



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Graduação Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia

VINÍCIUS DE LIMA GONÇALVES

**Análise da adição de floculantes no processo de Microfiltração de
Escherichia.coli na produção de xilanase**

**Araraquara, SP
2021**

VINÍCIUS DE LIMA GONÇALVES

Análise da adição de flocculantes no processo de Microfiltração de *Escherichia.coli* na produção de xilanase

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Engenheiro(a) de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador(a): Dr. Alvaro Baptista Neto

Araraquara, SP

2021

G635a Gonçalves, Vinícius de Lima.
Análise da adição de floculantes no processo de Microfiltração de
Escherichia coli na produção de xilanase / Vinícius de Lima Gonçalves.
- Araraquara: [S.n.], 2021.
63 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação - Engenharia de
Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de
Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Área de
Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Alvaro Baptista Neto.

1. Microfiltração. 2. Floculantes. 3. Fluxo-Cruzado. 4. Xilanase. I.
Baptista Neto, Alvaro, orient. II. Título.

Agradecimentos

Agradeço o companheirismo, amizade e a ajuda que tive dos meus amigos, especialmente do Matheus Malardo Brossi Pelissari e Pedro Henrique Costa. Agradeço a empresa Risework que cedeu os floculantes e os equipamentos para a realização da microfiltração para os experimentos.

Meus agradecimentos aos Técnicos da Unesp de Araraquara Ana, Adriana, Matheus e Flávio que me ajudaram e auxiliaram nesse trabalho e em minha formação.

Agradeço ao orientador Dr. Alvaro Baptista Neto pela tutoria no decorrer do trabalho

Resumo

A microfiltração das células de *E.coli* para a produção de xilanase com a adição de três flocculantes foi analisada. Os flocculantes adicionados foram polímeros catiônicos e as possíveis interações com as xilanases foi analisada, embora a estrutura dos flocculantes não eram conhecidas, a interação direta entre eles resultou que estatisticamente não houve grandes discrepâncias na atividade enzimática, sendo a atividade da xilanase foi em média de 31,164 U/mL em todos os testes de estabilidade. No processo de microfiltração a adição do flocculante 17WATIPS610 aprimorou o processo, aumentando o fluxo do permeado em 18% o em relação ao processo sem a adição de flocculantes, além de aumentar a resistência e a resistência específica da torta e da membrana, indicando que os conglomerados formados exercem uma pressão maior na superfície da membrana. A recuperação da enzima foi entre 80 a 90 % na qual a adição dos flocculantes não interferiu na retenção da enzima na membrana e foi obtida uma atividade enzimática de 2393 U em 1,5 L de caldo filtrado. Esse aumento na performance da microfiltração com a adição de flocculantes pode ser empregado para produção de bioprodutos que não necessitam de alta pureza.

Palavras-chave: Microfiltração. Flocculantes. Fluxo-Cruzado. Xilanase.

Abstract

The microfiltration of *E.coli* cells for the production of xylanase with the addition of three flocculants was analyzed. The flocculants were polymers and the possible interactions with the xylanases were analyzed, although the charge and the structure of the flocculants were unknown, a direct interaction between them resulted in which statistically there were no great differences in the enzymatic activity. The xylanase activity averaged 31,164 U/mL in all stability tests. In the microfiltration process the addition of flocculant 17WATIPS610 improved the process, increasing the permeate flow by 18% in relation to the process without the addition of flocculants, in addition to increasing the resistance and specific resistance of the cake and the membrane surface, indicating that the formed conglomerates exert a greater pressure on the membrane surface. The enzyme recovery was between 80 to 90 % in which the addition of flocculants didn't interfere with the retention of the enzyme in the membrane and an enzymatic activity of 2393 U was obtained in 1,5 L of filtered broth. This increase in microfiltration performance with the addition of flocculants can be used to produce bioproducts that do not require high purity.

Keywords: Microfiltration. Flocculants. Cross-Flow. Xylanase.

Lista de Figuras

Figura 1: Ilustração entre a interação da enzima com o substrato.....	10
Figura 2: Ilustração sobre o efeito catalítico das enzimas para a produção de um produto.....	12
Figura 3: Estrutura da xilana com as reações de hidrólise das enzimas indicadas.....	21
Figura 4: Ilustração xilanase (1XXN) do Bacillus subtilis.....	22
Figura 5: Ilustração da formação de torta e o decaimento do fluxo (a) da filtração convencional e (b) da filtração tangencial.....	30
Figura 6: Ilustração dos esquemas de operação (a) que ilustra a operação de filtração de fluxo cruzado e (b) ilustra a operação de filtração convencional.....	31
Figura 7: Gráfico do da linearização da filtração para encontrar as variáveis K_p e B	37
Figura 8: Exemplos de polieletrólitos catiônicos, aniônicos e sem cargas.....	38
Figura 9: Comparação entre as células com floculantes e sem floculantes em membranas de microfiltração.....	40
Figura 10: Interação entre uma proteína com um polieletrólito.....	41
Figura 11: Esquema ilustrativo de como foi realizada a microfiltração.....	44
Figura 12: Estrutura para a realização das microfiltrações.....	44
Figura 13: Atividade enzimática de acordo com o tempo com vários floculantes.....	45
Figura 14: Gráfico do Fluxo do permeado da filtração com o tempo dos experimentos sem floculante (padrão) e com floculantes (610 e 611).....	47

Lista de Tabelas

Tabela 1: Descrição das classes das enzimas com o primeiro número EC.....	13
Tabela 2: Exemplos de aplicações de algumas enzimas utilizadas nas indústrias alimentícia.....	16
Tabela 3: Exemplos de aplicações de algumas enzimas utilizadas nas indústrias de detergentes.....	17
Tabela 4: Os processos de filtração com os diferentes parâmetros para sua operação.....	30
Tabela 5: Tabela do fluxos de permeados dos experimentos em diferentes tempos.....	47
Tabela 6: Tabela das variáveis calculadas em cada experimento.....	48
Tabela 7: Fluxo médio dos experimentos.....	48
Tabela 8: Atividade enzimática em diferentes períodos da filtração.....	50
Tabela 9: Atividade enzimática da xilanase média da interação com os floculantes nos diferentes períodos de tempo.....	58
Tabela 10: Valores de atividade enzimática da xilanase e o Z-score com a inteação dos floculantes SuplerFloc 130 wv, 17WATIPS611 e Superfloc 130 V.....	59
Tabela 11: Valores de atividade enzimática da xilanase e o Z-score com a inteação dos floculantes SH, 17WATIPS610 e AL2SO4.....	60
Tabela 12: Valores de atividade enzimática da xilanase e o Z-score com a inteação dos floculantes CTAB e PVA.....	61

Sumário

Agradecimentos.....	2
Resumo.....	3
Abstract.....	4
Lista de Figuras.....	5
Lista de Tabelas.....	6
Sumário.....	7
1. Introdução.....	8
2. Objetivos.....	9
3. Revisão Bibliográfica.....	10
3.1. Enzimas.....	10
3.1.1. Reação de equilíbrio das enzimas.....	11
3.1.2. Classificação das enzimas.....	13
3.1.3. Utilização de enzimas na indústria.....	16
3.1.3.1. Indústria alimentícia.....	16
3.1.3.2. Indústria de Detergentes.....	17
3.1.3.3. Indústria de Papel e Celulose.....	18
3.1.4. Purificação de Enzimas.....	18
3.2. Xilanase.....	20
3.2.1. Produção Xilanase.....	22
3.2.2. Aplicação industrial das xilanases.....	25
3.2.2.1. Indústria alimentícia.....	26
3.2.2.2. Alimentação animal.....	26
3.2.2.3. Indústria de papel e celulose.....	27
3.2.2.4. Indústria Têxtil.....	28
3.2.2.5. Indústrias químicas e farmacêuticas.....	28
3.2.2.6. Xilanases em biorrefinarias.....	28
3.3. Filtração.....	29
3.3.1. Filtração Tangencial.....	31
3.3.2. Microfiltração.....	32
3.3.3. Ultrafiltração.....	33
3.3.4. Propriedades das membranas.....	34
3.3.5. Cinética da Filtração.....	35
3.4. Floculantes.....	37
3.4.1. Aplicação de Floculantes.....	39
3.4.2. Interação dos floculantes com Proteínas.....	40
4. Materiais e Métodos.....	41
4.1. Transformação das células quimiocompetentes.....	41
4.2. Produção de caldo de cultivo com células e enzimas.....	42
4.2.1. Preparação e utilização de células criogênicas.....	42
4.3. Determinação da atividade enzimática.....	42
4.4. Procedimento da Filtração.....	43
4.5. Estabilidade enzimática na presença de floculante.....	45
5. Resultados e Discussão.....	45
5.1. Análise da interação dos floculantes com a xilanase.....	45
5.2. Resultados da Microfiltração.....	46
5.3. Recuperação da xilanase.....	50
6. Conclusão.....	52
7. Referências.....	53
Apêndice	58

1. Introdução

Nas indústrias de biotecnologia os processos de “downstream” são operações essenciais para a separação e preparo dos bioprodutos, normalmente os processos de purificação correspondem ao maior custo na produção de proteínas (GAGAOUA, 2018). Entre essas operações a filtração faz parte da grande maioria dos processos nas indústrias de biotecnologia (CHARCOSSET, 2006). As unidades de separação através de membranas como a microfiltração e a ultrafiltração são utilizadas para várias finalidades, como a remoção de células e concentração das proteínas respectivamente. A microfiltração é utilizada nas indústrias farmacêutica, alimentícia, biotecnológica e no tratamento de águas residuárias. E usualmente é utilizada em uma configuração de fluxo cruzado (LOZANO, 2003; ANIS *et al* 2019).

As enzimas, que são proteínas catalisadoras, fazem parte de importantes bioprodutos desenvolvidos para catalisar diversas reações químicas. Entre as classes das enzimas, as hidrolases são as enzimas mais comercializadas pois atuam em muitas indústrias (ROBINSON, 2015). As xilanases são hidrolases que fazem a hidrólise do polissacarídeo xilana em xilose, essa enzima pode ser empregada nas indústrias de alimentos, a fim de melhorar a fabricação de pães, e na indústria de papel e celulose a fim de reduzir o uso dos agentes químicos que geram grandes quantidades de efluentes (RAVEENDRAN *et al* 2018) (SINGH *et al* 2016). Alguns fungos e bactérias são capazes de produzir a xilanase, porém para uma maior produção mais controlada, a utilização de microrganismos geneticamente modificados é essencial. Para a purificação das enzimas a microfiltração pode ser empregada nas etapas iniciais de purificação do bioproduto para remover as células e outras partículas.

O maior problema do processo de filtração é a formação de torta, que é o depósito de partículas na superfície da membrana, essa torta dificulta o escoamento do filtrado e conforme há o crescimento da torta a um decréscimo do fluxo do filtrado (DORAN, 2013). Para mitigar esse efeito de acúmulo de material na superfície da membrana a configuração de filtração tangencial (ou em fluxo cruzado) aumenta a eficiência do processo. Nessa configuração o fluxo do fluido a ser filtrado é paralelo

a membrana e o fluxo do filtrado é perpendicular ao fluxo do fluido que entra no sistema de filtração. Isso gera um efeito de auto-limpeza da membrana, retardando o declínio do fluxo do filtrado (DORAN, 2013).

Para melhorar o processo de filtração algumas mudanças operacionais e nas configurações do processo podem ser realizadas, entre essas mudanças, o incremento de floculantes/coagulantes junto com o processo de filtração pode aumentar a eficiência do processo (WANG *et al* 2016) (HARRISON *et al* 2015). Os coagulantes são agentes que diminuem as forças repulsivas das partículas resultando na formação de agregados mais pesados e densos das mesmas, com uma massa maior a sua precipitação é mais rápida. Alguns desses floculantes possuem cargas e podem interagir com as proteínas presentes no meio, pois as proteínas, especialmente o sítio ativo das enzimas, possuem conformações que depende da interação de cargas como a temperatura do ambiente, o pH do meio e íons metálicos (ROBINSON, 2015; ACHAZI *et al* 2021). Porém o uso de floculantes junto com a técnica de microfiltração pode melhorar o fluxo do filtrado, pois gera uma torta menos compacta com espaços maiores para o fluido passar nos poros da membrana (KARIM *et al* 2008).

Embora na fabricação de bioprodutos na qual exigem um alto grau de pureza, o uso de floculantes pode interferir com os processos subsequentes, porém para a produção de bioprodutos que necessitam de uma baixa pureza o uso de floculantes com a microfiltração pode aumentar a eficiência do processo (KARIM *et al* 2008).

2. Objetivos

- Analisar a interação da xilanase com os floculantes e a recuperação da proteína catalisadora
- Analisar o sistema de microfiltração com a adição de floculantes

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Enzimas

As enzimas são catalisadores biológicos que aumentam a velocidade de reações bioquímicas, existem diferentes tipos de enzimas com funções distintas e específicas, e graças a sua especificidade e eficiência, as proteínas catalisadoras são moléculas essenciais para os seres vivos. A palavra “enzima” é derivada da palavra grega *en* (que significa ‘dentro de’) e *zume* (que significa ‘levedura’), foi introduzida pelo alemão Wilhelm Kühne em 1878 quando estava descrevendo a produção de álcool pela degradação de açúcares através de leveduras. Como qualquer catalisador, as enzimas em baixa concentração conseguem acelerar as reações sem serem consumidas nas reações (ROBINSON, 2015).

As enzimas são proteínas que podem variar em seu tamanho entre 100 a 2000 de aminoácidos, a ligação desses aminoácidos gera a formação de uma ou mais cadeias de polipeptídios que se doam para formar diferentes formas tridimensionais. Essa estrutura tridimensional da proteína resulta em uma área que é determinada como *sítio ativo*. Essa região é constituída por menos de 10 aminoácidos e é nela em que ocorre a reação bioquímica (ROBINSON, 2015). É graças a forma e carga do sítio ativo que ocorre a ligação específica do substrato com a proteína.

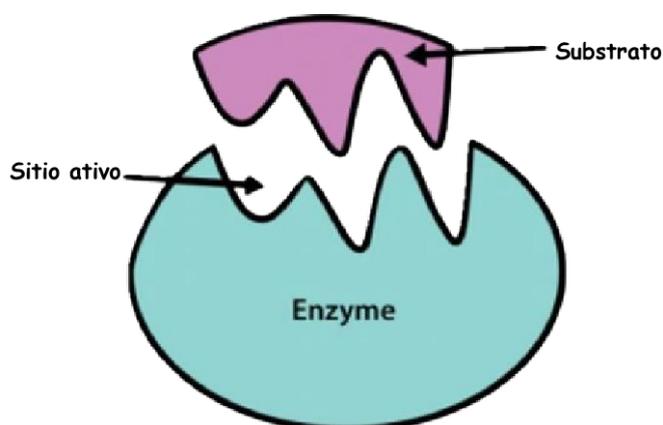


Figura 1: Ilustração entre a interação da enzima com o substrato (ROBINSON, 2015)

Apesar da molécula de proteína ser grande comparada ao tamanho do seu sítio ativo, toda a estrutura da proteína é para estabilizar e ajudar a prover com um

ambiente propício para que o setor catalítico do interaja com a molécula do substrato. As alterações na temperatura, pH são as principais mudanças físico-químicas que podem alterar a forma tridimensional da proteína. Tanto o pH como a temperatura no ambiente afetam a velocidade da enzima na formação do produto, a variação do pH influencia na capacidade de ligação entre a enzima e o substrato, as variações na temperatura influenciam a atividade da enzima de forma complexa, porém temperaturas elevadas podem levar a desnaturação da proteína, levando a irreversível inativação de sua função catalítica (ROBINSON, 2015).

