellum*, Viçosa, UFV, 1988 (Tese de Mestrado).
- Vogel, H. J.: A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (Medium N). *Microbial Genet. Bull.*, v.13, p.42-3, 1956.
- Milagres, A. M. F., Lacis, L. S.: Efficient screening of process variables in *Penicillium janthinellum* fermentation. *Biotechnol. Lett.*, v.13, n.2, p.113-118, 1991.
- Kumar, S. & Ramón, D.: Purification and regulation of the synthesis of a b-Xylosidase from *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.135, p.287-293, 1996.
- Ristroph, D. L., Humphrey, A. E.: The b-Xylosidase of *Thermonospora*. *Biotechnol. Bioeng.*, v.27, p.909-913, 1985.
- Rodionova, N. A.; Tavobilov, J. M.; Bezborodov, A. M.: b-xylosidase from *A. niger* 15: Purification and properties. *J. Appl. Biochem.*, v.5, p.300-312, 1983.
- Puls-J., Claeysens-M; Vranska-M; Coughlan-M-P Production of exo-glycosidase enzymes by *Talaromyces emersonii* CBS814.70 and importance in the overall hydrolysis of cell wall polysaccharides. *Abstracts*, v 13, n.14, 1995.

Xylanase and β -xylosidase separation by fractional precipitation

E.V. Cortez^a, A. Pessoa Jr.^{b,*}

^a Department of Biotechnology, FAENQUIL, Rod. Itajubá-Lorena, Km 74,5, 12.600-000, Lorena, SP, Brazil

^b Biochemical and Pharmaceutical Department, FCF, University of São Paulo, P.O.Box 66083, CEP 05315-970, São Paulo, SP, Brazil

Received 23 November 1998; accepted 21 March 1999

Abstract

β -Xylosidase (EC 3.2. 1.37) belongs to an enzyme complex, the xylanases, which cleave xylans and release xylosyl residues by endwise attack of xylo-oligosaccharides. Precipitation was performed with ethanol at concentrations of 20, 40, 60 and 80% at different pH values (4.6, 5.9, 6.3 and 7.0), in order to compare the behaviour of β -xylosidase with the behaviour of total xylanase present in the medium. In addition, a fractional precipitation of these enzymes was performed in three steps under the most suitable of all the conditions tested (pH 4.6, 4°C and 20, 60 and 80% ethanol concentrations). In the first step (20% ethanol), around 10% of β -xylosidase and 80% of total protein precipitated, and in the second step (60% ethanol), 75% of the same enzyme precipitated. The remaining xylanolytic complex (82%) precipitated in the third step (80% ethanol). The electrophoresis analysis showed that the enzymes can be selectively separated by ethanol precipitation according to their molecular weights. The kinetic parameters (K_M and V_m) of β -xylosidase before and after the precipitations remained constant. The separation process did not affect the kinetic characteristics of the enzyme. © 1999 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: β -Xylosidase; Xylanase; *Penicillium janthinellum*; Fractional precipitation; Kinetic parameters

1. Introduction

Precipitation serves to achieve separation by the conversion of solutes to solids, which can be subsequently removed by solid/liquid separation. Ideally, precipitation should result both in concentration and in purification, but in reality the former is more effectively achieved. For this reason this technique is often used in the early stages of downstream operations, reducing the volume for later stages. However, for mixtures considerably less complex, like extracellular enzymes, precipitation is an effective way of achieving purification as well. The advantages of employing precipitation for concentration and purification are that this technique needs no interruption, requires simple equipment, and can be easily scaled up and used with a large number of precipitants, including some inexpensive ones, such as ethanol, which is widely produced in Brazil and worldwide. Precipitants that do not denature biological prod-

ucts, like enzymes, can also be used, and the precipitate formed is often more stable than the soluble material [1].

Many water-miscible organic solvents are able to precipitate enzymes. Owing to their low dielectric constants (as compared with water), organic solvents increase the Coulombic attraction between protein molecules. Aggregates are formed until the particles reach macroscopic proportions and precipitate. This phenomenon has been described as removal of water from the hydration spheres of the protein allowing electrostatic forces to bring oppositely charged regions of the protein together. In this case, water is removed both by bulk replacement by the organic solvent and by structuring around the organic molecules. As a consequence, the dielectric constant is lowered. The hydrophobic areas of the protein tend to become more soluble, but, as indicated by the solubility theory, this leads to a reduction in protein solubility. The higher the temperature, the greater is the danger of refolding and consequently denaturing the precipitated enzymes. Therefore, for fractionation with organic precipitants, low temperatures (often below 0°C) should be used for

* Corresponding author. Tel.: +55-1181-83710; fax: +55-1181-56386.

E-mail address: pessoajr@postmaster.co.uk (A. Pessoa)

all but the most stable enzymes. The alcohols—methanol, ethanol, and isopropanol—are important industrial precipitants. Ethanol probably represents the ideal balance between effect on solubility and adequate hydrophilic character to reduce denaturation. The potential of ethanol for fractionation of a very complex protein mixture is displayed in the Cohn method of producing blood serum fractions. Fractionation by this method is critically dependent on temperature and this raises a technical problem, since the addition of ethanol to water generates heat and as a consequence precise temperature control is required [2–4]. Ethanol precipitation is a promising technique that can be applied to other types of proteins on an industrial scale [5–7]. Ethanol, used as the precipitant agent in this work, is by far the most important of the solvents, owing to its good physicochemical properties, such as complete miscibility with water, good freezing-point depression, absence of explosive mixtures, high volatility, chemical inertness, low toxicity and low cost (especially in Brazil).

Xylans are major components of the hemicellulosic fraction of lignocellulosic biomass and their hydrolysis can be obtained using xylanases [8]. The enzyme complex is composed of endoxylanases, which cleave internal xylosidic linkages on the xylan backbone, and β -xylosidase, which releases xylosyl residues by endwise attack of xylo-oligosaccharides [8,9]. The principal industrial application of this enzyme complex is in kraft pulp bleaching [10]. Xylanases produced by *Penicillium janthinellum* can be used to reduce the chlorine charge in *Eucalyptus* pulp bleaching with a simultaneous gain in brightness [11]. According to the literature, ethanol has been used in xylanase precipitations exclusively for laboratory and qualitative applications [12–17]. The present study was carried out to separate β -xylosidase from the xylanolytic complex and from the total protein present in the fermented medium using fractional ethanol precipitation in order to better characterize the medium obtained after cultivation of the fungus. In addition, the selective separation of the xylanolytic enzymes can favour the hemicellulose hydrolysis, since this process can later be performed in two stages using the most appropriate conditions for each enzyme.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Birchwood 4-*O*-methyl- β -D-glucoroxylan (90% xylose) was obtained from Sigma (St. Louis, MO). All the other chemicals were of analytical grade.

2.2. Preparation of sugar cane bagasse acid hydrolysate

In order to prepare the hydrolysate for cultivation, 800 g of dry milled bagasse was mixed with 8 l of sulphuric acid solution (0.25%) and autoclaved for 45 min at 121°C. The liquid fraction was separated by filtration and the pH adjusted to 5.5 with NaOH.

2.3. Cultivation medium and enzyme production

The isolation of *P. janthinellum* from the decaying wood was described by Milagres [18]. This microorganism was identified by the Biosystematic Research Center of Canada and deposited in their collection under the designation of CRC 87M-115. The strain was initially stored in silica and then transferred to agar slants. The fungus was cultivated at 30°C for 5 days in medium containing 1% glucose, 0.1% yeast extract, 2% (v/v) concentrated salt solution based on Vogel's medium [19] and 2% agar-agar. The medium was sterilized at 121°C for 15 min. The spore inocula were obtained by suspending the spores in water and filtering through gauze placed on Erlenmeyer flasks. The final concentration of spores was 10^5 /ml. The cultivation medium for enzyme production consisted of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate supplemented with 2% (v/v) concentrated salt solution based on Vogel's medium and 0.1% yeast extract. The medium was autoclaved for 15 min at 121°C. The cultivation was carried out for 96 h in Erlenmeyer flasks (125 ml) containing 25 ml of medium at 30°C and initial pH 5.5 (uncontrolled).