A maioria das enzimas são constituídas apenas por proteínas, porém algumas enzimas necessitam de cofatores, que são moléculas orgânicas ou inorgânicas como metais. A enzima que necessita de um cofator para sua atividade é denominada de *holoenzima*, se a enzima está sem o seu cofator, a estrutura é denominada de *apoenzima* (ROBINSON, 2015).

3.1.1. Reação de equilíbrio das enzimas

A reação da que a enzima não altera o equilíbrio da reação, pois a enzima acelera a reação do substrato em produto. Em muitos casos a estrutura do produto é mais estável quimicamente do que a estrutura do substrato, assim a reação reversa, que seria o produto se transformar em substrato, é praticamente nula (ROBINSON, 2015). A constante de equilíbrio K_{eq} expressa o ponto de equilíbrio entre duas moléculas. A seguir nas equações 1 e 2 há a representação de como se calculam os pontos de equilíbrio das reações químicas.



$$K_{eq} = \frac{[P]}{[S]} \quad (2)$$

Se $K_{eq} = 1$, é uma reação em equilíbrio entre o produto e o substrato, $K_{eq} > 1$ a reação é favorável para a formação do produto, e se $K_{eq} < 1$ a reação é a favor do substrato. Por ser um propriedade termodinâmica, a utilização de enzima não altera

as condições de equilíbrio das reações. Um modelo que descreve uma reação enzimática, baseia-se em uma, reação catalítica no qual ocorre com a formação de um complexo com o substrato, e resulta no produto e a enzima livre para se ligar com outra molécula de substrato, a equação 3 descreve como a função de equilíbrio ocorre com a adição da enzima.



Como ilustrado na figura 2, a formação do complexo de enzima com o substrato diminui a energia de ativação da reação, ou seja, o estado de transição de uma fase para outra é facilitando para gerar a formação do produto. A enzima não atua na alteração dos níveis de energia de cada substância, por tanto o fato do produto ser mais estável do que o substrato faz com que a reação de equilíbrio entre as moléculas seja muito favorável à formação do produto (ROBINSON, 2015). Sendo assim, a enzima acelera a velocidade de reação através da diminuição da energia de reação.

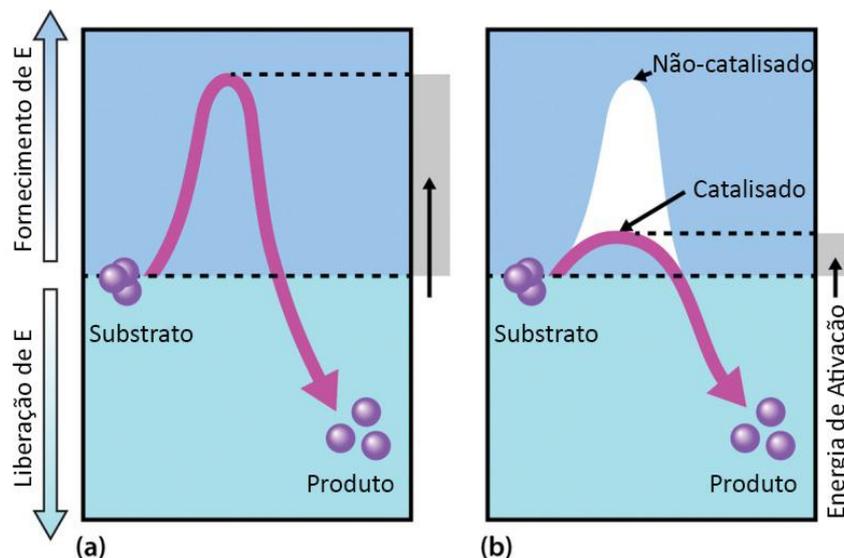


Figura 2: Ilustração sobre o efeito catalítico das enzimas para a produção de um produto (ROBINSON, 2015)

As vantagens para o uso industrial das enzimas são as características únicas da biocatálise que são: aceleram as reações sem alterar a termodinâmica do sistema, alta especificidade com o substrato e reações colaterais reduzidas. Diferentemente de reações de catálise química, nas quais os grandes fatores

limitantes para sua utilização são: o número de reações até o produto final, a separação do produto dos outros contaminantes e os efluentes químicos que são lançados no final do processo. Em processos em que as temperaturas necessárias são brandas, na faixa de 20 a 40°C e pHs que estão entre 5 a 8, uma baixa concentração de enzimas poderá ser suficiente para todo o processo (ROBINSON, 2015). As áreas que as enzimas podem atender são: Agentes terapêuticos, reagentes analíticos, catalisadores industriais e utilizadas como ferramentas de manipulação na área de genética.

Grande parte da biocatálise empregada em processos econômicos é através da construção da imobilização das enzimas, devido a facilidade de separação do catalisador com o produto final e através de sua estabilidade e da configuração ao reator ser mais flexível. A imobilização das enzimas prolonga a duração catalítica tornando o sistema reutilizável, isso impacta no custo de fabricação do produto e manutenção do sistema de produção. O valor de mercado das enzimas global foi de £110 milhões em 1960 para £2000 milhões em 2010. O setor de alimentos e bebidas representa o maior setor de enzimas industriais e apresentou um valor de £750 milhões em 2010, o mercado para aplicações técnicas, como diagnósticos, pesquisa e biotecnologia, corresponde a £700 milhões (ROBINSON, 2015).

3.1.2. Classificação das enzimas

Os nomes atribuídos às enzimas são usualmente referentes ao substrato da sua reação catalítica, mas existem certos nomes que não deixam transparecer a reação envolvida. Devido a essa inconsistência e complexidade das enzimas, a União Internacional de Bioquímicos determinou um registro para cada proteína (ROBINSON, 2015). Os números da Comissão Enzimática (“*Enzyme Commission*” ou EC) é um sistema em que todas as enzimas são descritas por quatro partes. Como por exemplo a xilanase, ou endo- β -1,4-xilanases, o número EC é 3.2.1.8 (MURAKAMI *et al* 2005). O primeiro número do EC indica o tipo de reação que a enzima catalisa, e os outros números possuem diferentes significados, pois depende da natureza da reação, indicada pelo primeiro número. Na tabela 1 há um resumo das principais classes de enzimas.

Tabela 1: Descrição das classes das enzimas com o primeiro número EC

Primeiro N° EC	Classe da Enzima	Tipo de reação
1	Oxidoredutases	Oxidação/Redução
2	Transferases	Transferência de átomo/grupo
3	Hidrolases	Hidrólise
4	Liases	Quebra de ligações covalentes
5	Isomerases	Isomerização
6	Ligases	Ligação de cadeias de DNA

- Oxidoredutases

As Oxidoredutases são enzimas que catalisam a transferência de elétrons de uma molécula redutora a uma molécula oxidante, usualmente utilizam Nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺/NADH) e flavinas (FAD/FADH₂) como cofatores. Essas enzimas são utilizadas para síntese de biomoléculas, remoção ou degradação de moléculas e no metabolismo de substâncias exógenas como drogas. Essa classe de enzimas pode ser utilizada no processamento de alimentos, na medicina e em síntese químicas, no metabolismo de alimentos as oxidoredutases estão envolvidas na glicólise, no ciclo de Krebs e no metabolismo de ácidos graxos e aminoácidos (HABTE, 2020). No Estudo de Gogoi (2020) as oxidoredutases podem ser utilizadas para testes diagnósticos e biossensores.

- Transferases

As enzimas transferases catalisam a reação da transferência de grupos como metil, hidroximetil, acil, alquil, fosfato, formal e sulfato através de reação de substituição nucleofílica. Essa classe de enzima não é muito utilizada na indústria, porém o uso industrial dessas enzimas é para a síntese de oligossacarídeos através de glicosiltransferases. (PAUL *et al* 2019)

- Hidrolases

As Hidrolases são enzimas que catalisam a adição de água no substrato através de uma reação de substituição nucleofílica, essas proteínas catalisam as reações de hidrólise e a formação de ligações amida e éster. Essas enzimas são as biocatalizadoras mais comuns para a síntese de moléculas orgânicas. Entre as hidrolases se destacam as amilases, proteases, esterases e lipases devido a sua importância nas indústrias, o mercado mundial é dominado pela produção dessas enzimas (ROBINSON, 2015). As hidrolases produzem intermediários para as indústrias farmacêuticas, pesticidas e para síntese de moléculas assimétricas.

- Liases

As enzimas liases são responsáveis pela catálise da eliminação ou adição de reações. As reações catalíticas são a quebra de ligações entre moléculas, como entre um átomo de carbono e um átomo que pode ser um carbono, enxofre ou oxigênio. Essas enzimas são encontradas em processos celulares, como o ciclo do ácido cítrico e a produção de ácido fumárico catalisado pela enzima fumarase.

- Isomerasas

As enzimas isomerasas são catalisadoras de reações de isomerização, como a racemização e epimerização. A glicose-isomerase, que é uma enzima que faz parte em um dos melhores processos catalíticos empregados, catalisa a reação da produção de xarope de milho rico em frutose a partir da glicose. Esse xarope é utilizado como um adoçante alternativo da sucrose em bebidas e alimentos. Essa produção utiliza enzimas imobilizadas em reatores de leito fixo, e a produção excede de um milhão de toneladas por ano.

- Ligases

As enzimas Ligases catalisam reações de ligações químicas com trifosfatos de nucleotídeos. Elas são essenciais para os processos celulares, e embora haja baixa aplicação industrial, quase todos os laboratórios biológicos que trabalham com tecnologia de DNA recombinantes, necessitam da DNA ligases.

3.1.3. Utilização de enzimas na indústria

3.1.3.1. Indústria alimentícia

Na indústria de alimentos é essencial que os recursos envolvidos na fabricação dos alimentos sejam seguros e eficientes, o uso de enzimas é muito importante para garantir que o alimento contenha variedade, diversidade e qualidade (SINGH *et al* 2019; RAVEENDRAN *et al* 2018). Grande parte das enzimas presentes nas indústrias são de origem microbiana, pois os microrganismos produzem os biocatalisadores em grandes quantidades e são mais baratos e rápidos que as enzimas de origem animal e vegetal. As enzimas microbianas em comparação com as provenientes de origem animal e vegetal, possuem riscos mínimos a conteúdos potencialmente prejudiciais à saúde. A seguir é apresentada a tabela 2, na qual são relatadas diferentes enzimas com suas aplicações ao lado (RAVEENDRAN *et al* 2018).

Tabela 2: Exemplos de aplicações de algumas enzimas utilizadas nas indústrias alimentícia (RAVEENDRAN *et al* 2018)

Enzimas	Aplicações
α-Amylase	Panificação
	Cervejas
	Clareamento de sucos
	Melhora a qualidade do pão
Protease	Cervejas
	Coagulação de Leite
	Amaciamento de carnes
Lactase	Alimentos prebióticos
	Redução do teor de lactose nos alimentos
Lipase	Desenvolvimento de sabor do queijo
Xilanase	Clarificação de suco
	Aumento da qualidade da cerveja
	Aumento da qualidade de pães

3.1.3.2. Indústria de Detergentes

Detergentes com o incremento de enzimas é importante para várias tarefas, incluindo a lavagem automática de louças, lavagem de roupas e limpeza de equipamentos da indústria alimentícia. Muitos dos detergentes contêm uma mistura de duas ou mais enzimas, sendo que uma das principais características para o emprego de novas enzimas nos detergentes é a capacidade de tolerância aos outros ingredientes presentes na formulação, como surfactantes, produtos de branqueamento, *builders* e estáveis em ambientes alcalinos. Em estudos recentes, mostram que detergentes com multienzimas serão empregadas para substituir 25% dos surfactantes dos detergentes para lavamento de roupas sem comprometer sua limpeza. Isso leva a um produto mais sustentável que limpa em baixas temperaturas (HEDE, 2014).

As enzimas mais utilizadas em detergentes são as hidrolases, nas quais removem proteínas, lipídeos e polissacarídeos. É necessário diferentes hidrolases para a remoção de manchas de como as de comidas de bebê, molhos, sangue, ovo, gorduras de vegetais e de origem animal, e outras manchas provenientes de diversas fontes. As principais classes de enzimas empregadas são: proteases, amilases, lipases, celulases, pectinases e mananases (HEDE, 2014). Os exemplos de uso dessas enzimas estão detalhados de forma resumida na tabela 3 a seguir.

Tabela 3: Exemplos de aplicações de algumas enzimas utilizadas nas indústrias de detergentes (HEDE, 2014).

Enzimas	Aplicações
Proteases	Aumenta a eficiência da lavagem de roupas
Celulase	Contribui para limpeza e cuidado em geral do tecido
Lipases	Utilização como substituto de surfactantes
Mananases e Pectinases	Remoção de manchas difíceis (ketchup, pasta dental)

3.1.3.3. Indústria de Papel e Celulose

A produção industrial de papel é realizada através do processamento da madeira. A madeira é descascada através de um tambor de descascamento, as cascas são convertidas em lascas, essas lascas são convertidas em chips de madeira pelo processo denominado de *chipping*, com os chips de acordo com os padrões exigidos passaram pelo processo de cozimento, na qual consiste na dissolução da lignina (RULLIFANK *et al*, 2020). Após o cozimento, a lavagem é realizada para limpar as impurezas e fibras presentes, esses contaminantes reduzem a qualidade da polpa e mais gastos com agentes de branqueamento. Em seguida há o processo de branqueamento, esse processo é caracterizado por quatro estágios. O processo de branqueamento gera grandes quantidades de efluentes que são prejudiciais ao meio ambiente, devido às altas de produtos químicos baseados em cloro, como dióxido de cloro e hipoclorito (RULLIFANK *et al*, 2020; SINGH *et al* 2016).

Uma alternativa para reduzir o uso e aumentar a eficiência desses compostos clorados é a utilização de enzimas. Vários estudos demonstram que o uso de xilanases aumentou o brilho e a viscosidade da polpa 'kraft', causando uma redução significativa em produtos clorados para o branqueamento (SINGH *et al* 2016). A xilana presente na polpa está ligada com a lignina e a celulose, com a quebra da xilana pela xilanase a separação durante o branqueamento é facilitado. (SINGH *et al* 2016)

3.1.4. Purificação de Enzimas.

O processo de "*downstream*" é um sistema de vários estágios para recuperar o bioproduto feito no processo de fermentação, esse processo é essencial para a recuperação e purificação das proteínas (ROBINSON, 2015). A purificação das enzimas depende da natureza do processo em que ela está envolvida. Enzimas utilizadas como reagentes de diagnósticos e em terapêutica clínica necessitam de um alto nível de purificação, já que nesses casos é preciso avaliar de forma precisa a reação e alguns contaminantes, além de prejudicar a saúde do paciente, podem alterar ou prejudicar o avanço das reações (ROBINSON, 2015). No caso da utilização de enzimas em processos industriais, não há a necessidade de elevada

purificação, várias das enzimas vendidas para esses processos chegam sem muita purificação, contendo ainda o meio de cultivo e fragmentos dos microrganismos (ROBINSON, 2015). Para se obter uma enzima com alto grau de purificação o processo é caro e trabalhoso, normalmente o processo total de “*downstream*” corresponde ao maior custo na produção de proteínas (GAGAOUA, 2018). Mesmo as enzimas mais baratas no mercado, em seu preço final 5 -10% é contribuído ao processo de “*downstream*”. Nos processos atribuídos para a recuperação da proteína, há diversas técnicas com vantagens e desvantagens que são levadas em consideração para o desenvolvimento das melhores condições para a recuperação do bioproduto (MAJID, 2015).

As operações unitárias que compõem os processamentos de “*downstream*” consistem em: *Remoção de materiais insolúveis, Isolação do produto, purificação do produto e polimento do produto* (MAJID, 2015).