2.4. Enzyme activities and protein determination

Extracellular xylanase activities were determined by incubating 0.1 ml of diluted culture filtrate with 0.9 ml of a 'Birchwood' xylan suspension (10.0 g/l) in 0.05 M phosphate buffer (pH 5.5) for 5 min at 50°C, according to the method described by Bailey et al. [20]. The reducing equivalents released were measured by a colorimetric assay [21] using xylose solution as a standard reference. Activity units were expressed as micromoles of reducing equivalents released per min at 50°C. β -Xylosidase activity was measured after determining the amount of *p*-nitrophenol released after enzyme action in a *p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside water solution [22]. The reaction medium containing 250 μ l of 2mM *p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside (in water) and 250 μ l of fermented medium at pH 5.5 (adjusted with 50 mM acetate buffer) was incubated at 50°C for 30 min. Adding 1 ml of 2 M sodium carbonate solution stopped the reaction. The absorbance of the released *p*-nitrophenol after the β -xylosidase action was measured spectrophotometrically at 400 nm and compared with a standard reference. Activity units were expressed as micromoles of *p*-nitrophenol/min per ml at 50°C.

The amount of total protein was determined according to the Coomassie blue method described by Bradford [23] using bovine serum albumin as a protein concentration standard.

2.5. Enzyme precipitation

The ethanol concentration values employed in the precipitation experiments were 20, 40, 60 and 80%. The pH of the precipitation medium was adjusted to 4.0 and 5.5 by adding 0.1 M acetate buffer, and to 7.0 by adding phosphate buffer. Ethanol was slowly added to the medium under agitation (200 rpm) and the medium was maintained at 4°C in a water bath (HETO, model CB15-25, Allerod). After the addition of ethanol, the agitation was stopped for 15 min and the mixture was centrifuged at $2400 \times g$ and 4°C for 15 min (Centrifuge Jouan Mod.1812, Saint Herblain). The pellet was dissolved using 0.05 M acetate buffer (pH 5.5) at room temperature ($\sim 25^\circ\text{C}$). The total protein contents in the pellet and in the initial sample were determined in triplicate. Enzymic activities were determined only in the redissolved pellet and in the initial sample, since the ethanol present in the supernatant could interfere with the methodology. Fractional precipitation was performed in three steps in a beaker with 0.10M acetate buffer (pH 4.6) at 4°C. The ethanol concentration was 20% in the first step, 60% in the second step and 80% in the third step. All precipitation experiments were performed in triplicate.

2.6. Precipitation with trichloroacetic acid

A sample containing the enzymes was supplemented with 10% trichloroacetic acid (TCA) at $\sim 3^\circ\text{C}$. After 1 h the sample was centrifuged at $12\,000 \times g$ for 15 min at the same temperature. The pellet was washed using acetone at -20°C and centrifuged again as described above. The pellet was redissolved in 0.4 ml of NaOH solution (0.1 M). This method was used to concentrate the proteins before the electrophoresis.

2.7. Molecular weight estimation

The molecular weights of the proteins were estimated by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis, as described by Weber et al. [24].

2.8. Electrical conductivity

Electrical conductivities were measured by using a benchtop conductivity meter (Model HI8829, Hanna, St. Louis, MO, USA).

2.9. Kinetic parameters of β -xylosidase

The β -xylosidase activities of the fermented and precipitated media were assayed using pNpX concentrations ranging from 0.1 to 20 mM. The Michaelis–Menten constant (K_M) and maximal reaction velocity (V_m) were determined from simple Lineweaver–Burk plots.

3. Results and discussion

The influences of four different pH values (4.6, 5.9, 6.3 and 7.0) on total xylanase and β -xylosidase precipitations employing ethanol concentrations of 20, 40, 60 and 80% are shown in Fig. 1. Some differences in solubility between total xylanase and β -xylosidase can be observed. The highest β -xylosidase recovery yield and the highest total xylanase yield were achieved with ethanol concentrations of 60 and 80%, respectively. This can be explained by the differences in molecular weight between the precipitated enzymes. According to Scopes [2], the higher the molecular weight the lower the ethanol concentration necessary for precipitation. β -xylosidases, which are enzymes with molecular weights ranging from 60 to 360 kDa [25], are bigger than other xylanases (mainly endoxylanases), whose molecular weight is around 25 kDa [26]. In precipitations performed with ethanol at concentrations varying from 20 to 60%, the total xylanases remained in the supernatant phase. This was also observed by Rogalski et al. [27] in experiments conducted with xylanases from *Aspergillus terreus*. The ethanol precipitation of total xylanase and β -xylosidase (Fig. 1) was independent of the pH value for ethanol concentrations below 40%. At 60% ethanol concentration a slight decrease in the xylanase solubility was observed, and at 80% ethanol concentration almost 100% of the total xylanase was precipitated. At pH 4.6 and 7.0 about 85% of the total xylanase was recovered, whereas at pH 5.9 and 6.3 about 95% of the total xylanase was recovered. On the other hand, 80% of the β -xylosidase was precipitated at 40% ethanol concentration. At pH 5.9 and 6.3 the β -xylosidase recovery yield were slightly higher than at pH 4.6 and 7.0.

Fig. 1. Recovery (%) of total xylanase at pH 4.6 (-□-); 5.9 (-△-); 6.3 (-◇-); and 7.0 (-◇-) and β -xylosidase at pH 4.6 (-■-); 5.9 (-▲-); 6.3 (-●-) and 7.0 (-◆-) by ethanol precipitation.

Fig. 2. Recovery of total protein by ethanol precipitation at pH 4.6 (■); 5.9 (□); 6.3 (●) and 7.0 (○).

Fig. 2 shows the total protein precipitation behaviour as a function of pH. As can be seen, the total protein precipitation profiles were very similar at pH 5.9, 6.3 and 7.0. However, at pH 4.6 and 20% ethanol concentration, around 80% of the total protein content (determined according to Bradford) was precipitated. Therefore, pH 4.6 was chosen for fractional precipitation of β -xylosidase, since 80% of the total protein could be removed without loss of β -xylosidase and total xylanase activities. The influence of the pH on protein precipitation is well known, since at the isoelectric point (pI) the net charge of this molecule is zero. However, in this work, the pH showed very little influence on the precipitation yield, probably owing to the pH changes resulting from the addition of ethanol to the medium (Table 1). These changes ranged from 0.3 (with 20% ethanol) to 1.9 units (with 80% ethanol). So, for instance, the precipitations at pH 4.6 were, in fact, performed at pH 6.5. Therefore, it was not possible to optimize the precipitations using the isoelectric point of the enzymes.

The results of the fractional precipitation are shown in Table 2. At 20% ethanol concentration, 8% of β -xylosidase was precipitated (10% loss), while at 60% ethanol concentration, 74% of the enzyme and 7% of the total xylanases were precipitated. In the first two precipitation steps (20% and 60% ethanol), the redissolved medium containing precipitated β -xylosidase had lower electrical conductivity (3 mS/cm) than the initial medium (13 mS/cm). The conductivity decrease is a great advantage, since the purification process of biotechnological products is, in general, more successful when low ionic strength is employed [28,29]. In the third step (80% ethanol), about 80% of the total xylanase was precipitated. This fraction had low β -xylosidase activity (6% of the initial activity).

Fig. 3 shows the electrophoretic profiles of the proteins present in the culture medium before and after the precipitations. Line 2 shows the profile of the

Table 1
Influence of ethanol on pH value of the *Penicillium janthinellum* fermented medium

Initial pH	Added ethanol (%)	pH after ethanol addition
4.6	20	4.8
5.9		6.2
6.3		6.6
7.0		7.3
4.6	60	5.7
5.9		6.9
6.3		7.3
7.0		7.9
4.6	80	6.4
5.9		7.3
6.3		7.6
7.0		8.5

Table 2
Recovery of the total xylanases and β -xylosidase after fractional ethanol precipitation

Sample	Activity (U)	Recovery (%)
β-xylosidase		
Initial	2.8	—
20% ethanol	0.2	8.0
60% ethanol	2.1	74.0
80% ethanol	0.2	6.0
Total recovered activity	2.5	
Loss (%)	10.7	
Xylanase		
Initial	433.4	—
20% ethanol	25.7	6
60% ethanol	29.4	7
80% ethanol	351.5	81
Total recovered activity	406.6	
Loss (%)	6.2

Fig. 3. Polyacrylamide gel electrophoresis: molecular weight standards of 66, 45, 36, 29, 24, and 20.1 kDa (line 1); molecular weight standards of 116, 97.4, 66, 45 and 29 kDa (line 2); initial culture medium (line 3), precipitate with ethanol 20% (line 4), precipitate with ethanol 60% (line 5) and precipitate with 80% (line 6).

proteins present in the initial culture medium. Line 3 indicates no presence of protein after precipitation with 20% ethanol. Line 4 shows that the precipitate obtained with the addition of ethanol (final concentration at 60%) was able to selectively separate from the initial medium the proteins with molecular weight in the range between 100 and 110 kDa. The enzyme activity in this precipitate suggests that the only protein present was β -xylosidase. Line 5 shows the presence of proteins with molecular weight around 20 kDa and the enzyme activity suggests the presence of endo-xylanases [26].

3.1. Kinetic parameters

The effects of substrate concentration on β -xylosidase activity were assayed at various initial pNpX concentrations (0.1–20 mM) (Figs. 4 and 5). The Michaelis constants, K_M and V_m , calculated from Lineweaver-Burk plots were, respectively, 1.07 mM and 0.37 U/ml for the enzyme present in the fermented medium, and 1.03 mM and 0.38 U/ml for the precipitated enzyme (with 20 and 60% ethanol) (Table 3). These values indicate that the separation process by ethanol precipitation protect the kinetic characteristics of the β -xylosidase enzyme. In addition, these values are in the same range as those reported by several authors [30,22].

4. Conclusions

The results attained in this work (74% of β -xylosidase and 80% of total xylanase recovery) reveal that ethanol fractional precipitation is an appropriate technique for the purification of enzymes produced by *Penicillium janthinellum* from sugar cane bagasse. This technique does not affect the kinetic characteristic of the enzyme and provides a solution with low ionic strength, which is desirable for further purification steps [25].

Acknowledgements

E.V. Cortez acknowledges the financial support of CAPES and FAPESP/Brazil and thanks Maria Eunice Machado Coelho for revising this text.

Fig. 4. Effect of pNpX (substrate) concentration on β -xylosidase reaction rate: initial culture medium (—■—) and precipitate (—□—).

Fig. 5. Lineweaver-Burk plot (linearization) for the determination of the kinetic parameters of β -xylosidase: initial culture medium ($\diamond$) and precipitate ($\blacksquare$).

Table 3
Kinetic parameters of β -xylosidase presente in the fermented medium and in the precipitate obtained with 20 and 60% ethanol

Enzyme	K_M (mM)	V_m (U/ml)
Fermented medium	1.07	0.35
Precipitate	1.03	0.38

References

- [1] Glatz CE. Precipitation. In: Asenjo JA, editor. Separation Processes in Biotechnology. New York: Marcel Dekker, 1990.
- [2] Scopes RK. Protein Purification. New York: Springer-Verlag, 1982.
- [3] Wang DIC, Cooney CL, Demain AL, Dunnill P, Humphrey AE, Lilly MD. Fermentation and Enzyme Technology. New York: Wiley, 1979.
- [4] Harrison RG. Protein Purification Process Engineering. New York: Marcel Dekker, 1993.
- [5] Tsuchihashi M. Production and purification of extracellular D-xylose isomerase from an aliphatic, thermophilic *Bacillus* sp. Biochemistry 1923;140:63.
- [6] Bonnichsen RK. A comparative study of the blood and liver catalases from the horse. Arch Biochem 1947;12:83–94.
- [7] Gonçalves VM, 1997. Purificação de catalase a partir de placenta humane. M.Sc Thesis, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil, 1997.
- [8] Biely P. Microbial xylanolytic systems. Trends Biotechnol 1985;3:286–90.
- [9] Wong KKY, Tan LUL, Saddler JN. Multiplicity of β -1,4 xylanase in microorganisms; functions, properties and applications. Microbiol Rev 1988;52:305–17.
- [10] Palma MB, Milagres AMF, Prata AMR, Mancilha IM. Influence of aeration and agitation rate on the xylanase activity from *Penicillium janthinellum*. Process Biochem 1996;31:141–5.
- [11] Duran N, Milagres AMF, Sposito E, Haun M. Xylanase delignification in traditional and chlorine-free bleaching sequences in hardwood kraft pulps. In: Saddler, J.N., Penner, M.H. ACS Symp. Series. Ch. 21, 1995;332–338.
- [12] He L, Bickerstaff GF, Paterson A, Buswell JA. Zur Kenntnis der blutkatalase. Enzyme Microbiol Technol 1993;15:13–8.
- [13] Grabski AC, Jeffries TW. Purification and partial characterization of two xylanases that differ in hydrolysis of soluble and insoluble xylan fractions. Appl Environ Microbiol 1991;57:987–92.
- [14] Chauthaiwale J, Rao M. Production, purification and characterization of Beta-(1,4)-endoxylanase of streptomyces noseisclerotici. Appl Environ Microbiol 1994;60:4495–9.
- [15] Kubata BK, Suzuki T, Horitsu H, Kawai K, Takamizawa K. Purification and characterization of *Aeromonas carriae* ME-1 which produces xylo-tetraose as the only low-molecular-weight digosaccharide from xylan. Appl Environ Microbiol 1994;60:531–5.
- [16] El-Helw ER, El-Gazaerly MA. *Bacillus subtilis* α -amylase, lichenase, β -mannanase and xylanase: screening for their induction by agro-industrial byproducts and precipitation by organic solvents. J Basic Microbiol 1996;36:75–81.
- [17] Kang MK, Maeng PJ, Rhee YH. Purification and characterization of two xylanases from alkalophilic cephalosporium sp. strain RYM-202. Appl Environ Microbiol 1996;62(9):3480–2.
- [18] Milagres AMF. Alguns aspectos da regulação de β -xilanases extracelulares de *Penicillium janthinellum*. Master of Science Thesis, Federal University of Viçosa, Viçosa, Brazil, 1988.
- [19] Vogel HJ. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). Microbiol Genet Bull 1956;13:42–3.
- [20] Bailey MJ, Biely P, Poutanen K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. J Biotechnol 1992;23:257–71.
- [21] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem 1959;31:426–38.
- [22] Kumar S, Ramon D. Purification and regulation of the synthesis of a β -xylosidase from *Aspergillus nidulans*. FEMS Microbiol Lett 1996;135:287–93.
- [23] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248–54.

- [24] Weber K, Pringle JR, Osborn M. Measurement of molecular weights by eletrophoresis on SDS-acrylamide gel. *Methods Enzymol* 1972;3:26–7.
- [25] Sunna A, Antranikian G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit Rev Biotechnol* 1997;17(1):39–67.
- [26] Rodrigues EMG. Extracao liquido-liquido de xilanase por micela reverse. Lorena. Master of Science Thesis, Faculty of Chemical Engineering, Lorena, Brazil, 1997.
- [27] Rogalski J, Szczodrak J, Ilczuk Z. Cellulolytic activity of moulds 11. Various methods of precipitating and concentrating enzymes and their influence on the activity of cellulolytic preparation and xylanase of *Aspergillus terreus* F-413. *Acta Microbiol Polonica* 1983;32(4):363–72.
- [28] Pessoa A Jr, Vitolo M. Separation of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using reversed micellar extration. *Biotechnol Tech* 1996;11:421–2.
- [29] Pessoa Jr A, Vitolo M. Recovery of inulinase using BDBAC reversed micelles. *Process Biochem* 1998;33(3):291–7.
- [30] Ristroph DL, Humphrey AE. The β -xylosidase of *Thermomonospora*. *Biotechnol Bioeng* 1985;27:909–13.

Copyright © 2001 by Humana Press Inc.
All rights of any nature whatsoever reserved.
0273-2289/01/91-93/0001/\$12.25

Effect of Agitation and Aeration on Production of Hexokinase by *Saccharomyces cerevisiae*

<Au: Pls.
proofread
carefully.