O processo de “*downstream*” usualmente começa com o pré-tratamento do caldo da fermentação, esse caldo rico em microrganismos é esfriado, para que não haja mais crescimento celular e há o ajuste de pH da solução até chegar ao ponto ótimo da enzima, na qual estará em sua forma mais estável (ROBINSON, 2015). Para remover os microrganismos o caldo é submetido a processos de filtração ou de centrifugação, e para aumentar a eficiência da remoção de bactérias, a inserção de floculantes, como sulfato de alumínio ou cloreto de cálcio são utilizados para negar as cargas das membranas celulares, causando o aglomeramento das bactérias para facilitação dessas etapas iniciais. Caso o bioproduto de interesse esteja intracelular, há a necessidade de um processo de rompimento da membrana celular dos microrganismos através de técnicas como, sonificação, choque osmótico, prensa francesa, degradação enzimática da parede celular, ciclos de congelamento e descongelamento e moagem com esferas de vidro (ROBINSON, 2015).

Depois dessa etapa inicial, as etapas subsequentes do processo de “*downstream*” são usualmente envolvendo a separação das proteínas no meio, nas quais envolvem técnicas de absorção, ultrafiltração e precipitação (MAJID, 2015). Um exemplo desses processos é o salting out. Esse processo de precipitação das proteínas envolve as interações entre aminoácidos (que são hidrofílicos) e as moléculas de água ao redor (ROBINSON, 2015). Com a adição de um agente (um

sal inorgânico como sulfato de amônia) a força iônica do solvente aumenta, causando interações entre as moléculas de água e os íons do sal, diminuindo a interação entre as moléculas da água e as proteínas no meio. Nessa situação, as proteínas irão interagir entre elas, formando um precipitado. A enzima de interesse estará presente nesse precipitado, na qual pode ser separado por centrifugação ou filtração, porém há um decaimento da atividade enzimática da proteína (ROBINSON, 2015).

Com as proteínas separadas do meio, vários processos podem ser empregados para a obtenção de uma forma mais pura da enzima de interesse. Nessa etapa são equipamentos mais sensíveis, caros e sofisticados para que a enzima de interesse possa ser separada dos outros contaminantes presentes no meio. As cromatografias por afinidade, de troca iônica e da filtração em gel são exemplos de unidades de operação atribuídas nessas etapas (MAJID, 2015; ROBINSON, 2015).

Com o produto purificado a enzima passa pelo processo de polimento, para que o produto permaneça em sua forma estável, de fácil manipulação e transporte. Exemplos de processos que são atribuídos nesta etapa são a cristalização e a liofilização (MAJID, 2015).

3.2. Xilanase

As xilanases são enzimas pertencentes ao grupo de enzimas glicosídeses, em que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas de 1,4- β -D-xilosídico da xilana, essa hidrólise resulta na produção de xilose, que pode ser utilizado como fonte de energia para plantas (COLLINS *et al* 2005). A xilana é um polissacarídeo estrutural nas células vegetais e logo após a celulose, é segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, a xilana compõem a maior parte da hemicelulose, seguida por glucuronaxilano, xiloglucanos, glucomanano, e arabinogalactano. Devido a complexidade e heterogeneidade desse polissacarídeo, o mesmo necessita de várias enzimas para realizar sua hidrólise (COLLINS *et al* 2005). Endo 1,4- β -D-xilanases são responsáveis pela quebra das ligações na cadeia principal do polissacarídeo, β -D-xilosídeses hidrolisam monômeros de xylose não redutores nas pontas das cadeias de xilo-oligossacarídeos, a alfa-L- arabinofuranosídeses

hidrolisa as ligações laterais entre l-arabinose e a cadeia principal de xilana, e as outras ligações laterais são hidrolisadas pelas enzimas, alfa-D-glucuronidasas, metilsilano esterases, esterases de ácido ferúlico e ácido p-cumárico (COLLINS *et al* 2005). A Figura 3 a seguir mostra onde ocorrem as hidrólises descritas acima na xilana.

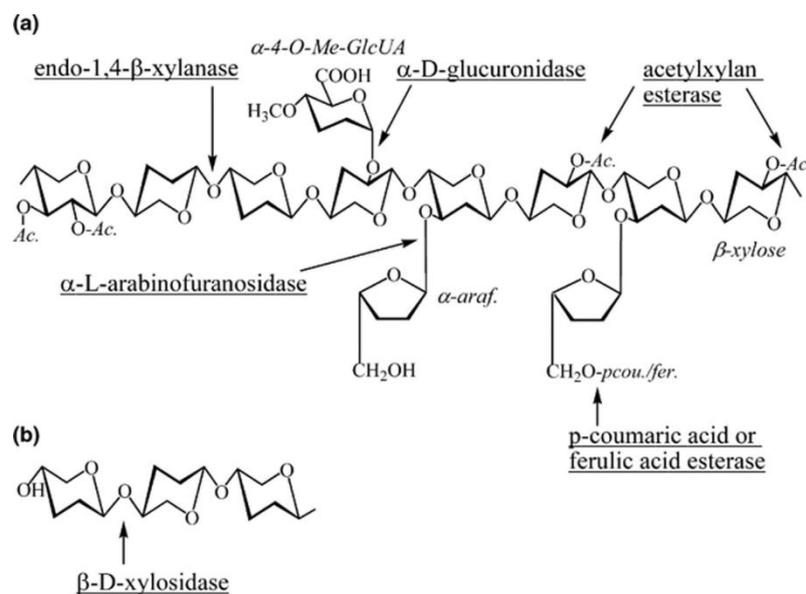


Figura 3: Estrutura da xilana com as reações de hidrólise das enzimas indicadas (COLLINS *et al* 2005)

Existem vários microrganismos que produzem diferentes xilanases, essas diferenças correspondem a mudanças na estrutura da proteína, a sua atividade específica, o que resulta em diferenças físico-químicas das proteínas, o que pode aumentar ou diminuir sua eficiência e extensão da hidrólise. Um exemplo seria a produção de cerca de 15 xilanases extracelulares pelo microrganismo *Aspergillus niger* (COLLINS *et al* 2005). Várias dessas enzimas são produzidas por genes distintos. A maioria das xilanases são secretadas pois a xilana é um substrato grande para sua penetração na célula, embora que alguns microrganismos podem

transportar pequenas quantidades para seu interior de xilo-oligômeros que são liberados no meio após a ação da xilanase. Esses xilo-oligômeros são degradados por beta-xilosidases (COLLINS *et al* 2005).

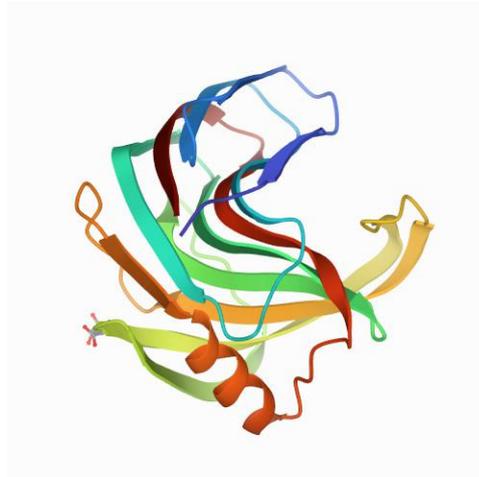


Figura 4: Ilustração da xilanase do *Bacillus subtilis* (MURAKAMI *et al* 2005)

3.2.1. Produção Xilanase

Para a produção de proteínas, microorganismos são capazes de sintetizar em grande quantidade produtos biológicos ativos, na qual entre esses bioprodutos, as enzimas se destacam pela suas qualidades intrínsecas de serem proteínas catalisadoras específicas. O uso de enzimas em processos industriais tem aumentado nos últimos anos e oferece vantagens em relação aos catalisadores químicos devido a elevada atividade catalítica, especificidade elevada, produção em grandes quantidades, são biodegradáveis e não apresentam nenhuma ameaça ao meio ambiente e são economicamente viáveis (MOTTA *et al* 2013).

Para a produção de xilanases, os microorganismos que podem produzir essa enzima são fungos, bactérias e actinomicetos. Sendo que os microorganismos mais importantes para a produção da enzima são os microorganismos do genero *Bacillus*, *Aspergillus*, *Clostridia*, *Phanerochaetes*, *Streptomyces*, *Chytridiomycetes*, *Ruminococcus*, *Trichoderma* e *Fibrobacteres* (MOTTA *et al* 2013). A produção pode depender de fatores como a variedade nutricional e condições químicas do meio. De forma geral, os fungos do gênero *Pichia*, *Trichoderma*, *Fusarium* e *Aspergillus* são considerados bons produtores, porém as xilanases de origem fungal são relacionadas com celulases, pois quando essas cepas encontram substratos

celulósicos, há traços de hemicelulose presentes, o que induz a produção de xilanases (SHARMAN, 2017). A agitação do meio de cultivo pode ser problemática, pois as forças de cisalhamento geradas pelo agitador do fermentador podem fragmentar as hifas dos fungos presentes, levando a uma baixa produtividade e atividade da xilanase (SHARMAN, 2017). Os microrganismos que mais produzem xilanases comercialmente são *Trichoderma*, *Bacillus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Aureobasidium*, and *Talaromyces sp* (SHARMAN, 2017).

As xilanases de origem bacteriana se destacam devido a característica de serem termoestáveis-alcálinas com um pH ótimo levemente maior do que a enzima de origem fúngal, essa característica é essencial para a maioria das aplicações industriais, principalmente em indústria de papel e celulose. Dentre os microrganismos produtores de xilanase, se destacam os termófilos devido a sua produção de proteínas termorresistentes, como por exemplo uma xilanase produzida por *Thermotoga sp*, possui temperatura ótima entre 100 e 105 °C (MOTTA *et al* 2013).

As características das xilanases que podem ser utilizadas em processos industriais são alta atividade específica, resistência a variações de pH e a temperaturas, e resistência a agentes químicos e cátions metálicos. Porém a maioria das enzimas não possuem todas essas qualidades para sua aplicação industrial (MOTTA *et al* 2013). As xilanases de microrganismos nativos não apresentam as demandas requeridas das indústrias, devido ao seu baixo rendimento e possuem incompatibilidade com os processos de fermentação mais tradicionais nas indústrias (MOTTA *et al* 2013). Para superar os obstáculos a xilanase pode ser modificada através da tecnologia de DNA recombinante, para que haja a expressão da xilanase em sistemas heterólogos, atualmente a produção de xilanase em nível industrial é através de sistemas de expressão heteróloga, e para atender as aplicações indústrias da xilanase, a enzima precisa ser mais barata e com elevada taxa de expressão (MOTTA *et al* 2013).

A bactéria mais promissora para ser hospedeiro de clonagem e para expressão de proteínas recombinantes heterólogas é a *Escherichia coli* (BASIT *et al* 2020). Essa bactéria possui características que se destaca das demais, a *E.coli* é conhecida pela sua alta velocidade de crescimento, fácil manipulação, técnicas

simples para sua transformação e pela alta acumulação de produtos no citoplasma celular. Apesar de ser um microrganismo bom para a expressão de proteínas recombinantes, a *E.coli* não apresenta expressões eficientes e funcionais para muitas xilanases, e alguns genes não são expressos com facilidade (MOTTA *et al* 2013). Porém a *E.coli* é utilizada para estudos sobre a estrutura do gene da xilanase e para o estudo de aprimoramento das enzimas através da engenharia de proteínas (MOTTA *et al* 2013; BASIT *et al* 2020).

A *E.coli* não consegue produzir a xilanase de forma eficiente devido aos códons raros repetidos e a necessidade de modificações pós-traducionais, e o fato da presença de endotoxinas (lipopolissacarídeo) na *E.coli* dificulta os processos de purificação. Os *Bacillus* e *Lactobacillus* são os microrganismos utilizados para a expressão de xilanases heteróloga, pois são espécies capazes de realizar N-glicosilações e são consideradas seguras (GRAS), pois diferentemente da *E.coli*, não possuem endotoxinas e secretam a enzima produzida, o que beneficia os processos industriais (BHARDWAJ *et al* 2019).

A xilanase pode ser produzida em grandes quantidades por leveduras, esses microrganismos podem fazer modificações pós traducionais, glicosilação, podem crescer até chegar em densidades celulares muito altas e possuem a habilidade de secretar as proteínas no meio da fermentação. A *Saccharomyces cerevisiae* produz elevadas quantidades de xilanases no meio, e por ser um microrganismo bem estabelecido nas indústrias, o custo para a produção das xilanases a partir da levedura é baixo. A *Pichia pastoris* pode ser um ótimo hospedeiro para a produção de xilanase devido a sua elevada expressão através dos seus próprios promotores (MOTTA *et al* 2013). A característica mais significativa das leveduras como hospedeiro para expressão é graças ao AOX1, que é um promotor forte e regulador de álcool oxidases, esse promotor está envolvido na utilização da via do metanol, que fornece níveis muito elevados de proteínas recombinantes heterólogas (BASIT *et al* 2020).

A maioria das xilanases produzidas são em sistemas de fermentação submersa, quase 90% da total de vendas de xilanase, todavia as xilanases produzidas em fermentação em estado sólido são muito maiores do que na fermentação submersa (MOTTA *et al* 2013; BHARDWAJ *et al* 2019). As vantagens

do sistema de fermentação em estado sólido em comparação com a fermentação submersa são um baixo risco de contaminação, aumenta a estabilidade das enzimas, simula o ambiente natural do microrganismo, facilitação nos processos de “*downstream*” e as enzimas produzidas possuem alta atividade específica (BHARDWAJ et al 2019; MOTTA *et al* 2013).

A xilana é o melhor indutor para a produção de xilanases, porém devido ao seu tamanho molecular as células não conseguem absorver o polímero para que haja a indução a produção da enzima. Uma pequena quantidade de fragmentos de baixo peso molecular, como xilose, xilobiose e xilotriose é gerado a partir da uma pequena quantidade de enzimas produzidas no meio. Com essas moléculas de baixo peso molecular há a indução para aumentar a produção das enzimas xilanólíticas. As moléculas como a celulose, alquil sintético, aril β -D xilosídeos e metil β -D-xilosídeo podem também atuar como indutoras para a produção de xilanases.(BHARDWAJ et al 2019). A mutação de microrganismos com radiação UV e por agentes químicos podem aumentar a produção de xilanases. Os microrganismos *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium digitatum* aumentaram a produção de xilanase através de mutações com radiações UV e a com MNNG. (BHARDWAJ *et al* 2019)

3.2.2. Aplicação industrial das xilanases

Devido a complexidade da xilana que possui diversas estruturas com diferenças físico químicas entre elas, há diversas xilanases para diferentes finalidades. Como algumas ligações em lignocelulose não estão facilmente acessíveis, é necessário um sistema enzimático que é especializado em diferentes ligações para atingir uma boa hidrólise da xilana (MOTTA *et al* 2013). A grande variedade de xilanases é devido a natureza heterogênea da xilana, o que resulta na redundância de expressão de genes nos microrganismos e modificações pós traducionais, como a glicosilação e proteólisis, essas características podem gerar multiplicidade das xilanases (MOTTA *et al* 2013). O uso de xilanases em indústrias começou no ano de 1980, e conforme os anos, o uso de xilanases cresceu consideravelmente. Suas aplicações são na preparação de ração animal, na indústria alimentícia, indústria têxtil, em biorrefinarias e na indústria de papel e celulose (BHARDWAJ *et al* 2019).

3.2.2.1. Indústria alimentícia

A principal propriedade das xilanases utilizadas na indústria alimentícia é ter o pH ótimo de atividade e sua estabilidade em ambientes ácidos (HARRIS, 2010). As xilanases atua na hidrólise da hemicelulose na farinha de trigo, o que resulta em uma melhor redistribuição da água presente, ajudando a criar uma massa mais macia e mais fácil de ser trabalhada, as enzimas xilanolíticas ajudam a atrasar a formação da crosta no processo de cozimento dos pães (HARRIS, 2010). O resultado das xilanases nas massas de pães ocorre uma melhora na resistência à fermentação, maior absorção de água e aumenta o volume de pães, além de aumentar a concentração de arabinosiloligossacarídeos nos pães, que são saudáveis (HARRIS, 2010). A quebra de hemicelulose pela enzima transforma o polissacarídeo insolúvel em uma forma solúvel, o que ajuda na ligação da água na massa, resultando em uma massa mais macia, flexível e estável (HARRIS, 2010). A xilanase na fabricação de bolachas deixam as massas mais leves, melhoram a textura, a palatabilidade e ajuda na uniformidade das wafers (HARRIS, 2010). As xilanases, junto com as celulases, amilases e pectinases, ajudam no aumento da eficiência da extração de sucos através da liquefação de frutas e vegetais; estabilizam da polpa dos frutos; extração de vitaminas, sais minerais, óleos essenciais; aumenta a recuperação de aroma; redução da viscosidade e ajudam na clarificação dos sucos (HARRIS, 2010).

Na produção de cerveja as xilanases são utilizadas para hidrolisar arabinosilanos para diminuir os oligossacarídeos presentes no meio, com isso a turbidez da cerveja diminui junto com a viscosidade da cerveja (BHARDWAJ *et al* 2019). E a alpha-L- arabinofuranosidase e b-D-xilosidases são utilizadas para a aromatização de frutas, vinhos e sucos (HARRIS, 2010).

3.2.2.2. Alimentação animal

A enzima quebra o arabinosilano presente no material, reduzindo sua viscosidade, com a aplicação das enzimas na ração animal, houve ganho de peso dos animais. A degradação do arabinosilano melhora a digestão em uma dieta de animais monogástricos. A ECONASE XT, uma endo-1,4- β -xylanase conhecida

comercialmente, é utilizada como aditivo alimentar para a engorda de galinhas e porcos, como também ajuda na desmama de porcos (BHARDWAJ *et al* 2019).

3.2.2.3. Indústria de papel e celulose

As xilanases são utilizadas para hidrolisar a xilana presente na polpa da madeira, que está ligada com a celulose e a lignina. Com a quebra da xilana, a lignina se separa da celulose, melhorando a fibra e a extração de lignina da polpa, esse processo enzimático é conhecido com Bio-bleaching (BHARDWAJ *et al* 2019). O branqueamento é um processo que necessita de grandes quantidades de agentes clorais, porém com a ação de enzimas ligno-hemicelulolíticas, que inclui as xilanases, o processo se torna mais seletivo, não tóxico e gera menos efluentes. As xilanases em conjunto com enzimas que degradam a lignina ajudam no aumento do brilho da polpa. A exposição à hidrólise enzimática melhora a resistência do papel (BHARDWAJ *et al* 2019).

As xilanases no Bio-bleaching necessitam de estabilidades em elevadas temperaturas e em pHs alcalinos. Uma enzima alcalina termoativa provida de *Bacillus*, foi utilizada no Bio-bleaching em uma temperatura de 60°C em uma faixa de pH de 6-10 (BHARDWAJ *et al* 2019). O *Bacillus licheniformis* produzindo uma xilanase estável em ambientes alcalinos foi utilizado na polpa de eucalipto no pré-tratamento do bleaching (BHARDWAJ *et al* 2019). As xilanases podem ajudar na geração de nanofibras celulósicas o que aumenta a cristalinidade do bagaço de eucalipto não submetido pelo branqueamento (BHARDWAJ *et al* 2019). As indústrias de papel e celulose em vários países estão substituindo os agentes químicos utilizados no branqueamento por xilanases, o Canadá que é um dos maiores produtores mundiais de polpa, 10% de sua produção é através do uso xilanases (BHARDWAJ *et al* 2019).

As xilanases junto com lacases são utilizadas para a remoção de tintas nos efluentes da indústria de papel e celulose. A remoção da tinta nos papéis é necessária para a reciclagem e reuso do material, da mesma forma que é utilizado do branqueamento, agentes químicos clorais ou derivados são utilizados para a realização desse deslocamento da tinta. Porém o conjunto enzimático das xilanases e lacases com aplicações de métodos como ultrassom e com microondas

mostraram um aumento no brilho de diversos resíduos de papéis (BHARDWAJ *et al* 2019).

3.2.2.4. Indústria Têxtil

Para o uso das xilanases nesse setor industrial é necessário de termo-estabilidade em ambientes alcalinos para que os processos de limpeza e desengomagem. A xilanase termofílica-alcalina do *Bacillus stearothermophilus* ajudou na força do material e no aumento do valor de lacrimejamento, melhorou o índice de alvura geral nos tecidos de algodão e micropólio (BHARDWAJ *et al* 2019). As xilanases de *Bacillus pumilus* junto com surfactantes aumentaram o brilho, o branco e diminuíram o amarelado em comparação com agentes químicos utilizados nos métodos de limpeza (BHARDWAJ *et al* 2019).

3.2.2.5. Indústrias químicas e farmacêuticas

As xilanases são utilizadas no processos de síntese de xilooligossacarídeos (XOS) através da hidrólise enzimática de resíduos agrícolas ricos em hemicelulose, esses resíduos podem ser provenientes de diferentes setores agrícolas como de madeiras, espigas de milho, palha, farelos e o bagaço da cana de açúcar. Os XOS são moléculas de açúcar não digeridas constituídos de monômeros de xilose. Essas moléculas não são quebradas ou absorvidas pelo trato gastrointestinal, mas são muito importantes para a estimulação seletiva de microrganismos importantes para a saúde digestiva humana (BHARDWAJ *et al* 2019). O uso de XOS ajuda na redução de colesterol, inibe a retro-degradação do amido, aumenta a biodisponibilidade do cálcio e melhora as propriedades sensoriais do alimento. Os XOS são utilizados na indústria farmacêutica pois são imunomoduladores, anticancerígenos, antioxidantes, antimicrobianos, antialérgicos e anti-inflamatórios (BHARDWAJ *et al* 2019).

3.2.2.6. Xilanases em biorrefinarias

As xilanases em conjunto com celulasas são muito importantes para a degradação de biomassa lignocelulósica em monômeros simples. Essa tecnologia é prioritária para a produção de combustíveis limpos de fontes renováveis. Porém devido ao elevado custo de produção, diversas estratégias são testadas para a

obtenção do combustível, processos como a fermentação e sacarificação simultâneas são uma dessas estratégias para tornar o processo viável. Diversas pesquisas mostram que essa tecnologia com diferentes abordagens pode ser utilizada para esse avanço tecnológico na produção de biocombustíveis (BHARDWAJ *et al* 2019).

3.3. Filtração

A filtração é uma unidade de operação utilizada em vários estágios do “*downstream*” a fim de separar, concentrar e purificar os produtos, geralmente todo processo de produção de bioproduto apresenta uma ou mais tipos de filtração. A filtração é uma unidade de operação para separação de componentes sólidos presentes no caldo através da diferença de pressão entre a membrana, e o uso desse processo pode ser para remoção de partículas ou células, concentração de proteínas, recuperação de precipitados, clarificação de solventes, remoção de vírus, dessalinização e troca de tampões. Essa operação unitária é muito utilizada nas indústrias de biotecnologia devido às baixas temperaturas empregadas, o baixo consumo energético e não possui agentes químicos que podem interagir com o bioproduto, essas qualidades são essenciais para que não ocorra a desnaturação, destruição ou desativação dos bioprodutos (CHARCOSSET 2006). A filtração é utilizada frequentemente nos estágios iniciais da purificação de bioprodutos, pois assim garante que as maiores impurezas podem ser removidas no processo, tornando assim a solução preparada para os processos subsequentes da purificação, um exemplo da função descrita é a utilização da microfiltração para garantir esterilidade da solução, pois garante a remoção completa de microrganismos presentes, a mesma operação pode ser empregado para a remoção de vírus de culturas de células, essas membranas precisam ter um tamanho que podem variar de 12 a 300 nm. (CHARCOSSET 2006) A dessalinização pode ser feita através da ultrafiltração, que possibilita a remoção do tampão presente por outro (CHARCOSSET 2006).

Existem basicamente dois modelos dessa unidade de operação, a filtração convencional e filtração em fluxo cruzado (ou tangencial) e os processos de filtração são diferenciados pelo tamanho das partículas retidas e as pressões operacionais dos sistemas. Ilustradas na Tabela 4. A filtração convencional é utilizada para a

clarificação de fluidos, já que as partículas presentes no meio não correspondem a 1 % do peso total do fluido (GHOSH, 2006). Na maioria dos processos de clarificação as partículas presentes no meio penetram na membrana e ficam retidas para assim formar uma torta porosa, isso resulta em uma torta seca, compacta e fragmentada. Devido a retenção das partículas a torta formada fica mais espessa, e conforme há esse aumento de espessura o fluxo de fluido filtrado diminui, (figura 5) (DORAN, 2013). Em grande escala, a filtração convencional não garante esterilidade, e para atender essa necessidade, a microfiltração é uma opção melhor (DORAN, 2013).

Tabela 4: Os processos de filtração com os diferentes parâmetros para sua operação (DORAN, 2013)

Processos	Tamanho das Partículas Retidas	Pressão operacional
Filtração Convencional	1 mm - 1 μm	<0,5 atm
Microfiltração	10 μm - 0,2 μm	0,5 a 2 atm
Ultrafiltração	0,1 μm - 0,001 μm	2 a 10 atm
Osmose Reversa	10 A - 1 A	20 a 100 atm

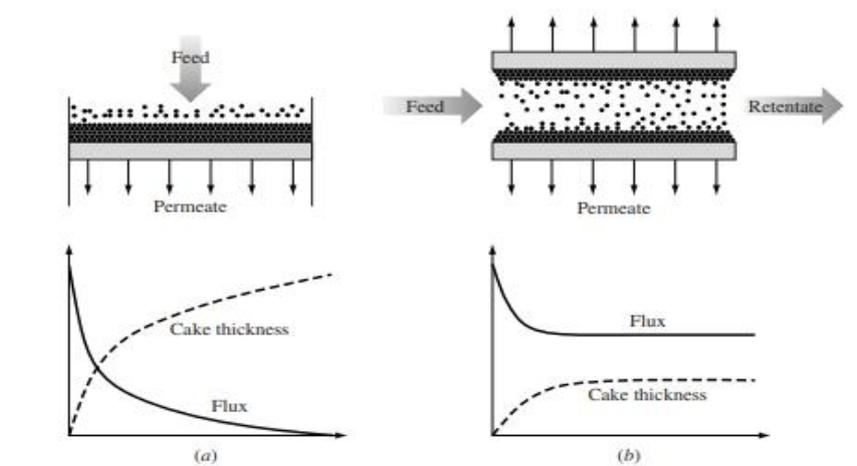


Figura 5: Ilustração da formação de torta e o decaimento do fluxo (a) da filtração convencional e (b) da filtração tangencial (HARRISON *et al* 2015)

3.3.1. Filtração Tangencial

Um modelo possível para o processo de filtração é através da configuração em fluxo cruzado, no qual o escoamento do fluido a ser filtrado é paralelo à membrana e perpendicular ao fluido filtrado. O material que atravessa a membrana é chamado de *permeado* e os outros compostos que não são filtrados de *retidos*. A principal vantagem que esse modelo apresenta em relação ao convencional é que a formação da torta é retardada devido que o material retido passa junto com o fluxo paralelo à membrana, ou seja há um mecanismo de limpeza da superfície membranar retardando também o decréscimo do fluxo do permeado. Na figura 6 há os modelos de filtração convencional e filtração tangencial, figura retirada no livro “Bioprocess Engineering Principles Doran 2013

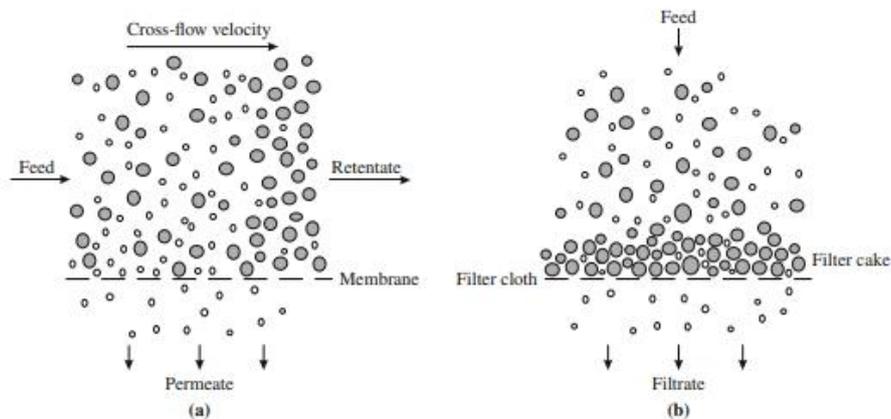


Figura 6: Ilustração dos esquemas de operação (a) que ilustra a operação de filtração de fluxo cruzado e (b) ilustra a operação de filtração convencional (DORAN, 2013)

A filtração tangencial depende muito da taxa de material retido que é retirado da superfície membranar, minimizando a formação da torta. Devido que o fluxo do permeado é muito menor que o fluxo dentro do sistema, a unidade de operação é realizada com a recirculação do material retido. Devido a decomposição desse material particulado no processo, a membrana empregada precisa ser robusta e confiável, pois será submetida a agentes químicos de limpeza, solventes, variações de pH e variações nas pressões operacionais (DORAN, 2013). As interações com esses fatores químicos e físicos são necessários para remover a torta formada na superfície da membrana no processo de filtração (DORAN, 2013). Existem cinco

tipos de modelos para a filtração de fluxo cruzado: em placa, fibra oca, tubular, em espiral e rotativa.

3.3.2. Microfiltração

A microfiltração é capaz de remover partículas muito pequenas como bactérias, proteínas e leveduras. A habilidade de remover uma elevada quantidade de contaminantes em grande escala torna a microfiltração eficaz e versátil para diversas aplicações (ANIS *et al* 2019). O uso dessa operação por membrana pode ser em indústrias farmacêuticas, alimentícias, biotecnológicas e para o tratamento de águas. Em 1855 as membranas de nitrato de celulose foram registradas por Frick, e o uso dessa tecnologia em grande escala foi utilizada em 1970s em indústrias farmacêuticas e em indústrias de microeletrônicas (ANIS *et al* 2019). Diversas mudanças foram atribuídas nas membranas ao decorrer dos anos para aumentar a performance da filtração, e devido a essas qualidades e a evolução dessa tecnologia possibilita diversas aplicações para a microfiltração (ANIS *et al* 2019).

A maioria dos documentos publicados a respeito de microfiltração são sobre as áreas de engenharia química, engenharia de materiais e química no período de 2009 a 2018. E a maioria dessas pesquisas são a respeito de fabricação e modificações das membranas, processamento de águas e estudos da formação e estrutura da torta formada (ANIS *et al* 2019). A decomposição de várias partículas reduzem a permeabilidade da membrana com o bloqueio dos poros, isso resulta também na diminuição da vida útil da membrana. A microfiltração possui um grande número de publicações e de aplicações em diversas indústrias, e atualizações sobre esse modelo operacional é uma tendência para atender algumas demandas que foram geradas conforme os anos. Nisso se destaca que entre os tópicos de pesquisa mais abordados estão relacionados com a performance e a formação da torta na superfície membrana, então estratégias e modelos diferentes para de modo geral melhorar o processo de microfiltração é uma tendência (ANIS *et al* 2019).

3.3.3. Ultrafiltração

Esse método de filtração é uma excelente técnica de separação que é utilizada há mais de um século. Como visto pela tabela 4, as pressões operacionais nesse sistema são bem elevadas para separar as partículas de alto peso molecular. Os fatores que influenciam nos processos são as características da membrana, a estrutura molecular das partículas, carga, e as condições hidrodinâmicas, as possíveis reações entre as partículas e a membrana podem diminuir a eficiência máxima do processo (AL AANI *et al* 2020).