D. P. SILVA,¹ A. PESSOA, JR.,¹ I. C. ROBERTO,²
AND M. VITOLO*,¹

<Au: Pls.
spell out
first names.

¹Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology,
Faculty of Pharmacy, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes,
580, B.16. 05508-900, São Paulo/SP, Brazil, E-mail: michenzi@usp.br;
and ²DEBIQ-FAENQUIL, Lorena/SP, Brazil

Abstract

A batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of hexokinase was carried out in a 5-L fermentor containing 3 L of culture medium, which was inoculated with cell suspension (about 0.7 g/L), and left fermenting at 35°C and pH 4.0. The aeration and agitation were adjusted to attain k_La values of 15, 60, 135, and 230 h⁻¹. The highest hexokinase productivity (754.6 U/[L·h]) and substrate-cell conversion yield (0.21 g/g) occurred for a k_La of 60 h⁻¹. Moreover, the formation of hexokinase and cell growth are coupled events, which is in accordance with the constitutive character of this enzyme. Hexokinase formation for $k_La > 60$ h⁻¹ was not enhanced probably owing to saturation of the respiratory pathway by oxygen.

Index Entries: Hexokinase; *Saccharomyces cerevisiae*; agitation and aeration; fermentation; volumetric coefficient of oxygen transfer.

Introduction

Hexokinase (EC 2.7.1.1) is the first enzyme of glycolysis that catalyzes the phosphorylation of glucose into glucose 6-phosphate (G6P). The G6P, in turn, is a key intermediate for several pathways such as gluconeogenesis, shunt of pentoses, and glycogen metabolism. This enzyme is sensitive to the catabolic repression and has a role in the glucose uptake mechanism through the plasma membrane (1).

Hexokinase, besides its role in the cell metabolism and importance to biochemical studies, is used in analytical methods to measure glucose, fructose, mannose, adenosine triphosphate (ATP), and creatin-kinase activity

*Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed.

(2); in the phosphorylation of pyranose and furanose analogs of glucose (3); and in the wine and fruit juice industries for the detection of illegal sugar addition to the final products (4).

Because hexokinase is a constitutive enzyme in all living cells, its production from a microorganism is linked to the amount of biomass obtained through a fermentative process. However, attaining a high amount of cells depends on the pH, temperature, components of the culture medium, and the availability of oxygen to the cells (5). For a facultative microorganism such as *Saccharomyces cerevisiae*, oxygen has a crucial role in its overall metabolism, because it participates in the generation of energy, through the respiratory chain inside mitochondria, which is fundamental for attaining a significant specific growth rate. According to Gregory et al. (6), there is a strong correlation among specific growth rate, oxygen transfer rate, and hexokinase production rate in yeasts. Although hexokinase could be attained from several microbial species, in Brazil, the use of *S. cerevisiae* as a source of this enzyme and other products (7) is practical owing to the large experience in handling this strain in industrial plants. In addition, coupling the yeast processing with the ethanol production probably should have a positive effect on distillery profits.

The present study deals with the influence of oxygen transfer rate, expressed as k_La (volumetric coefficient of oxygen transfer), on the production of hexokinase by *S. cerevisiae*.

Materials and Methods

Chemicals

Glucose 6-phosphate dehydrogenase, ATP, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), β -mercaptoethanol, G6P, glucose, and sucrose were obtained from Sigma (St. Louis, MO). Yeast extract and peptone were obtained from Difco (Detroit, MI). All other chemicals were of analytical grade.

Preparation of Inoculum

S. cerevisiae (isolated from pressed yeast cake) was maintained at 4°C in agar slant tubes containing 23.0 g/L of nutrient agar (Difco) and 1.0 g/L of glucose. The cells were transferred to 250-mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of autoclaved (121°C for 15 min) growth medium, and the culture was carried out in a shaker (New Brunswick, Edison, NJ) for 11 h at 35°C, agitation of 175 rpm, and initial pH of 4.5 (adjusted with 0.5 M H_2SO_4 or 0.1 M NaOH). The growth medium composition was as follows: 3.8 g/L of glucose, 28.5 g/L of sucrose, 3.0 g/L of yeast extract, 5.0 g/L of peptone, 2.4 g/L of $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 0.075 g/L of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, and 5.1 g/L of $(NH_4)_2SO_4$.

Batch Fermentation

A volume of 0.45 L of inoculum (about 4.7 g of dry mass/L) was poured into a 5-L fermentor (NBS-MF 105, coupled with NBS dissolved oxygen

>Au: Pls.
 provide a
 running
 head of 40
 characters
 or fewer.

Short Chapter Title

3

>Au: Pls.
 give g force.

controller, DO-81; New Brunswick) containing 2.55 L of the culture medium: 3.0 g/L of yeast extract, 5.0 g/L of peptone, 20.0 g/L of glucose, 2.4 g/L of $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.075 g/L of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, and 5.1 g/L of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. The fermentation was carried out at 35°C and pH 4.0 (controlled automatically by adding 0.5 M H_2SO_4 or 0.1 M NaOH), and agitation and aeration were automatically adjusted to attain an initial $k_L a$ of 15 h⁻¹ (0.7 vvm and 200 rpm), 60 h⁻¹ (1.7 vvm and 400 rpm), 135 h⁻¹ (2.3 vvm and 600 rpm), and 230 h⁻¹ (2.3 vvm and 800 rpm). The pair agitation/aeration related to a desired initial $k_L a$ was fixed against distilled water and evaluated by using a dissolved oxygen controller (NBS-DO81; New Brunswick) associated with a galvanic dissolved oxygen probe (Mettler-Toledo, São Paulo, SP, Brazil). The initial $k_L a$ was calculated through the conventional Pirt's mathematical model (8). To control the foam, a 10% (w/w) aqueous silicone emulsion (Dow Corning, FG-10; New York) was added dropwise. Samples were collected periodically to follow the variation in cell, glucose, and ethanol concentrations as well as hexokinase activity (after cell disruption).

<Au: Pls.
 give g force.

Measurement of Cell, Glucose, and Ethanol Concentrations

One milliliter of fermenting medium was centrifuged (8.720 g for 10 min) and the supernatant discharged. Then, the cell cake was suspended in 50 mL of distilled water and the turbidity was measured with a spectrophotometer at 600 nm (Perkin-Elmer 552; Bethesda, MD). The cell concentration was obtained by comparing the optical density (OD) of cell suspension against a standard OD × dry cell mass curve.

Ten milliliters of fermenting medium was centrifuged (2.880 g for 10 min). The cell cake was stored at 4°C until submitted to disruption. In the supernatant, the glucose and ethanol concentrations were measured using a GOD/POD enzymatic kit (kit no. 02200; Laborlab, Guarulhos, São Paulo, SP, Brazil) and the reducing dichromate back-titration method (9), respectively.

Measurement of Hexokinase Activity

The cell cake was suspended in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 5 mM MgCl_2 , 10 mM β-mercaptoethanol, 2 mM aminocaproic acid, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 0.2 mM EDTA. Then, the cells were disrupted by submission to a vortex (Phoenix AP 56; São Paulo, SP, Brazil) in the presence of glass beads (diameter = 0.5 mm), and the mixture was maintained below 10°C all the time. The wet cell cake, glass beads, and Tris-HCl buffer were always mixed in a volumetric proportion of 1:1:1. Cell debris and glass beads were removed by centrifugation (2.880 g for 10 min) and the supernatant was collected. The hexokinase activity in the supernatant was measured through the continuous reduction of NADP at 30°C in a spectrophotometer ($\lambda = 340 \text{ nm}$) as described by Bergmeyer (2). One hexokinase unit was defined as the amount of enzyme catalyzing the reduction of 1 μmol of NADP/min under the assay conditions. Each determination

was made in triplicate and the standard deviation was 2%. No significant decrease in hexokinase activity was detected after storing the supernatant for 5 h on ice at room temperature.

Hexokinase production was calculated using the following equation:

$$P = (v/X_e) \times X \quad (1)$$

in which P = concentration of hexokinase ($\text{U/L}_{\text{medium}}$); v = hexokinase activity in the supernatant (U/mL); X_e = cell concentration in the suspension submitted to disruption ($\text{g}_{\text{cell}}/\text{mL}$); and X = cell concentration in the fermenting medium ($\text{g}_{\text{cell}}/\text{L}_{\text{medium}}$).