As aplicações do sistema de ultrafiltração aumentaram no decorrer dos anos, pois a procura de uma tecnologia de separação eficiente, com baixo custo e com uma vida útil da membrana satisfatória, são qualidades que o mercado atual valoriza. Essa valorização dessa técnica acompanha o aumento da preocupação do meio ambiente em relação ao tratamento de águas (AL AANI *et al* 2020). Em 2017 o mercado de ultrafiltração foi estimado em USD 950.0 MI, e está projetado para 2023 para alcançar um valor de USD 2,140.1 MI (AL AANI *et al* 2020).

Essa técnica de separação é empregada em processos de desinfecção, purificação e concentração de macromoléculas, como proteínas nas indústrias alimentícias (AL AANI *et al* 2020). Outras aplicações comuns para a ultrafiltração são para a remoção de vírus, bactérias, tingimentos para as indústrias metalúrgicas e têxtil. O uso da ultrafiltração em relação a outras técnicas convencionais de purificação e desinfecção é devido a simplicidade, baixo custo energético, operações em temperaturas baixas, sem agentes químicos e com poucos métodos de controle do processo (AL AANI *et al* 2020). Essas características do processo de ultrafiltração garante além de elevada qualidade para o processo de “*downstream*”, como também introduz tecnologias para facilitar o reuso de água para várias indústrias, tornando-a “*Eco-friendlier*” (AL AANI *et al* 2020).

Entre as pesquisas realizadas no sistema de ultrafiltração se destacam as seguintes pesquisas: *fouling*, modelagem, tratamento de água e otimização. E as áreas na qual essas pesquisas são direcionadas são as: Química, Engenharia química, Ciência ambiental, Medicina e Bioquímica/genética (AL AANI *et al* 2020). Como visto nas outras técnicas de filtração, a formação de torta é o principal

problema dos processos de filtração. Cerca de 20% da maioria das publicações são relacionadas à limpeza da membrana, visando a minimizar os efeitos permanentes que a formação das tortas ocasiona à membrana e restabelecendo a sua eficiência (AL AANI *et al* 2020).

3.3.4. Propriedades das membranas

As membranas para processos de filtração são feitas de uma grande variedade de materiais, incluindo a cerâmica, polissulfona, poliamida, acetato de celulose e poliacrilonitrila. Uma membrana ideal necessita além de ser capaz de reter as partículas na solução e possibilitar altas taxas de vazão do filtrado, deve apresentar resistência a variações na temperatura e no pH, as pressões operacionais e apresentar alta resistência mecânica (DORAN, 2013).

As membranas de filtração além de apresentarem diferentes modelos ao processo podem conter três tipos morfológicos, membranas simétricas, assimétricas e compostas. Uma membrana simétrica é aquela em que os diâmetros dos poros são constantes em ambos os lados, as membranas assimétricas são formadas por poros que aumentam de diâmetro para o lado do filtrado, e as membranas compostas que são membranas com poros de diâmetros uniformes e com poros que aumentam à medida que o fluido avança (DORAN, 2013).

Nas membranas simétricas é difícil a remoção das partículas retidas dentro da membrana, devido a isso as membranas ficam progressivamente entupidadas e menos eficientes, até um ponto em que a membrana se torne irreversivelmente bloqueada (DORAN, 2013). As membranas assimétricas devido ao aumento dos poros possibilita alta permeabilidade e taxas de filtração mais rápidas do fluido. A camada ultra fina de 0,1 a 1 μm presente na superfície das membranas assimétricas retém as partículas do caldo, essas moléculas retidas que entram nas membranas simétricas causando seu entupimento progressivo (DORAN, 2013). A lavagem da membrana assimétrica é mais simples, pois apenas a superfície necessita de tratamento para a remoção de todo material residual (DORAN, 2013).

Como dito anteriormente, o maior problema da filtração é a formação da torta sob a membrana, as substâncias orgânicas depositadas na superfície da membrana possuem uma estrutura gelatinosa, que resulta na diminuição do fluxo do permeado

(DORAN, 2013). Para aliviar a formação da torta diversas abordagens são estudadas como a alteração do sistema hidráulico, mudando o material das membranas e a adição de coagulantes, adsorventes ou floculantes. Os floculantes são agentes que reduzem as repulsões eletrostáticas, resultando na predominância das forças atrativas de Van der Waals e com isso ocorre a formação de conglomerados mais largos e densos resultando em uma filtração mais facilitada (WANG *et al* 2016; HARRISON *et al* 2015).

3.3.5. Cinética da Filtração

A filtração é descrito através da lei de Darcy, em que descreve o fluxo do líquido pelos poros da membrana, que é descrita como:

A cinética do processo de filtração é através da Lei de Darcy (HARRISON *et al* 2015):

$$\frac{1}{A} \frac{dV}{dt} = \frac{\Delta p}{R\mu_0} \quad (4)$$

$$J = \frac{1}{A} \frac{dV}{dt} \quad (5)$$

A – Área(m^2); V – Volume(m^3); t – tempo(s); p – Pressão (Pa); J – Fluxo do permeado (m/s)

R – Resistências do sistema (m^{-2}); μ_0 – Viscosidade do Fluido (kg/m^3)

A partir da equação 4, na qual o fluxo do permeado do sistema de filtração é resultado da diferença de pressão do sistema em relação a viscosidade e as resistências no sistema. Essas resistências são divididas em duas, a resistência da torta e a resistência do meio filtrante, ambas estão demonstradas nas equações 7 e 8 em seguida (HARRISON *et al* 2015).

$$R = R_1 + R_2 \quad (6)$$

$$R_1 = \frac{\mu \alpha c_s V}{A^2} \quad (7)$$

$$R_2 = \frac{\mu R_m}{A} \quad (8)$$

R – Resistência total do sistema; R_1 – Resistência da Torta; R_2 – Resistência do meio;

μ – Viscosidade do filtrado; α – Resistência específica da torta; c_s – Concentração de Sólidos ;

A – Área da membrana; R_m – Resistência específica da membrana

A equação geral da velocidade da filtração mais as resistências ficam como:

$$\frac{dv}{dt} = \frac{\Delta p}{\frac{\mu \alpha c_s V}{A^2} + \frac{\mu R_m}{A}} \quad (9)$$

Para o cálculo da resistência específica da torta e da resistência do meio filtrante, é possível obter as duas variáveis através de uma análise linear entre o tempo total da filtração sob o volume (HARRISON et al 2015). A Figura 7 e as equações 10 a 12 demonstram a análise para o cálculo das variáveis.

$$\frac{t}{V} = \frac{K_p V}{2} + B \quad (10)$$

$$\frac{K_p}{2} = \frac{1}{2} \frac{\mu \alpha c_s}{A^2 (-\Delta p)} \quad (11)$$

$$B = \frac{\mu R_m}{A (-\Delta p)} \quad (12)$$

K_p – Coeficiente angular da reta; B – Coeficiente linear da reta;

Desta forma é possível analisar de forma completa todo o perfil de filtração, analisando as diferenças entre as tortas formadas e as características de diferentes experimentos.

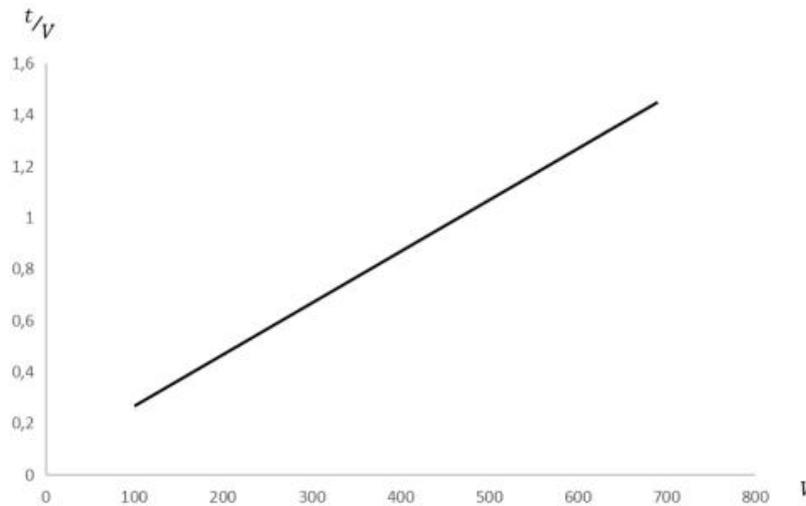


Figura 7: Gráfico do da linearização da filtração para encontrar as variáveis K_p e B

3.4. Floculantes

A remoção de resíduos sólidos é um desafio para diferentes áreas, principalmente na era pós industrialização, em que o tratamento de águas residuais se tornou mais complexa devido a grande variedade de contaminantes orgânicos e inorgânicos presentes. Para remoção desses sólidos dispersos na solução é necessário um agente de aglutinação para estabilizar esses sólidos em uma conglomerado, na qual tem uma massa maior e por consequência uma maior velocidade em sua sedimentação. O uso de floculantes é um método eficiente, barato e de baixo impacto ambiental, pois consiste na adição de eletrólitos que reduzem as repulsões eletrostáticas e promovem a formação de colóides mais densos e largos (HARRISON *et al* 2015; LEE *et al* 2014).

Existem basicamente três tipos de agentes coagulantes, os inorgânicos, polímeros orgânicos e de origem microbiana. Os floculantes inorgânicos são sais metálicos, esses cátions metálicos neutralizam as cargas na superfície das células e fazem a ligação entre as células para formar os conglomerados de células. A maioria desses floculantes inorgânicos são constituídos de alumínio ou ferro devido a seu baixo custo, segurança e eficiência, esses floculantes são amplamente utilizados na remoção de partículas coloidais de águas residuais (LEE *et al* 2014). É necessário uma alta concentração desses floculantes em soluções com uma alta força iônica para coagular as células presentes no meio (LEE *et al* 2014). De modo

geral, os sais de alumínio são mais eficientes do que os sais de ferro e zinco por causa do tamanho do raio iônico do alumínio que resulta uma mais alta densidade de carga superficial (LEE *et al* 2014). Os Floculantes orgânicos são polímeros que podem ser sintéticos ou de origem natural, alguns desses polímeros podem carregar uma carga aniônica ou catiônica, em que recebem o nome de polieletrólitos ou podem ser polímeros sem cargas iônicas (LEE *et al* 2014). Os polieletrólitos agem com a neutralização das cargas celulares, o que forma a união das partículas em flocos, a efetividade dos floculantes depende da massa molar ou do comprimento de sua cadeia polimérica, a densidade de carga do polímero, a dose utilizada, a concentração de biomassa na solução, a força iônica, o pH da solução e a agitação do meio. Polímeros com alto peso molecular são melhores agentes para a ligação das moléculas e polímeros com alta densidade de carga são melhores para neutralizar as cargas nas superfícies celulares, o que aumenta a eficiência da floculação (LEE *et al* 2014).

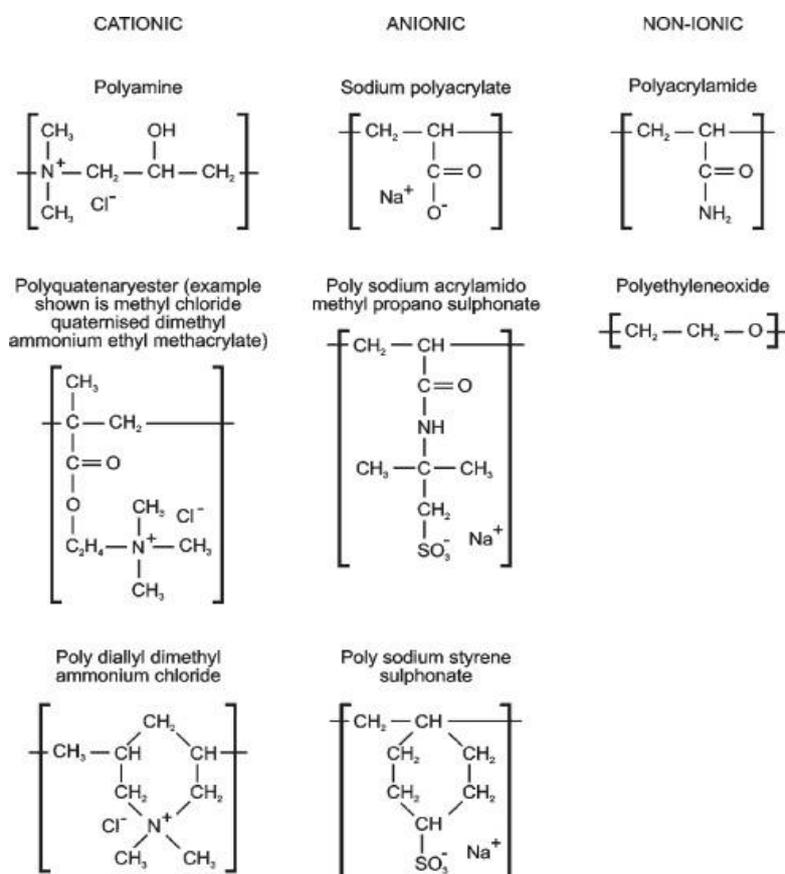


Figura 8: Exemplos de polieletrólitos catiônicos, aniônicos e sem cargas

3.4.1. Aplicação de Floculantes

A principal aplicação dos floculantes é no tratamento de águas residuárias, pois os resíduos das indústrias podem conter sólidos suspensos pequenos, sólidos dissolvidos, partículas orgânicas e inorgânicas, metais e outras impurezas. Os floculantes conseguem aglomerar as partículas para formar uma massa mais pesada que facilita a sua remoção. É um método simples e eficiente para o tratamento de efluentes, e os resíduos das indústrias têxtil, de papel e celulose e provenientes de resíduos oleosos são alguns exemplos na qual há o uso desses floculantes (LEE *et al* 2014).

Ultimamente o uso de floculantes poliméricos são preferíveis aos coagulantes inorgânicos, como o sulfato de alumínio e o cloreto de ferro para a maioria dos tratamentos de efluentes de águas residuárias, pois esses os floculantes são mais eficientes e facilitam o processo de separação do que os coagulantes inorgânicos. Subsequentes da aplicação dos floculantes, os processos de sedimentação, flotação e filtração são estágios que acompanham a utilização desses agentes coagulantes (LEE *et al* 2014).