Calculation of Kinetic Parameters

The specific cell growth rate (μ_x), specific substrate consumption rate (μ_s), and specific hexokinase production rate (q_p) were defined as follows:

$$\mu_x = (1/X) \times dX/dt \quad (2)$$

$$\mu_s = (1/X) \times dS/dt \quad (3)$$

$$q_p = (1/X) \times dP/dt \quad (4)$$

The derivatives dX/dt , dS/dt , and dP/dt were calculated according to the method proposed by Le Duy and Zajic (10). The substrate-to-cell conversion factor ($Y_{X/S}$) and the substrate-to-hexokinase conversion factor ($Y_{HK/S}$) were calculated as the inclination obtained between the variation in cell concentration (ΔX) or hexokinase production (ΔP) to the glucose consumed (ΔS), respectively. The maximum enzyme (Pr_{HK}) and cell (Pr_X) productivities were calculated, respectively, as $\Delta P/\Delta t$ and $\Delta X/\Delta t$, in which Δt = interval of cultivation time.

Results and Discussion

From Fig. 1 we clearly observe that the $k_L a$ affected the hexokinase activity produced by the yeast. The highest hexokinase concentration, which was about $4.200 \text{ U/L}_{\text{medium}}$, occurred at a $k_L a$ of 60 h^{-1} after 7 h of fermentation. At this point, all glucose was consumed and the cell concentration was equal to 4.61 g/L (Figs. 2 and 3).

Nevertheless, at the extreme values of $k_L a$ employed (15 and 230 h^{-1}), the glucose concentration in the medium became negligible after 11 and 7 h, respectively (Fig. 2). Furthermore, the hexokinase concentration and cell concentration were markedly low for a $k_L a$ of 15 h^{-1} compared with any other $k_L a$ employed (Figs. 1 and 3). This result indicates that glucose consumption and hexokinase and cell production are coupled events and strongly depend on the aeration/agitation of the medium. In the present case, we can assume that the $k_L a$ of 60 h^{-1} guaranteed an adequate amount of dissolved oxygen in the medium to fine-tune the metabolic pathways related to growth and glucose conversion. This fact is clearly noted through

Fig. 1

Figs. 2
and 3

Fig. 1. HK production against time for *S. cerevisiae* grown under different k_La (h^{-1}) values: 15 (□), 60 (■), 135 (○), and 230 (●).

Fig. 2. Variation in glucose concentration against time for *S. cerevisiae* grown under different k_La (h^{-1}) values: 15 (□), 60 (■), 135 (○), and 230 (●).

the production parameters shown in Table 1, which at a k_La of 60 h^{-1} , $Y_{X/S}$ (0.21), $Y_{HK/S}$ ($221.5 \text{ U/g}_{\text{glu}}$), Pr_X ($0.69 \text{ g}_{\text{cell}}/[\text{L}\cdot\text{h}]$), and Pr_{HK} ($754.6 \text{ U}/[\text{L}\cdot\text{h}]$) were the highest values attained. In addition, for this k_La the generation time (t_g), calculated as proposed by Borzani (11), was the lowest and equal to 1.8 h (Table 1).

Table
1

Fig. 3. Variation in cell concentration against time for *S. cerevisiae* grown under different k_La (h^{-1}) values: 15 ($\square$), 60 ($\blacksquare$), 135 ($\circ$), and 230 ($\bullet$).

Table 1
Generation Time (t_g), Glucose-to-Cell Conversion Factor ($Y_{x/s}$),
Glucose-to-Hexokinase Conversion Factor ($Y_{HK/s}$), and Maximum Cell (Pr_x)
and Hexokinase (Pr_{HK}) Productivities Related to Batch Fermentation
of *S. cerevisiae* Conducted at Different k_La Values

Parameter	k_La (h^{-1})			
	15	60	135	230
t_g (h)	4.3	1.8	1.8	2.5
$Y_{x/s}$ (g_{cell}/g_{glu})	0.14	0.21	0.21	0.19
$Y_{HK/s}$ (U/g_{glu})	82.8	221.5	192.9	175.8
Pr_x ($g_{cell}/[L \cdot h]$)	0.24	0.69	0.69	0.49
Pr_{HK} ($U/[L \cdot h]$)	300.5	754.6	647.0	445.7

From Table 1 it can also be seen that the parameters related to growth (t_g , $Y_{x/s}$, and Pr_x) had the same values for either a k_La of 60 or 135 h^{-1} , whereas the hexokinase related parameters ($Y_{HK/s}$ and Pr_{HK}) differed about 15% at those k_La values. Most likely, for high k_La the intracellular ATP concentration is so high that it becomes an inhibitor of hexokinase biosynthesis (12), although such a condition should favor cell growth. Values of k_La higher than 135 h^{-1} did not enhance cell growth owing probably to saturation of the respiratory pathway by oxygen.

It must be borne out that in all the experiments cell growth continued even when all the glucose initially present in the mash was consumed (Fig. 3).

<Au: OK?

Fig. 4. Variation against time of glucose (○), cell (Δ), and ethanol (□) concentrations for *S. cerevisiae* grown at a $k_L a$ of 60 h^{-1} .

This can easily be understood if we consider that after glucose consumption another substance becomes a substrate to the yeast. In this case, a probable one should be ethanol, which accumulates into the medium because glucose has been taken up by the yeast (Fig. 4). According to Rose and Harrison (13) and Rehm and Reed (14), the production of ethanol by *S. cerevisiae*, even under high aeration, is a characteristic of this specie of yeast. In other words, the Pasteur effect does not occur plentifully in *S. cerevisiae*.

Because hexokinase is a constitutive and growth-related enzyme, a viable process for its production would be a steady-state continuous culture, as already stated for other enzymes with the same characteristics, such as invertase (15). In this case, according to Doin (16), an estimation of the more suitable dilution rate (D) for the continuous process must be made from the data attained in batch. This can be accomplished by plotting the variation in growth rate (dX/dt) vs cell concentration (X) (Fig. 5). By setting 7 h of batch fermentation, as the period in which the highest hexokinase production was attained (Fig. 1), the correspondent cell concentration was 4.61 g/L ($k_L a = 60 \text{ h}^{-1}$). According to Doin (16), the angular coefficient of the line drawn between the points (0, 0) and (4.61, 0.38) would be a reasonable estimation of D , which in this case should be about 0.08 h^{-1} . Of course, to produce hexokinase by direct extraction from residual distillery yeast is also an open opportunity for ethanol-producing countries (e.g., Brazil).

In short, to understand the data presented, we must take into account that the dependence of hexokinase on the availability of oxygen and cell growth derives from the fact that it is a constitutive-type enzyme as well as

>Au: OK?

Fig. 4

Fig. 5

Fig. 5. Growth rate (dX/dt) vs cell concentration (X) for estimating the dilution rate (D) for a steady-state continuous culture based on the data obtained from a discontinuous culture carried out at an initial $k_L a$ of 60 h^{-1} .

Fig. 6. Variation in HK specific production rate (q_p) against specific growth rate (μ_x) for *S. cerevisiae* grown under different $k_L a$ (h^{-1}) values: 15 ($\square$), 60 ($\blacksquare$), 135 ($\circ$), and 230 ($\bullet$).

the G6P, the product of the hexokinase-catalyzed reaction, which is converted either in pyruvate (glycolysis pathway) or in 6-phosphogluconolactone (6PL). The pyruvate is mainly directed to ATP generation (through

Krebs cycle and phosphorylative oxidation, both depending on oxygen), and 6PL is converted through the pentose pathway in sugars intimately related to growth and intracellular metabolism. However, a fraction of pyruvate is diverted to ethanol, which avoids the quantification of the correlation between the formation of hexokinase and cell growth by methods such as those of Luedeking and Piret (17) and Moser (18). Figure 6, in which are plotted the data of all tests realized, shows a large points dispersion, an indication of the formation of at least one byproduct other than cells.