Para a utilização de floculantes nos processos de microfiltração é importante ressaltar que a microfiltração é muito dependente do tamanho e distribuição das partículas pela membrana. Geralmente partículas maiores resultam em uma melhor performance de filtração, porém alguns estudos mostraram que com o aumento das partículas após o processo de floculação comprometem a performance da microfiltração (KARIM *et al* 2008). A membrana das bactérias possuem diferentes grupos químicos que podem ser ácidos ou básicos, estes grupos podem alterar a carga da superfície conhecida como potencial Zeta (HALDER *et al* 2015). Portanto, conhecer o potencial Zeta da bactéria para sua conglomeração é essencial. A *E.coli* é uma bactéria gram-negativa que possui um potencial zeta negativo em pH neutro, então para a floculação da *E.coli* é necessário a utilização de floculantes catiônicos para neutralizar as cargas e favorecer a aglomeração (NG; TING, 2017)

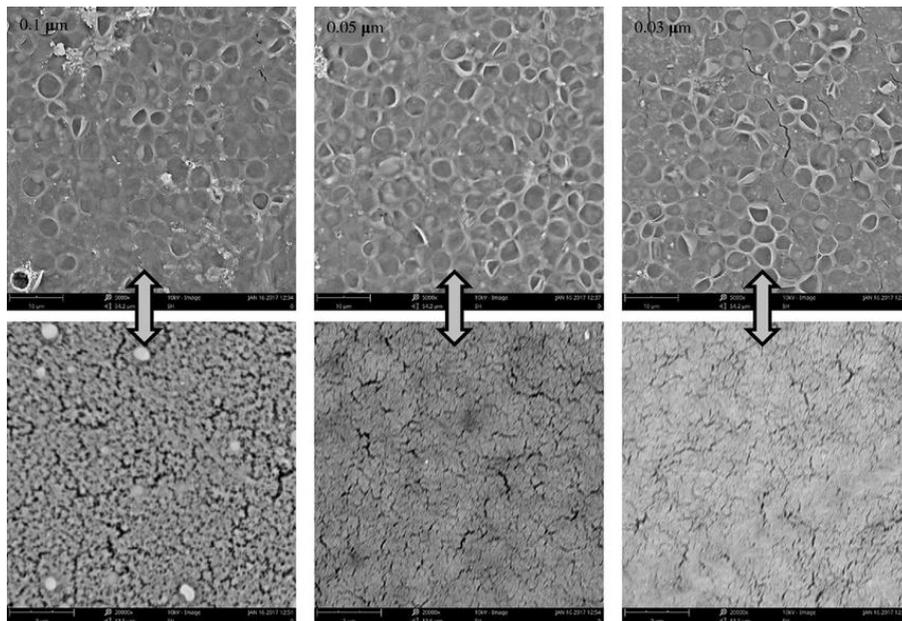


Figura 9: Comparação entre as células com flocculantes (de cima) e sem flocculantes (de baixo) em membranas de microfiltração (ZHAO *et al* 2017)

3.4.2. Interação dos flocculantes com Proteínas

As proteínas são constituídas por ligações de aminoácidos, e que suas sequências determinam a estrutura terciária da proteína, responsável pelo sítio ativo da enzima (Lewis, 2021). A estrutura da proteína é estabilizada através de interações fracas, como pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e interações de Van der Waals (HARRISON *et al* 2015). Essas interações fracas podem ser alteradas, alterando a estrutura da proteína, isso acarreta em uma maior ou pior interação entre o substrato e a enzima. Essas mudanças podem ocorrer com mudanças no pH e na temperatura (ACHAZI *et al* 2021).

Como os polieletrólitos possuem cargas e influenciam diretamente com forças que estabelecem a estrutura da enzima, pode ocorrer a formação de um complexo entre a proteína e o flocculante (ACHAZI *et al* 2021).

Os polieletrólitos catiônicos ou aniônicos através de suas cargas, podem interagir com proteínas dispersas no meio. Estudos mostraram que interações iônicas com as proteínas e diversos polieletrólitos formam esses complexos. Um estudo realizado com polieletrólitos lineares com a albumina de soro bovino (BSA)

mostrou que é favorável a formação do complexo utilizando a calorimetria de titulação isotérmica (BALL *et al* 2002). Em um estudo de SHALOVA (2007), os complexos entre as enzimas impediram a agregação térmica mas não da desnaturação da enzima, e que esse complexo poderia ser destruído através da adição de cloreto de sódio. Essa interação pode interagir com a proteína, com a alteração de sua estrutura, o que pode ocorrer uma desnaturação parcial ou um redobramento da proteína (ACHAZI *et al* 2021).

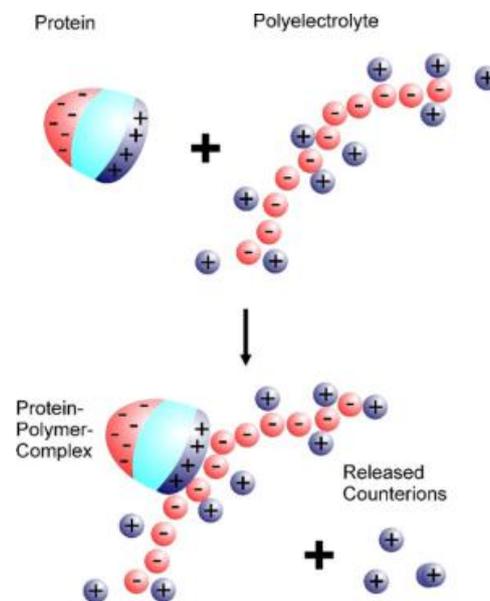


Figura 10: Interação entre uma proteína com um polieletrólito (ACHAZI *et al* 2021)

4. Materiais e Métodos

4.1. Preparação das células quimiocompetentes

Para a transformação de *E. coli* com DNA de interesse, foi utilizado 100 uL de células em estoque, preparado anteriormente e armazenado em ultra-freezer. Foi acrescentado 1 uL do plasmídeo e, em seguida, deixado no gelo por 20 minutos. Após os 20 minutos, foi realizado o “heat shock” a 42 °C por 90 segundos. Logo após, 800 uL de meio LB líquido foi adicionado e incubado por 1 h a 37°C e 200 rpm. Finalmente, 100 uL de células foram plaqueadas em meio sólido LB, contendo 100 uL de ampicilina, e deixadas durante a noite a 37 °C. O plasmídeo utilizado foi PT7T3BSA baseado no desenvolvido por RULLER *et al* (2005).

4.2. Produção de caldo de cultivo com células e enzimas

Após a transformação, foi preparado o pré-inóculo em um frasco tipo Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100mL de meio Luria Bertani (LB) composto de 10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 5 g de NaCl, na qual aproximadamente 10 colônias foram inoculadas. Em seguida, os frascos foram deixados em shaker, a 37 °C e 200 rpm, até atingir DO de 0,3. Finalmente foi preparado 2,5 L de meio de cultura SB composto de 35 g/L de triptona, 20 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de NaCl, os quais foram inoculados com 25 mL do pré-inóculo e cultivados no reator a 37 °C e 750 rpm durante 72h. Em todos os cultivos foram adicionados 50µL de ampicilina com concentração de 100 g/L para obter uma concentração nos Erlenmeyers de 1 g/L de ampicilina. Para atingir a concentração desejada foi adicionado 25 mL de ampicilina com concentração de 100 g/L era acrescentado a mesma quantidade de ampicilina a cada 24h de cultivo.

4.2.1. Preparação e utilização de células criogênicas

Para facilitar o processo de crescimento das células transformadas, tubos criogênicos de 2 mL foram preparados após o caldo atingir a DO de 0,3. Foi feita uma mistura na qual 20% do volume total no tubo era glicerol, os outros 80% consistia no caldo de cultivo. Cada tubo foi preparado com o volume de 1mL e para a sua utilização, o tubo era descongelado e despejado cuidadosamente dentro dos frascos tipo erlenmeyers de 250 mL de meio LB. Esse processo facilitava a organização e encurtava os processos subsequentes.

4.3. Determinação da atividade enzimática

Foram utilizados microtubos de 2,0 mL e identificados de acordo com a amostra, cada tubo foi composto de 90 µL de substrato Xilose 1% mais 10 µL de meio, sendo que o branco a amostra foi substituída por 10 µL de água destilada. Os tubos então foram submetidos por tratamento térmico a 55°C por 5 minutos, após o tempo estabelecido os microtubos foram colocados em gelo durante 5 minutos. Com as amostras em gelo foram adicionados 100 µL de DNS nos microtubos junto com agitação em vortex, os microtubos foram submetidos ao banho seco à 100°C por 5 minutos. Após o tempo estabelecido, os microtubos foram retirados do banho seco e inseridos em uma caixa de isopor com gelo por 5 minutos. Após o resfriamento das

amostras, estas foram adicionadas 1 mL de água destilada em cada microtubo, juntamente com agitação em vortex. Esse processo foi feito em triplicata para a redução dos erros experimentais. Cada microtubo foi realizado a leitura da absorbância no espectrofotômetro em 540 nm. 1 unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a produção de 1 micromol de xilose por minuto.

4.4. Procedimento da Filtração

O processo de filtração foi realizado utilizando membrana de fibra oca de 0,22 micrômetro de diâmetro de poro feita de polissulfona e uma área superficial de 1.100 cm^2 com uma diferença de pressão de 1,5 psi. Sendo assim, foram realizados um experimento sem a adição de floculante e com adição dos floculantes 17WATIPS611, SH, 17WATIPS610, sendo avaliado o fluxo de permeado com o tempo de processo. Para isso, foi determinado o volume de permeado com o tempo de processo, sendo que a vazão de permeado foi determinada pela equação 5

Com isso, foram avaliados os perfis de filtração com tempo de processo, o que permite determinar o melhor processo de filtração, ou seja, o melhor floculante para utilizar no processo de filtração. A massa de permeado foi determinada através de um sistema utilizando células de carga conectadas a um arduino com um sistema com sensor de peso HX711. Com isso, foi possível determinar a massa de permeado a cada 0,5 segundo e determinar a vazão e o fluxo do permeado com o tempo de processo. Para o cálculo da vazão do permeado, demonstrado pela equação 13, o período definido entre as análises foi de 10 segundos, pois assim garante uma curva mais suave e reduz os erros da medição do arduino. Com essa vazão era calculado o fluxo do permeado mostrado pela equação 14 e para uma análise mais pragmática, o fluxo médio foi calculado utilizando a teoria da média, calculando a integral do fluxo do permeado no período estipulado de 800 segundos, demonstrado pela equação 15. Para o cálculo das variáveis do sistema foi utilizado as equações descritas na seção 2.3.5 da cinética da filtração.

$$Q = \frac{\Delta V}{\Delta t} \quad (13)$$

$$J = \frac{Q}{A} \quad (14)$$

$$J_E = \left(\frac{1}{\Delta t}\right) \cdot \int_0^{800} J \cdot dt \quad (15)$$

Q – Vazão do Permeado (m^3/s); J_E – Fluxo médio do permeado (ml/s)

O esquema de filtração foi similar à figura 11 a seguir:

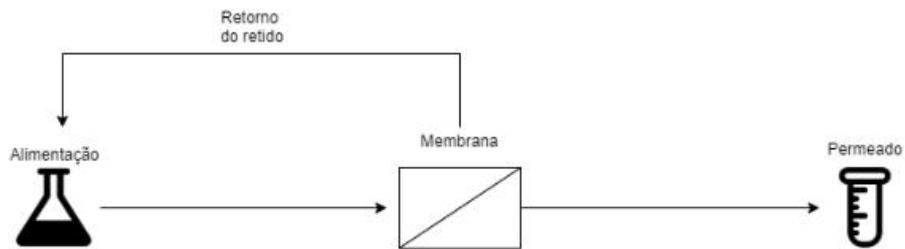


Figura 11: Esquema ilustrativo de como foi realizada a microfiltração.



Figura 12: Estrutura para a realização das microfiltrações

4.5. Estabilidade enzimática na presença de flocculante

Foi realizada uma mistura de 2,7 mL de caldo de cultivo junto com 0,3 mL do flocculante a uma concentração final de 1g/L. Essa mistura foi mantida a 27 °C e a atividade enzimática será então avaliada a cada 30 minutos, segundo protocolo descrito na seção 3.3, durante 4 horas, sendo que o tempo inicial foi o momento de adição da solução. Os flocculantes avaliados, 17WATIPS611, SH, 17WATIPS610, CTAB, Superfloc A 130 v, Al₂SO₄, PVA e Superfloc A 130 wv, são catiónicos pois a carga da membrana da *E.coli* no pH 7,0 é negativa. Todos os flocculantes foram cedidos pela Risework.

5. Resultados e Discussão

5.1. Análise da interação dos flocculantes com a xilanase

Os valores das atividades enzimáticas da xilanase foram de acordo com o esperado, com um valor de atividade enzimática em torno de 26 U/mL. A figura 13 mostra o perfil da atividade enzimática pelo tempo com os flocculantes. Na Tabela 9 no apêndice A apresenta os dados isolados de cada flocculante com o desvio padrão.

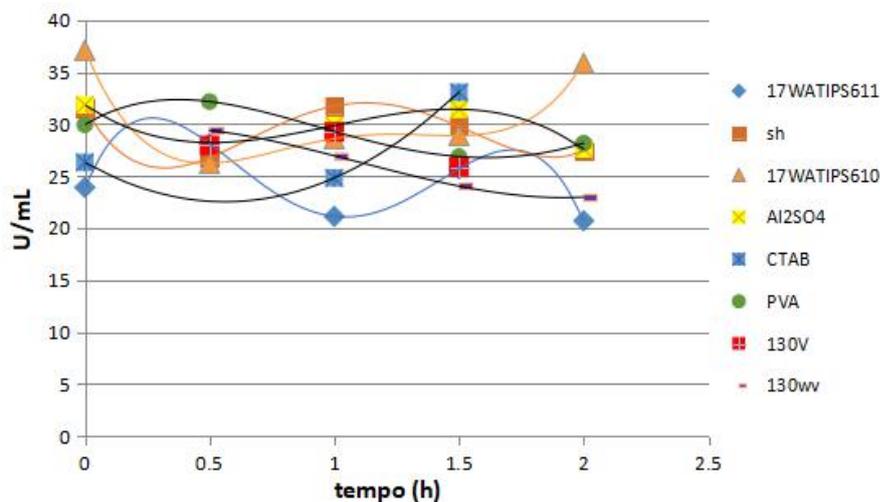


Figura 13: Atividade enzimática de acordo com o tempo com vários flocculantes

Comparando os valores obtidos de atividade enzimática nenhum teste com os flocculantes apresentou variações consideráveis para determinar que houve alteração da atividade da xilanase. As tabelas 10, 11 e 12 no apêndice A mostram as atividades enzimáticas de cada ponto, a atividade enzimática média do período de tempo, os desvios padrão de cada análise e o Z-score de cada absorbância

média. O Z-score é um valor que mostra quantos desvios padrão a atividade enzimática média daquele ponto está variando em relação com a média geral de todos os pontos. Esse valor é importante para avaliar se as variações dos diversos pontos estão dentro do desvio padrão, assim podemos determinar se os valores estão destoantes da média obtida. Como mostrado pela tabela 10 no Apêndice A, a grande maioria das atividades enzimáticas obtidas estão entre um valor de 0 e 1 do Z-score, indicando que as variações são devido ao método de análise da atividade enzimática. Os flocculantes 17WATIPS611, Sh, 17WATIPS610, PVA e Al_2SO_4 apresentaram os dados mais estáveis e os flocculantes CTAB, Superfloc A 130 v e Superfloc A 130 wv apresentaram variações consideráveis na atividade enzimática, mas não é determinante para mostrar que a atividade da enzima diminuiu. Morfologicamente todos os Flocculantes apresentaram agregados parecidos com exceção do flocculante CTAB, apresentou espuma e a formação de um sólido amorfo gelatinoso.