Fig. 6

Conclusion

The data presented lead to two main conclusions. First, the high formation of hexokinase by *S. cerevisiae* occurred at a k_{La} of 60 h^{-1} after 7 h of batch culture. Second, because the formation of hexokinase is related to cell growth, a perspective should be to produce the enzyme through a continuous culture at a dilution rate of 0.08 h^{-1} , as estimated from the batch process.

Acknowledgments

We wish to thank Prof. Dr. José Abrahão Neto for valuable suggestions. D.P.S. acknowledges the financial support of FAPESP/São Paulo, Brazil, in the form of a Master of Science fellowship.

References

1. Kovak, L., Nelson, B. D., and Ernster, L. (1986), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **134**(1), 285–291.
2. Bergmeyer, H. U. (1984), *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd ed., Verlag Chemie, Weinheim, Germany.
3. Chenault, H. K., Mandes, R. F., and Hornberger, K. R. (1997), *J. Org. Chem.* **62**, 331–336.
4. Whitaker, J. R. (1991), *Food Enzymology*, Elsevier Applied Science, New York.
5. White, J. (1954), *Yeast Technology*, Chapman & Hall, London.
6. Gregory, M. E., Bulmer, M., and Bogle, I. D. L. (1996), *Bioproc. Eng.* **15**(5), 237–245.
7. Godfrey, T. and West, S. (1996), *Industrial Enzymology*, 2nd ed., MacMillan, London.
8. Wise, W. S. (1951), *J. Gen. Microbiol.* **5**, 167–177.
9. Joslyn, M. A. (1970), *Methods in Food Analysis*, 2nd ed., Academic, New York.
10. Le Duy, A. and Zajic, E. J. (1973), *Biotechnol. Bioeng.* **15**, 805–810.
11. Borzani, W. (1975), in *Engenharia Bioquímica*, vol. 3, Borzani, W., Lima, U. A., and Aquarone, E., eds., Universidade de São Paulo, São Paulo, pp. 168–184.
12. Garrett, R. H. and Grisham, C. M. (1995), *Biochemistry*, Saunders College Publishing, San Diego.
13. Rose, A. H. and Harrison, J. S. (1989), *The Yeasts*, 2nd ed., Academic, New York.
14. Rehm, H. J. and Reed, G. (1993), *Biotechnology*, 2nd ed., VCH, Weinheim, Germany.
15. Vitolo, M., Vairo, M. L. R., and Borzani, W. (1985), *Biotechnol. Bioeng.* **27**, 1229–1235.
16. Doin, P. A. (1975), in *Engenharia Bioquímica*, vol. 3, Borzani, W., Lima, U. A., and Aquarone, E., eds., Universidade de São Paulo, São Paulo, pp. 112–134.
17. Luedeking, R. and Piret, E. L. (1959), *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.* **1**, 393–401.
18. Moser, A. (1985), in *Biotechnology: Fundamentals of Biochemical Engineering*, vol. 2, Rehm, H. J. and Reed, G., eds., VCH, Weinheim, Germany.

Job: ABAB 2001 Symposium
Chapter: 2-26/Lojudice
Pub Date: 3/01

Operator: KB
Date: 1/01
Revision: 1st gal/paging

Copyright © 2001 by Humana Press Inc.
All rights of any nature whatsoever reserved.
0273-2289/01/91-93/0001/\$12.25

Overexpression of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in Genetically Modified *Saccharomyces cerevisiae*

<Au: Pls.
proofread
carefully.

FERNANDO H. LOJUDICE,¹ DANIEL P. SILVA,²
NILSON I. T. ZANCHIN,¹ CARLA C. OLIVEIRA,¹
AND ADALBERTO PESSOA JR.*²

¹Department of Biochemistry, Chemistry Institute
and ²Biochemical and Pharmaceutical Technology Department/FCF/
University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580/B16, 05508-900,
São Paulo, SP, Brazil, E-mail: pessoajr@usp.br

Abstract

Glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) (EC 1.1.1.49) is an abundant enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. This enzyme presents great interest as an analytical reagent because it is used in many quantitative assays. A strain of *S. cerevisiae* was genetically modified to improve G6PD production during aerobic culture. The modifications are based on cloning the G6PD sequence under the control of promoters that are upregulated by the carbon source used for yeast growth. The plasmids containing the G6PD coding sequence increased G6PD production up to 14-fold.

<Au:
Can you
lengthen
abstract to
100-200
words?

Index Entries: Glucose 6-phosphate dehydrogenase; *Saccharomyces cerevisiae*; aerobic culture; molecular biology.

Introduction

Glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) (EC 1.1.1.49), which is an abundant enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*, is the first enzyme of the pentose phosphate pathway and shows a wide distribution in nature, being found in almost all animal tissues and microorganisms. This enzyme presents great interest as an analytical reagent because it is used in many quantitative assays, including the measurement of hexokinase and creatine kinase activities, adenosine triphosphate and hexose concentration, and as a marker for enzyme immunoassays (1). The use of G6PD for measuring

<Au:
All genes
should be
italic. Pls.
check
throughout.

*Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed.

glucose in the presence of fructose constitutes an important tool for detecting illegal sugar addition in the final products of the wine and fruit juice industries. Thus, studies related to G6PD production by *S. cerevisiae* should become an important matter. This yeast has been demonstrated to be a very useful organism for the expression of various genes for protein purification and analysis, and for studies of control of gene expression.

As a eukaryotic organism, *S. cerevisiae* is a suitable host for high-level production of both secreted and soluble cytosolic proteins. Most vectors used to overexpress proteins in yeast are based on the multicopy 2 μ natural plasmid, but vectors containing centromeric regions that determine the presence of a single copy per cell have also been developed. These plasmids contain sequences for replication and selection in *Escherichia coli* and *S. cerevisiae*, as well as yeast promoters and terminators for transcription by RNA polymerase II (RNA pol II) (2). The *S. cerevisiae* phosphoglycerate kinase 1 (PGK1) gene encodes one of the most abundant mRNA and protein species in the cell, accounting for between 1 and 5% of the total cellular mRNA and protein (3). Therefore, the PGK1 promoter is an attractive option for obtaining high levels of protein expression. Sequences encoding proteins of interest have also been cloned under the control of the GAL1 promoter, which is one of the most powerful tightly regulated promoters of *S. cerevisiae* (4). Expression of the yeast GAL1 gene is undetectable in cells grown in the absence of galactose and is induced by more than 1000-fold when galactose becomes available (5,6). Fusion of different promoters has also been successfully used for expression of proteins in yeast, such as the GAL1-PGK1 fusion (7,8).

The present work is a comparative study of the overexpression of *S. cerevisiae* G6PD using genetically modified strains, which carry plasmid constructs containing the G6PD coding sequence under the control of the PGK1 and GAL1-PGK1 (GPF) promoters.

Materials and Methods

DNA Analysis Methods and Plasmid Construction

DNA cloning and electrophoresis analysis were performed as described by Sambrook et al. (9). Both the G6PD coding sequence and the PGK1 promoter were amplified from yeast genomic DNA by using polymerase chain reaction (PCR). Oligodeoxynucleotides that served as primers for PCR reactions were purchased from Bio-Synthesis (Lewisville, TX). The primers used to PCR-amplify the G6PD coding sequence were 5'ggctggatccacagaaagagtaa3' (GPD-Bam5'), and 5'gtgatctagacgataaatgaatg3' (GPD-Xba3'), which contain sites for the restriction enzymes *Bam*HI and *Xba*I, respectively (underlined). The primers used to PCR-amplify the PGK1 promoter were 5'caccctcgagctattatcagggc3' (PGK-Xho5'), and 5'aattggatccttgatgatctgta3' (PGK-Bam3'), which contain sites for the restriction enzymes *Xho*I and *Bam*HI, respectively. PCR amplification reactions were performed

Expression of G6PD in Modified S. cerevisiae

3

according to instructions provided by the supplier (Gibco-BRL). Vectors YCpSUPEX1 (8) and YEplac181 (10) were used to construct plasmids YCpGPF-G6PD and YEPPGK-G6PD, which were used for expression of G6PD in yeast.