5.2. Resultados da Microfiltração

Os resultados dos experimentos das filtrações são mostrados na figura 14 e nas tabelas 5, 6 e 7 a seguir, sendo os resultados experimentais tratados conforme descrito nos materiais e métodos. Para uma análise mais uniforme foi utilizado como ponto inicial uma massa de permeado de 100g, pois foi nesse período inicial que houve o ajuste da pressão do sistema, logo, para maior uniformidade os primeiros pontos foram descartados e para todos os testes foi utilizado uma dosagem de 1000 ppm. A obtenção do fluxo do permeado foi feita através da medição da massa com um sistema arduino com célula de carga, o programa fazia a medição da massa em um período de tempo de 0,5s. A figura 12 mostra o sistema de filtração utilizado para a realização dos experimentos com os equipamentos cedidos pela RiseWork

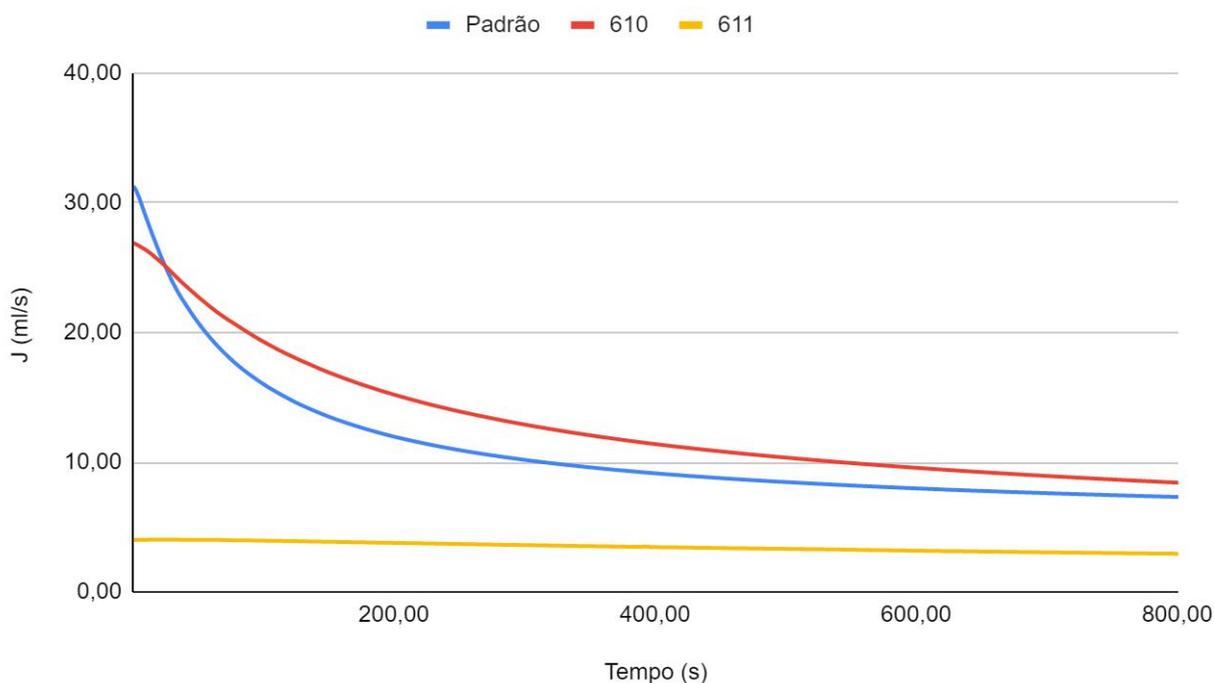


Figura 14: Gráfico do Fluxo do permeado da filtração com o tempo do experimentos sem floculante (padrão) e com floculantes 17WATIPS610 e 17WATIPS611(610 e 611)

Tabela 5: Tabela do fluxos de permeados dos experimentos em diferentes tempos

t(s)	J (ml/s)			ΔJ %		
	Padrão	610	611	Padrão	610	611
0	31,29	26,9	4,03	100%	100%	100%
50	20,71	22,72	4,03	66%	84%	100%
100	16	19,28	3,96	51%	72%	98%
200	11,97	15,21	3,79	38%	57%	94%
300	10,19	12,91	3,62	33%	48%	90%
400	9,16	11,4	3,47	29%	42%	86%
800	7,34	8,44	2,96	23%	31%	73%

Tabela 6: Tabela das variáveis calculadas em cada experimento

Variáveis da Filtração	Padrão	610	611	Unidades de Medida
K_p	8,95E+08	1,03E+09	2,56E+09	-
B	9,62E+05	2,18E+05	2,49E+06	-
α	6,67E+13	1,15E+14	1,20E+14	$\frac{m}{kg}$
R_m	2,26E+08	4,14E+11	4,72E+12	m^{-1}
C_s	2,8	1,44	4,44	$\frac{kg}{m^3}$
R_1	2,50E+10	3,33E+10	6,39E+10	$\frac{kg}{h^2m^5}$
R_2	2,41E+06	3,76E+09	4,29E+10	$\frac{kg}{m h^3}$

Tabela 7: Fluxo médio dos experimentos

Fluxo do Permeado Médio	Experimentos		
	Padrão	610	611
J_E (mL/s)	11,039	13,096	3,495

Os fluxos dos permeados mostram que houve diferenças entre os floculantes, porém o experimento com o floculante SH não foi possível analisar de forma mais detalhada como os outros dos floculantes, 610 e 611. Nesse experimento com o floculante SH o permeado começou a ser contabilizado após 3 minutos do começo do experimento. Nenhum dos outros experimentos apresentou esse tipo de atraso, essa diferença pode ser devido a estrutura da torta formada com o floculante SH, que em vez de ajudar a filtração prejudicou o fluxo do permeado. A concentração celular no experimento com o floculante SH foi em torno de 1g/L, bem a baixo das concentrações dos outros floculantes, indicados pela tabela 6, o que dá mais força a hipótese de que o floculante dificultou o processo de microfiltração em vez de melhorá-lo.

Conforme a tabela 5 é notável que houve uma diferença significativa entre experimento padrão e com o floculante 610, o que já era esperado. O experimento com a adição do floculante 611 teve um resultado muito inferior ao esperado, esse comportamento pode se dar graças a um aumento considerável das células presentes na solução. Outra possibilidade pode ser que com o aumento dos tamanhos das partículas após o processo de floculação compromete o processo de filtração (KARIM *et al* 2008). De qualquer maneira, após a análise dos experimentos, um ponto de melhoria seria a uniformidade da concentração celular das soluções, que é muito importante para avaliar de forma minuciosa as interações dos floculantes aplicados com o processo de microfiltração.

Na tabela 5 fica evidente essa diferença entre os fluxos dos permeados, sendo que é possível notar que a redução do fluxo do floculante 610 foi menor do que o experimento padrão, essa diferença equivale a um aumento médio de 10% de fluxo permeado. Estudos de KARIM *et al* (2008) mostram que a uma dosagem de 2500 ppm de uma mistura dos floculantes de 30% Mannich Y (Poliacrilamida) e 70% de Cysep 349 (Poliamina) o fluxo do permeado foi significativamente melhorado, pois após 50 minutos de operação, o fluxo do permeado com floculante foi 3 vezes mais do que o fluxo de permeado sem o processo de floculação. Os valores de fluxo médio do permeado mostrados na tabela 7 mostram de forma pragmática o aumento de performance dos experimentos, com o floculantes de 610 o experimento teve um aumento de 18% em comparação ao experimento sem floculante.

A resistência específica da torta (α) e a resistência específica da membrana filtrante (R_m) crescem quando há o incremento do floculante, o que é interessante pois as resistências são inversamente proporcionais ao fluxo do permeado (eq 4). Na equação (7) mostra as variáveis para obter a resistência da torta, O α depende da forma, densidade e do tamanho das partículas no sistema. Com esse aumento do α indica que o floculante agregou as células para gerar conglomerados maiores e mais pesados (Doran, 2013). No experimento com o floculante 611 a alta concentração celular em comparação entre os outros experimentos apresentou um aumento considerável da resistências α e R_m , além do incremento do floculante que gerou agregados maiores e densos. (Doran, 2013)

A dosagem foi fixada em 1000 ppm para todos os experimentos a fim de se obter uma avaliação mais precisa e de acordo com a literatura é a concentração padrão para floculação de diversas substâncias. De forma qualitativa todos os floculantes testados com concentração de 1000 ppm apresentaram aglomerados grandes e densos, porém testes com uma dosagem maior, tanto na realização dos testes das interações dos floculantes com a enzima como no processo de microfiltração, poderiam ser obtidos resultados mais expressivos.

5.3. Recuperação da xilanase

Durante os experimentos de filtração foram medidas as atividades enzimáticas da xilanase antes da filtração, depois da filtração e do retido dentro da membrana. A tabela 8 são os dados obtidos desses pontos.

Tabela 8: Atividade enzimática em diferentes períodos da filtração

Período	Concentração (U/mL)				Atividade (U)			
	Padrão	610	sh	611	Padrão	610	sh	611
Pré-Filtração	34,931	38,199	33,115	18,41	2682	2933	2543	1413
Permeado	32,244	31,3	27,996	16,34	2475	2403	2150	1254
Recuperação (%)	-	-	-	-	92	82	84	88

Em todos os experimentos houve cerca de 80 a 90 % de recuperação da atividade enzimática, porém os valores de atividade no retido na membrana são distintos dos esperados. Essa diferença pode ser devido que na coleta desse ponto as enzimas remanescentes do caldo estavam presentes junto com as proteínas teoricamente retidas na membrana. Obviamente que o poro de 0,22 um é suficiente para passar a xilanase porém o artigo de BOWEN (1992) indicam que há esse decaimento de atividade enzimática após o processo de filtração e o contato prolongado da enzima com a membrana pode ocorrer um efeito adsortivo que pode causar perdas na atividade enzimática mesmo em um estado estável. A perda de atividade pode ser maior se a enzima não estiver estável em solução, o que pode ocorrer com a interação entre as enzimas e os floculantes utilizados. Porém, novamente a comparação entre os experimentos com e sem os floculantes indicam

que esses coagulantes testados não apresentaram interações para agravar a perda de atividade da enzima no processo de microfiltração. Outro efeito que pode ter acontecido é a deposição e adsorção da proteína na membrana, esse acúmulo da proteína na superfície da membrana reduz o fluxo do permeado, aumentando a resistência hidráulica ou através de pressão osmótica devido as proteínas retidas (BELFORT *et al* 1994). No experimento de BOWEN (1992), em cerca de 80 minutos houve uma redução de 5 % da atividade enzimática, e em 120 minutos houve uma redução de 7%. Nos experimentos realizados houve em média 10% de perda de atividade, embora discrepante da literatura a metodologia do autor tinha acesso facilitado das membranas para fazer a análise mais precisa das proteínas retidas, no caso desse experimento o acesso direto a membrana não era possível. De toda forma é um ponto interessante pois a possível interação da xilanase com o floculante pode aumentar esse depósito na membrana.

Na tabela 8 é indicado a quantidade de enzimas em 1,5L do caldo antes e depois do processo de microfiltração, que em média a atividade enzimática é de 2393 em média. A massa de xilanase no retido não foi calculada pois não houve uniformidade na quantidade de água utilizada para lavar a membrana. Após o processo de microfiltração a membrana era submetida ao processo de lavagem, e o primeiro passo era o fluxo de água destilada através do sistema para retirar as maiores incrustações. Era nesse momento que era coletada a água da lavagem para a análise da atividade enzimática. No estudo de FARLIAHATI *et al* (2010) foi realizado a otimização do meio de cultivo para a produção intracelular de xilanase com *E.coli* na qual foi obtido a atividade enzimática final da xilanase de 2.649 U/mL, MENDONÇA *et al* (2020) apresentou uma atividade enzimática da xilanase de 195 U/mL com *E.coli* com meio de cultivo composto de resíduos agroindustriais, Nesse artigo de MENDONÇA *et al* (2020) foi utilizado o mesmo plasmídeo utilizado neste estudo e cita que a produção de xilanase com *E.coli* o meio LB foi inferior ao meio suplementado com resíduos agroindustriais produzindo 21 U/mL. Comparando com os valores de atividade enzimática obtidos com a *E.coli* no meio de cultivo SB, que é mais concentrado que o meio LB, houve um aumento perto de 60%.

No artigo de DAMASO *et al* (2003) a levedura *Pichia.pastoris* produziu a xilanase termoestável provida da *Thermomyces lanuginosus* sob controle do

promotor AOX1 e após a purificação com filtração em gel consegui uma concentração de 148 mg/L de xilanase e atividade enzimática da xilanase de 360 U/mL antes da etapa de purificação. No artigo de SUN *et al* (2020) a produção de xilanase com *P.pastoris* utilizando o promotor AOX1 e otimizando o meio de cultura foi obtido uma atividade enzimática da xilanase de 3273 U/mL antes da purificação e de 2975 U/mL depois da purificação. Após purificação por precipitação a concentração de xilanase foi de 502 mg/L com atividade específica da xilanase de 5926 U/mL

Importante ressaltar que o decaimento da atividade enzimática do flocculante 611 em cerca de 50% é devido aos tubos criogênicos utilizados nas preparações do experimento, pois houve um espaço de tempo de 6 meses em relação ao preparo dos tubos. A *E.coli* pode ser criopreservada durante 3 meses sem mudanças significativas, e segundo os valores de atividade enzimática dos experimentos sem flocculante e com os flocculantes 610 e SH que foram realizados neste período de 3 meses, comprovam esse estudo realizado em 1977 (MORRISON, 1977). Um estudo sobre a análise da criopreservação de *E.coli* seria interessante para averiguar o período de tempo que as células conseguem preservar a transformação.

6. Conclusão

Os experimentos realizados com o flocculante 17WATIPS610 (610) indicou que houve um aumento na performance do processo de filtração de 18% em relação ao experimento sem o flocculante e não houve alteração na atividade enzimática através da interação entre a xilanase e os flocculantes. Embora alguns experimentos apresentaram erros que não eram esperados, a análise da melhoria no processo de microfiltração está de acordo com outras fontes na literatura. A recuperação da xilanase foi de cerca de 80 a 90% e não ocorreu diferenças entre o experimento com e sem flocculantes. A atividade enzimática da xilanase em média foi uma concentração de 31,164 U/mL, o que é 50% maior que o artigo realizado por MENDONÇA *et al* (2020) que realizou a produção de xilanase em meio LB. De modo geral a utilização de flocculantes no processo de microfiltração aumenta a sua performance e pode ser utilizado para a purificação de bioprodutos que necessitam de um baixo teor de pureza.

7. Referências

ACHAZI, K; HAAG, R; BALLAUFFf, M; DERNEDDE, J; KIZHAKKEDATHU, J. N; MAYSINGER, D; MULTHAUP, G. Understanding the interaction of polyelectrolyte architectures with proteins and biosystems. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 60, n. 8, p. 3882-3904, 2021

AL AANI, S; MUSTAFA, T. N; HILAL, N. Ultrafiltration membranes for wastewater and water process engineering: A comprehensive statistical review over the past decade. **Journal of Water Process Engineering**, v. 35, p. 101241, 2020.

ANIS, S. F; HASHAIKEH, R; HILAL, N. Microfiltration membrane processes: A review of research trends over the past decade. **Journal of Water Process Engineering**, v. 32, p. 100941, 2019

BALL, V; WINTERHALTER, M; SCHWINTE, P; LAVALLE, P; VOEGEL, J. C; SCHAAF, P. Complexation mechanism of bovine serum albumin and poly (allylamine hydrochloride). **The Journal of physical chemistry B**, v. 106, n. 9, p. 2357-2364, 2002.

BASIT, A; JIANG, W; RAHIM, K. Xylanase and its industrial applications. In: **Biomass**. IntechOpen, 2020.

BELFORT, G; DAVIS, R, H; ZYDNEY, A, L. The behavior of suspensions and macromolecular solutions in crossflow microfiltration. **Journal of membrane science**, v. 96, n. 1-2, p. 1-58, 1994.

BHARDWAJ, N; KUMAR, B; VERMA, P. A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 6, n. 1, p. 1-36, 2019.

BOWEN, W. R; GAN, Q. Properties of microfiltration membranes: The effects of adsorption and shear on the recovery of an enzyme. **Biotechnology and bioengineering**, v. 40, n. 4, p. 491-497, 1992.

CHARCOSSET, C. Membrane processes in biotechnology: an overview. **Biotechnology advances**, v. 24, n. 5, p. 482-492, 2006.

COLLINS, T; GERDAY, C; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS microbiology reviews**, v. 29, n. 1, p. 3-23, 2005.

DAMASO, M, C, T; ALMEIDA, M, S; KURTENBACH, E; MARTINS, O, B; PEREIRA Jr, N; ANDRADE, C, M; ALBANO, R, M. Optimized expression of a thermostable xylanase from *Thermomyces lanuginosus* in *Pichia pastoris*. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 10, p. 6064-6072, 2003.

DORAN, P, M. **Bioprocess engineering principles**. 2nd. ed. London.: Elsevier, 2013.

FARLIAHATI, M, R; RAMANAN, R, N; MOHAMAD, R; PUSPANINGSIH, N, N, T; ARIFF, A, B. Enhanced production of xylanase by recombinant *Escherichia coli* DH5 α through optimization of medium composition using response surface methodology. **Annals of Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 279-285, 2010.