Media, Yeast Strains, and Genetic Techniques

Different carbon sources were added to yeast extract/peptone medium (YP) and synthetic medium (YNB). YPD and YNB-Glu contained 2% of glucose and YNB-Gal contained 2% of galactose as the carbon source. Yeast strains were incubated at 30°C as described by Sherman et al. (11). *S. cerevisiae* W303-1a (MATa ade2-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 can1-100) was used as the host strain for the plasmids YCpGPF-G6PD and YEPPGK-G6PD. YCpGPF-G6PD contains the URA3 gene, which is a genetic marker for yeast. Cells carrying this plasmid (named W303/YCpGPF-G6PD) were grown in YNB-Glu/Gal medium, containing 2% glucose; 2% galactose; 20 µg/mL of adenine, histidine, and tryptophan; and 30 µg/mL of leucine. YEPPGK-G6PD plasmid contains the LEU2 genetic marker, allowing for the cells (W303/YEPPGK-G6PD) to grow in YNB-Glu medium, containing 20 µg/mL of adenine, uracil, histidine, and tryptophan. Plasmids were transformed into yeast cells by using the lithium acetate method, as described previously (11).

RNA Isolation

Total yeast RNA was isolated by using the hot phenol method (12) from 50-mL cultures. Briefly, cells were harvested by centrifugation, washed with cold water, and resuspended in 500 µL of 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0. Cells were lysed by vortexing, following the addition of 100 µL of 10% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.4 g of glass beads (0.4-mm diameter), and 1.0 mL of prewarmed (65°C) phenol. The aqueous phase was extracted with 1.0 mL of phenol-chloroform and precipitated with 1.5 mL of ethanol. RNA pellets were resuspended in 100 µL of diethylpyrocarbonate-treated water, and RNA concentration was determined by measuring the optical density (OD) at 260 nm.

<Au:
 followed
 by?

Northern Hybridization

RNA electrophoresis was performed as described by Sambrook et al. (9). Typically, a 30-µL sample was prepared by mixing 20 µg of total yeast RNA (up to 15 µL) with 6 M glyoxal (6 µL); DMSO (8 µL); and 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0 (3 µL). Samples were incubated at 50°C for 1 h and chilled on ice. Subsequently, 4 µL of stop solution (30% glycerol, 0.25% bromophenol blue, and 0.25% xylene cyanolFF) was added to the RNA samples, which were loaded onto a 1.3% agarose gel prepared with 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0. Following electrophoresis, the RNA was blotted onto nylon membranes (Hybond-N; Amersham) and crosslinked by ultra-

<Au: OK?

Job: ABAB 2001 Symposium
 Chapter: 2-26/Lojudice
 Pub Date: 3/01

Operator: KB
 Date: 1/01
 Revision: 1st gal/paging

4

Lojudice et al.

violet irradiation for 2 min (Ultra-Lum Electronic Dual Light Transillumination). DNA probes were labeled by random priming with ^{32}P - α -dATP by using the Gibco-BRL labeling system. Hybridization was performed at 42°C using a hybridization solution containing 5X SSPE, 5X Denhardt's solution, 50% formamide, 0.1% SDS, and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of herring sperm DNA (9). The DNA fragments used as probes corresponded to the yeast G6PD and ACT1 (actin 1) coding sequences. Radioactive bands were quantitated using a Molecular Dynamics Phosphorimager.

<Au: OK?

Aerobic Culture Process

To prepare the inoculum, *S. cerevisiae* (isolated from pressed yeast cake) was maintained in agar slant tubes containing 23 g/L of nutrient-agar (Difco, Detroit, MI) and 1.0 g/L of glucose, at 4°C. The cells were transferred to 250-mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of growth medium (15 g/L of glucose; 2 g/L of sucrose; 5.0 g/L of peptone; and 3.0 g/L of yeast extract, pH 4.5) and incubated for 10 h at 35°C on a rotary shaker (175 rpm) (New Brunswick). A volume of 0.45 L of inoculum (4.7 g_{dry cell}/L) was poured into a 5-L NBS-MF 105-New Brunswick bench fermentor (coupled with NBS dissolved oxygen controller, DO-81) containing 2.55 L of culture medium. The composition of the culture medium was 20 g/L of glucose, 5.0 g/L of peptone, 3.0 g/L of yeast extract, 2.4 g/L of $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.075 g/L of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, and 5.1 g/L of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ at pH 4.0. The culture was grown batchwise at $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and $\text{pH } 4.0 \pm 0.1$. Foaming was controlled by the addition of a mixture containing silicone emulsion (10%) and water (90%) (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ) (addition dropwise when needed). Agitation and aeration rates were, respectively, 800 rpm and 2.3 vvm (oxygen transfer volumetric coefficient, $K_L a = 230 \text{ h}^{-1}$). Dissolved oxygen tension was measured by polarographic electrode (Ingold). Air-flow was measured by an in-line rotatometer and was set using a needle valve. The pH of the medium during the aerobic culture was measured by combination electrode (Ingold) at the desired value by automatic addition of 0.5 M NaOH and 0.5 M H_2SO_4 .

<Au: Pls.
give g force.

<Au: Pls.
give g force.

Measurement of Cell Concentration and Protein Determination

The cell concentration values of the cultures were obtained by using a calibration curve to correlate OD with dry weight (grams/liter). The amount of total protein was determined according to the Coomassie blue method described by Bradford (13) using bovine serum albumin as a protein concentration standard.

G6PD Activity Assays

Precultures of control strains and of strains containing either plasmid YCpGPF-G6PD or YEppGK-G6PD were incubated for 18 h at 30°C in 2 mL of YNB or YPD medium. Cells from the preculture were transferred to a 50-mL culture of the same medium and incubated for 18 h at 30°C up to the

Job: ABAB 2001 Symposium
 Chapter: 2-26/Lojudice
 Pub Date: 3/01

Operator: KB
 Date: 1/01
 Revision: 1st gal/paging

Expression of G6PD in Modified S. cerevisiae

5

OD₆₀₀ of approx 1.0. Subsequently, cells were harvested, immediately frozen, and stored at -20°C. For extract isolation, cells were resuspended in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5; 5 mM MgCl₂; 0.2 mM EDTA; 10 mM β-mercaptoethanol; 2 mM aminocaproic acid; and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. The cells were disrupted by submitting to a vortex (PHOENIX AT56) in the presence of glass beads (0.5-mm diameter). Cell debris and glass beads were removed by centrifugation (2880g for 10 min at 1°C), and the G6PD activity of the supernatant was measured by spectrophotometric quantitation of reduced NADP at 30°C, as described by Bergmeyer (1). One G6PD unit was defined as the amount of enzyme catalyzing the reduction of 1 μmol of NADP/min under the assay conditions.

Results and Discussion

Construction of Plasmids YCpGPF-G6PD and YEpPGK-G6PD

One of the aims of this work was to obtain yeast strains expressing G6PD protein at levels higher than the level of G6PD of the commercially available wild-type strains. Therefore, plasmids were constructed in which the G6PD coding region is under the control of two strong RNA pol II transcription promoters: the PGK1 promoter and the GPF promoter that was constructed by making a fusion between the GAL1 and PGK1 promoters (8). The GPF promoter has the advantage of maintaining the features of the inducible GAL1 promoter and of having a unique transcription start site, which is determined by the PGK1 portion of GPF (8). The yeast G6PD coding sequence was isolated by PCR amplification using genomic DNA as template and a pair of primers complementary to its 5' and 3' ends. The PCR reaction yielded a product showing an electrophoretic mobility of 1.5 kb pairs on agarose gel, which is the expected size of the G6PD coding sequence. This DNA fragment was submitted to restriction digestion with the enzymes *Bam*HI and *Xba*I and ligated with plasmid YCpSUPLEX1, which had been digested with the same restriction enzymes. The ligated DNA fragments were transformed into *E. coli* cells. Plasmid DNA was isolated from the transformants and screened for clones containing the G6PD insert by means of restriction digestion with the enzymes *Hind*III, *Xba*I, and *Bam*HI. The resulting plasmid was named YCpGPF-G6PD (Fig. 1A). The PGK1 promoter was PCR-amplified from genomic DNA using a pair of primers complementary to its 5' and 3' ends that contain sites for the restriction enzymes *Xho*I and *Bam*HI, respectively. The DNA fragment obtained showed the correct size (0.6 kb) and was submitted to restriction digestion with *Xho*I and *Bam*HI. This fragment was cloned into the vector YEplac181 (10) at the same time as the G6PD coding sequence and the PGK1 transcription terminator, which were isolated from the YCpGPF-G6PD plasmid as a *Bam*HI-*Hind*III 1.8-kb fragment (Fig. 1B). The new plasmid was named YEpPGK-G6PD.

Fig. 1

Fig. 1. Construction of plasmids YCpGPF-G6PD and YEppGK-G6PD. (A) The G6PD coding sequence was PCR-amplified from genomic DNA and inserted into the *Bam*HI and *Xba*I sites of vector YCpSUPEX1 to construct plasmid YCpGPF-G6PD. (B) The PGK1 promoter was amplified by using PCR from genomic DNA. A 1.8-kb *Bam*HI-*Hind*III fragment containing the G6PD coding sequence and the PGK1 transcription terminator was isolated from YCpGPF-G6PD. This fragment was ligated to PGK1 promoter digested with *Xho*I and *Bam*HI, and plasmid YEplac181 digested with *Sal*I and *Hind*III. The *Sal*I and *Xho*I sites are compatible for ligation, although none of them is regenerated. The resulting plasmid was named YEppGK-G6PD.

Quantitation of G6PD mRNA

The gene copy number per cell and the strength of the transcription promoter are major factors that determine the level of a given protein in the cell, provided that there is no posttranscriptional regulatory mechanism. In this work, we used both strong promoters and, in the case of YEppGK-G6PD, a high copy vector. This should lead to an increase in both G6PD mRNA and protein levels in the cell. We performed Northern analysis to determine the steady-state level of G6PD mRNA in control cells and in cells carrying plasmids YCpGPF-G6PD and YEppGK-G6PD (Fig. 2). Actin 1 (ACT1) encodes a constitutively expressed protein that has been widely used as an internal control. Interestingly, W303-1a cells grown in synthetic medium (YNB) showed an increased amount of both G6PD and ACT1 mRNAs compared to W303-1a cells incubated in rich medium (YPD). Quantitation of G6PD mRNA revealed a fourfold increase in G6PD mRNA in cells containing the YCpGPF-G6PD plasmid, when incubated in media containing galactose, compared to the W303-1a parental strain (Fig. 2C). In cells carrying plasmid YEppGK-G6PD, the level of G6PD mRNA was increased fivefold relative to the W303-1a strain.

Although the GAL1 promoter has been demonstrated to be stronger than the PGK1 promoter, the results obtained in this work can be explained because the GPF-G6PD construct is in a single-copy plasmid, whereas the PGK-G6PD clone is present in a multicopy plasmid. The advantage of plas-

Fig. 2

<Au:
media or
medium?

Expression of G6PD in Modified *S. cerevisiae*

7

Fig. 2. Quantitation of G6PD mRNA steady-state level. (A,B) Northern blot analysis of G6PD and actin mRNAs, respectively; (C) graph showing quantitation of Northern blots (G6PD/actin ratio). WT, commercially available strain; W303, W303-1a; PGK, W303-1a cells carrying plasmid YE_{PGK}-G6PD; GPF, W303-1a cells carrying plasmid YC_{pGPF}-G6PD. YPD, YNB-Glu, and YNB-Gal indicate the medium in which cells were incubated.

mid YE_{PGK}-G6PD is that expression can be performed in medium containing glucose as the carbon source, which is a reagent less expensive than galactose.

G6PD Production

Table 1 shows the G6PD activities obtained from the different *S. cerevisiae* strains. The genetically modified strains produced higher (up to ~40 times U/mg_{protein} and up to ~108 times U/g_{cell}) enzyme-specific activities compared with those of the wild types. Specifically, the strains carrying plasmids YC_{pGPF}-G6PD and YE_{PGK}-G6PD showed a 6- and 14-fold increase in G6PD activity, respectively, compared with the parental strains grown under the same conditions. Consistent with the results obtained from G6PD RNA quantitation, cells carrying vector YE_{PGK}-G6PD showed a higher G6PD activity than cells carrying vector YC_{pGPF}-G6PD. This results clearly show that the technique employed in this work to improve G6PD production is efficient and promising.

Table
1

Conclusion

S. cerevisiae acquired from a commercial source and the same strain produced by aerobic cultivation under controlled conditions provided very

Table 1
 G6PD Activities Obtained from Different Sources

Enzyme source		G6PD activity	
		U/mg _{prot}	U/g _{cell}
Baker's yeast (commercial source)		0.22	50
<i>S. cerevisiae</i> produced by aerobic cultivation		0.30	49
Strain ^a	Medium		
W303	YPD	0.36	191.8
W303GAL	SC-Gal	0.28	140.8
GAL-G6PD ^b	SC-Gal	1.72	1437.9
W303GLU	SC-Glu	0.61	211.7
PGK-G6PD ^b	SC-Glu	8.90	5303.8

^aW303GAL, W303 grown in galactose medium; GAL-G6PD, W303/YCpGPF-G6PD in galactose medium; W303GLU, W303 grown in glucose medium; PGK-G6PD, W303/UEpPGK-G6PD in glucose medium.

^bGenetically modified *S. cerevisiae*.

similar G6PD productivities. However, G6PD production by *S. cerevisiae* can be improved by using the techniques of recombinant DNA. Its production can be influenced by substituting the native transcription promoter by promoters that are upregulated specifically by the carbon source of the culture medium used to grow the cells. Therefore, the genetically modified *S. cerevisiae* produced very high enzyme activity and proved to be the most effective procedure to obtain G6PD.

The results presented here show that the cost of producing G6PD can be significantly reduced by using strains that contain levels of G6PD up to 14-fold higher than the level of G6PD found in commercially available strains.

Acknowledgments

We acknowledge receipt of fellowships from FAPESP/Brazil. We also acknowledge the financial support of FAPESP and CNPq/Brazil and Prof. Dr. José Abrahão-Neto.

References

1. Bergmeyer, H. U. (1984), in *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. 2, 3rd ed., Bergmeyer, H. V., Bergmeyer, J., and Grassl, M., eds., Verlag Chemie, Weinheim, Germany, pp. 222, 223.
2. Romanos, M. A., Scorer, C. A., and Clare, J. J. (1992), *Yeast* 8, 423-488.
3. Ogden, J. E., Stanway, C., Kim, S., Mellor, J., Kingsman, A. J., and Kingsman, S. M. (1986), *Mol. Cell Biol.* 6, 4335-4343.
4. West, R. W. Jr., Yocum, R. R., and Ptashne, M. (1984), *Mol. Cell Biol.* 4, 2467-2478.

<Au:
 Correct?

<Au: Pls.
 spell out
 FAPESP
 and CNPq.

Job: ABAB 2001 Symposium
 Chapter: 2-26/Lojudice
 Pub Date: 3/01

Operator: KB
 Date: 1/01
 Revision: 1st gal/paging

Expression of G6PD in Modified S. cerevisiae

9

5. Johnston, M. (1987), *Microbiol. Rev.* **51**, 458–476.
6. Axelrod, J. D., Reagan, M. S., and Majors, J. (1993), *Genes Dev.* **7**, 857–869.
7. Kingsman, S. M., Cousens, D., Stanway, C. A., Chambers, A., Wilson, M., and Kingsman, A. J. (1990), *Methods Enzymol.* **185**, 329–341.
8. Oliveira, C. C., van den Heuvel, J. J., and McCarthy, J. E. G. (1993), *Mol. Microbiol.* **9**, 521–532.
9. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989), *Molecular Cloning—A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
10. Gietz, R. D. and Sugino, A. (1988), *Gene* **74**, 527–534.
11. Sherman, F., Fink, G. R., and Hicks, J. B. (1986), *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory.
12. Köhrer, K. and Domdey, H. (1991), *Methods Enzymol.* **194**, 398–405.
13. Bradford, M. A. (1976), *Analyt. Biochem.* **72**, 248–254.

<Au (9 & 11):
 Pls. provide
 locations.