GAGAOUA, M. Aqueous methods for extraction/recovery of macromolecules from microorganisms of atypical environments: A focus on three phase partitioning. **Methods in Microbiology**, v. 45, p. 203-242, 2018.

GOGOI, S, Ri. Applications of Oxidoreductases. In: **Oxidoreductase**. IntechOpen, 2020.

GHOSH, R. **Principles of bioseparations engineering**. World Scientific Publishing Company, 2006.

HABTE, M, L; BEYENE, E, A. Biological Application and Disease of Oxidoreductase Enzymes. In: **Oxidoreductase**. IntechOpen, 2020.

HARRIS, A D; RAMALINGAM, C. Xylanases and its application in food industry: a review. **Journal of Experimental Sciences**, v. 1, n. 7, 2010.

HALDER, S; YADAV, K, K; SARKAR, R; MUKHERJEE, S; SAHA, P; HALDAR, S; KARMAKAR, S; SEN, T. Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents. **SpringerPlus**, v. 4, n. 1, p. 1-14, 2015.

HEDE, P. D. O. A beginner's guide to enzymes in detergents. **International News on Fats, Oils and Related Materials**, v. 25, n. 7, p. 471-475, 2014.

KARIM, M. N; GRAHAM, H; HAN, B; CIBULSKAS, A. Flocculation enhanced microfiltration of *Escherichia coli* lysate. **Biochemical engineering journal**, v. 40, n. 3, p. 512-519, 2008.

HARRISON, R, G; TODD, P; RUDGE, S. R; PETRIDES, D. P. **Bioseparations science and engineering**. Oxford University Press, USA, 2015.

LEE, C S; ROBINSON, ; CHONG, M, F. A review on application of flocculants in wastewater treatment. **Process safety and environmental protection**, v. 92, n. 6, p. 489-508, 2014.

LEWIS, T; STONE, W, L. *Biochemistry, Proteins Enzymes*. 2020.

LOZANO, J. E. Separation and clarification. In: **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. 2nd. ed. London: Academic Press, 2003. p. 5187-5196.

MAJID, F, A, A. Downstream Processing of Recombinant Enzymes for Commercialization. In: AMID, Azura. (editor). **Recombinant Enzymes-From Basic Science to Commercialization**. Heidelberg: Springer, Cham, , 2015. p. 115-127. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-12397-4>.

MENDONÇA, E, H, M; AVANCI, N, C; ROMANO, L, H; BRANCO, D, L; DE PÁDUA, A, X; WARD, R. J; NETO, A, B; LOURENZONI, M, R. Recombinant xylanase production by *Escherichia coli* using a non-induced expression system with different nutrient sources. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 37, n. 1, p. 29-39, 2020.

MORRISON, D. A. Transformation in *Escherichia coli*: cryogenic preservation of competent cells. **Journal of bacteriology**, v. 132, n. 1, p. 349-351, 1977.

MOTTA, F. L.; ANDRADE, C. C. P.; SANTANA, M. H. A. A review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications. **Sustainable degradation of lignocellulosic biomass-techniques, applications and commercialization**, v. 1, 2013.

MURAKAMI, M. T; ARNI, R. K; VIEIRA, D.; DEGREVE, L; RULLER, R; WARD, R. J. Correlation of temperature induced conformation change with optimum catalytic activity in the recombinant G/11 xylanase A from *Bacillus subtilis* strain 168 (1A1). **FEBS letters**, v. 579, n. 28, p. 6505-6510, 2005.

NG, W; TING, Y. **Zeta potential of bacterial cells: Effect of wash buffers.**(No. e110v6) PeerJ Preprints, 2017.

PAUL, P. E. V; SANGEETHA, V; DEEPIKA, R. G. Emerging trends in the industrial production of chemical products by microorganisms. In: **Recent developments in applied microbiology and biochemistry**. Academic Press, p. 107-125, 2019

SHARMA, N; SHARMA, N. Microbial xylanases and their industrial applications as well as future perspectives: a review. **Global J. Biol. Agric. Health Sci**, v. 6, p. 5-12, 2017.

SHALOVA, I. N; NALETOVA, I. N; SASO, L; MURONETZ, V. I; IZUMRODOV, V. A. Influence of Complexing Polycations on the Thermoaggregation of Oligomeric Enzymes. **Macromolecular bioscience**, v. 7, n. 7, p. 929-939, 2007.

SINGH, R; SINGH, A; SACHAN, S. Enzymes Used in the Food Industry: Friends or Foes?. In: **Enzymes in Food Biotechnology**. Academic Press, p. 827-843, 2019.

SINGH, G; CAPALASH, N; KAUR, K; PURI, S; SHARMA, P. Enzymes: applications in pulp and paper industry. In: DHILLON, G. S.; KAUR, S. (editor). **Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production: Apply and Exploit the Emerging and Valuable Use Options of Waste Biomass**. Amsterdam: Academic Press, 2016. p. 157-172.

SUN, T; YAN, P; ZHAN, N; ZHANG, L; CHEN, Z; ZHANG, A; SHAN, A. The optimization of fermentation conditions for *Pichia pastoris* GS115 producing recombinant xylanase. **Engineering in Life Sciences**, v. 20, n. 5-6, p. 216-228, 2020.

RAVEENDRAN, S; PARAMESWARAN, B; UMMALYMA, S, B; ABRAHAM, A; MATHEW, A, K; MADHAVAN, A; REBELLO, S; PANDEY, A. Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. **Food Technol Biotechnol.**, v. 56, n. 1, p. 16-30, 2018.

ROBINSON, P, K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in biochemistry**, v. 59, p. 1, 2015.

RULLER, R; ROSA, J.C; FAÇA, V.M; GREENE, L.J; WARD, R.J. Efficient constitutive expression of Bacillus subtilis xylanase A in Escherichia coli DH5alpha under the control of the Bacillus BsXA promoter. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 43, Pt 1, p.9– 15. 2006.

RULLIFANK, K. F; ROEFINAL, M. E; KOSTANTI, M; SARTIKA, L. **Pulp and paper industry: An overview on pulping technologies, factors, and challenges**. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 845, No. 1, p. 012005). IOP Publishing, 2020

WANG, H; CHEN, Z; MIAO, J; LI, Y. A novel approach for mitigation of membrane fouling: Concomitant use of flocculant and magnetic powder. **Bioresource technology**, v. 209, p. 318-325, 2016.

ZHAO, F; CHU, H; YU, Z; JIANG, S; ZHAO, X; ZHOU, X; ZHANG, Y. The filtration and fouling performance of membranes with different pore sizes in algae harvesting. **Science of The Total Environment**, v. 587, p. 87-93, 2017

Apêndice A

Tabela 9: Atividade enzimática da xilanase média da interação com os flocculantes nos diferentes períodos de tempo

Tempo (h)	Atividade média dos Flocculantes (U/mL)								Desvio Padrão
	611	SH	610	Al ₂ SO ₄	CTAB	PVA	130v	130wv	
0	23,905	31,513	37,082	31,837	26,308	29,935	44,215	4,611	
0,5	28,116	26,766	26,227	40,520	8,279	32,160	27,939	29,399	
1	21,121	31,729	28,587	29,854	24,825	29,288	29,247	26,955	± 7,2767
1,5	25,696	29,773	28,897	31,419	33,050	26,874	25,876	24,038	
2	20,697	27,400	35,855	27,602	14,968	28,155	70,792	22,973	

Tabela 10: Valores de atividade enzimática da xilanase e o Z-score com a inteação dos flocculantes SuplerFloc 130 wv, 17WATIPS611 e Superfloc 130 V

Floculantes	Tempo (h)	Amostra	Atividade enzimática			Média Atividade	Desvio Padrão	Z-score
SuplerFloc 130 wv	0	1	3,050	3,050	2,288	2,796		-3,5369
		2	3,050	3,050	2,832	2,977		-3,5120
		3	10,458	10,458	5,556	8,824		-2,7086
	0,5	1	28,105	28,105	28,649	28,286		-0,0340
		2	31,481	31,481	31,155	31,373		0,3902
		3	29,521	29,521	27,887	28,976		0,0609
	1	1	27,887	27,887	28,976	28,250	9,8568	-0,0389
		2	22,004	22,004	29,956	24,655		-0,5330
		3	27,778	27,778	21,895	25,817		-0,3733
	1,5	1	26,688	26,688	4,793	19,390		-1,2565
		2	25,708	25,708	24,074	25,163		-0,4631
		3	27,342	27,342	31,046	28,577		0,0060
	2	1	13,725	13,725	27,996	18,482		-1,3813
		2	21,133	21,133	29,085	23,784		-0,6527
		3	19,063	19,063	28,105	22,077		-0,8872
17WATIPS611	0	1	20,806	28,105	23,203	24,038		-0,6178
		2	22,658	25,708	20,915	23,094		-0,7475
		3	23,638	23,420	26,688	24,582		-0,5429
	0,5	1	24,946	29,956	29,303	28,068		-0,0639
		2	31,046	23,965	28,322	27,778		-0,1038
		3	30,610	26,253	28,649	28,504		-0,0040
	1	1	22,985	21,460	16,993	20,479	3,9047	-1,1068
		2	19,499	21,569	18,954	20,007		-1,1717
		3	20,261	26,906	21,460	22,876		-0,7775
	1,5	1	29,412	27,233	27,996	28,214		-0,0439
		2	30,174	21,895	21,133	24,401		-0,5679
		3	24,510	25,926	22,985	24,473		-0,5579
	2	1	18,192	16,776	20,044	18,337		-1,4012
		2	20,806	19,172	26,035	22,004		-0,8972
		3	18,954	24,510	21,786	21,750		-0,9322
Superfloc 130 V	0	1	33,617	33,617	36,408	34,547		0,8264
		2	32,767	33,374	28,883	31,675		0,4317
		3	78,155	68,204	52,913	66,424		5,2071
	0,5	1	26,578	30,097	24,636	27,104		-0,1965
		2	27,670	25,243	30,704	27,872		-0,0908
		3	32,282	28,762	25,485	28,843		0,0426
	1	1	31,675	31,796	32,888	32,120	20,557	0,4929
		2	27,670	28,034	28,277	27,994		-0,0742
		3	29,005	31,675	22,209	27,629		-0,1242
1,5	1	28,155	27,184	20,388	25,243		-0,4522	
	2	21,966	23,301	25,971	23,746		-0,6579	
	3	27,063	28,641	30,218	28,641		0,0148	
2	1	42,840	61,772	78,883	61,165		4,4844	
	2	96,359	75,121	39,684	70,388		5,7519	
	3	77,184	76,820	88,471	80,825		7,1862	

Tabela 11: Valores de atividade enzimática da xilanase e o Z-score com a inteação dos flocculantes SH, 17WATIPS610 e AL2SO4

Floculantes	Tempo (h)	Amostra	Atividade enzimática			Média	Desvio	Z-score
						Atividade	Padrão	
SH	0	1	32,160	28,762	32,646	31,189		0,3650
		2	31,553	33,859	30,825	32,079		0,4873
		3	33,738	31,675	28,398	31,270		0,3761
	0,5	1	31,189	24,515	27,670	27,791		-0,1020
		2	28,277	25,728	31,311	28,439		-0,0130
		3	23,544	24,150	24,515	24,070		-0,6134
	1	1	34,951	31,917	29,369	32,079	3,338	0,4873
		2	31,796	32,039	35,194	33,010		0,6152
		3	28,883	29,490	31,917	30,097		0,2149
	1,5	1	27,913	29,490	23,786	27,063		-0,2020
		2	34,345	26,335	27,063	29,248		0,0982
		3	30,704	34,830	33,495	33,010		0,6152
	2	1	26,699	29,976	28,883	28,519		-0,0019
		2	25,000	27,306	27,063	26,456		-0,2854
		3	24,879	31,189	25,607	27,225		-0,1798
17WATIPS610	0	1	38,714	64,078	34,951	45,914		2,3886
		2	30,947	31,311	28,762	30,340		0,2483
		3	39,927	32,646	32,403	34,992		0,8876
	0,5	1	28,034	21,966	22,209	24,070		-0,6134
		2	29,126	28,398	28,277	28,600		0,0092
		3	26,092	24,150	27,791	26,011		-0,3466
	1	1	27,427	29,733	30,583	29,248	8,149	0,0982
		2	28,277	26,092	31,675	28,681		0,0203
		3	25,485	28,519	29,490	27,832		-0,0964
	1,5	1	30,461	31,553	18,447	26,820		-0,2354
		2	27,427	27,791	30,704	28,641		0,0148
		3	37,621	28,155	27,913	31,230		0,3706
	2	1	24,879	20,995	35,073	26,982		-0,2131
		2	28,641	30,461	43,932	34,345		0,7986
		3	44,053	42,718	51,942	46,238		2,4330
0	1	32,888	32,403	30,947	32,079		0,4873	
	2	34,466	32,160	33,859	33,495		0,6819	
	3	19,660	33,252	36,893	29,935		0,1927	
0,5	1	31,068	34,102	39,320	34,830		0,8653	
	2	28,155	30,461	52,306	36,974		1,1600	
	3	51,578	47,816	49,879	49,757		2,9167	
AL2SO4	1	1	30,704	30,097	32,282	31,028	6,875	0,3428
		2	27,549	26,456	28,641	27,549		-0,1353
		3	28,762	30,947	33,252	30,987		0,3372
	1,5	1	32,646	28,762	24,515	28,641		0,0148
		2	34,223	31,796	31,553	32,524		0,5485
		3	36,893	30,825	31,553	33,091		0,6263
	2	1	33,252	27,670	33,495	31,472		0,4039
		2	25,364	23,786	27,913	25,688		-0,3910
		3	25,850	26,456	24,636	25,647		-0,3966

Tabela 12: Valores de atividade enzimática da xilanase e o Z-score com a inteação dos floculantes CTAB e PVA

Floculantes	Tempo (h)	Amostra	Atividade enzimática			Média Atividade	Desvio Padrão	Z-score
CTAB	0	1	12,379	17,354	16,383	15,372		-1,8086
		2	17,597	17,961	41,262	25,607		-0,4022
		3	39,320	36,044	38,471	37,945		1,2934
	0,5	1	-	-	-	-		-
		2	-	-	17,961	17,961		-1,4529
		3	17,961	19,417	19,175	18,851		-1,3306
	1	1	26,942	23,544	25,121	25,202	8,814	-0,4578
		2	29,733	26,578	15,291	23,867		-0,6412
		3	25,728	22,694	27,791	25,405		-0,4300
	1,5	1	31,796	33,859	27,791	31,149		0,3595
		2	31,189	35,437	31,796	32,807		0,5874
		3	38,714	35,680	31,189	35,194		0,9154
	2	1	13,714	14,078	12,136	13,309		-2,0922
		2	14,442	15,413	-	14,927		-1,8698
		3	16,262	15,655	18,083	16,667		-1,6308
PVA	0	1	29,248	31,796	28,277	29,773		0,1704
		2	29,854	26,578	27,670	28,034		-0,0686
		3	30,097	31,432	34,466	31,998		0,4762
	0,5	1	34,223	30,947	34,345	33,172		0,6374
		2	35,194	28,398	29,854	31,149		0,3595
		3	29,733	33,738	33,010	32,160		0,4984
	1	1	31,311	29,490	27,913	29,571	3,067	0,1426
		2	29,612	30,218	26,456	28,762		0,0315
		3	27,063	28,519	33,010	29,531		0,1371
1,5	1	33,495	22,573	29,490	28,519		-0,0019	
	2	26,820	25,243	26,699	26,254		-0,3132	
	3	22,694	28,155	26,699	25,850		-0,3688	
2	1	31,189	26,578	30,947	29,571		0,1426	
	2	23,665	25,607	27,184	25,485		-0,4188	
		3	29,490	28,883	29,854	29,409		0,1204

