

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – UNICAMP

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA – FEQ

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS QUÍMICOS – DPQ

**RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS USANDO ADSORÇÃO
EM LEITO EXPANDIDO**

AUTOR: EVERALDO SILVINO DOS SANTOS

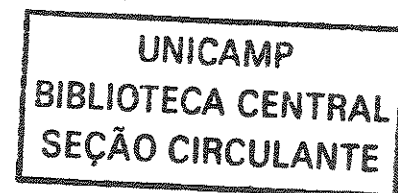
ORIENTADOR (A): PROF^a. Dr^a. TELMA TEIXEIRA FRANCO

CO-ORIENTADOR: PROF^o. Dr. REGINALDO GUIRARDELLO

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

Campinas – São Paulo

Outubro - 2001



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/ UNICAMP
	Sa59r
V. Ex.	
TOMBO BC/	47209
PROC.	16 - 837102
C <input type="checkbox"/> D <input checked="" type="checkbox"/>	
PREC.	R\$ 11,00
DATA	15-01-2002
N.º CPD	

CM00162570-3

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

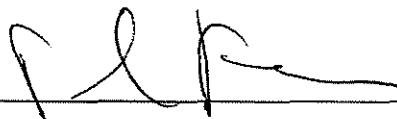
Sa59r Santos, Everaldo Silvino dos
Recuperação e purificação de enzimas usando adsorção
em leite expandido / Everaldo Silvino dos Santos. --
Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientadores: Telma Teixeira Franco, Reginaldo
Guirardello.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

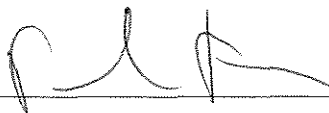
1. Fluidização. 2. Adsorção. 3. Enzimas - Purificação.
4. Proteínas - Separação. I. Franco, Telma Teixeira. II.
Guirardello, Reginaldo. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado de *Everaldo Silvino dos Santos* em Engenharia Química.

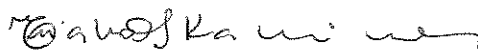


Prof.ª. Dr.ª. Telma Teixeira Franco - Orientador

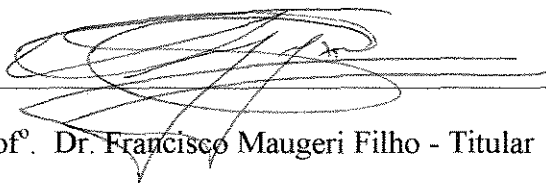
Tese de Doutorado defendida por Everaldo Silvino dos Santos e aprovada em 02 de Outubro de 2001 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof.ª. Dr.ª. Telma Teixeira Franco - Orientador



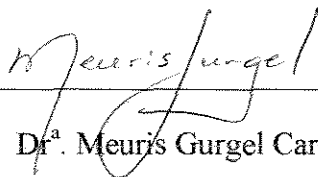
Prof.ª. Dr.ª. Eliana Setsuko Kamimura - Titular



Prof.º. Dr. Francisco Maugeri Filho - Titular



Dr. Lanfranco Ranieri Paolo Troncone - Titular



Prof.ª. Dr.ª. Meuris Gurgel Carlos da Silva - Titular

**Dedico este trabalho a minha
esposa (Édna) e ao meu querido filho
(Leonardo).**

**“Não se pode ensinar
tudo à alguém, pode-se
apenas ajudá-lo a encontrar-
se por si mesmo”**

Galileu Galilei, astrônomo italiano

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Telma Teixeira Franco pela confiança depositada em minha pessoa no desenvolvimento desse trabalho e pela orientação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado concedida e pelo auxílio financeiro.

Ao Prof^o. Dr. Reginaldo Guirardello pela co-orientação.

À minha família que, apesar da distância, sempre me apoiou.

À Hélsia Santiago Benta (minha cunhada) pelo fato de cuidar do Leonardo enquanto eu e minha esposa desenvolvíamos nossas teses de doutorado.

Aos meus amigos de laboratório, Aline Azevedo, Ana Paula Ribeiro, Cristiane Fozzati, Cristiane Tagliari, Eliana Kamimura, Érico Coelho, Francisco Piza, Gicela Ana Zanbon, Joseane Mércia, Juliana Souza, Kátia Assis, Lianne Beatriz, Luciana Igarashi, Maria Estela, Mariana Palácios, Mônica Bim, Ricardo Romero, Sérgio Santos e Zea Mayerhof, pela amizade e pelos bons momentos compartilhados.

Aos casais Alberto e Sirlânia, Jair e Renata, Alexandre e Cintia, Arlan e Patrícia, Arlindo e Inês, Rigoberto e Lilian, André e Sílvia, Alessandro e Regina, Martin e Aline, Azamor e Sandra, Júlio e Ana Leda, Jorge e Valquíria, a Maria das Graças Henrique e em especial à Antônio Carlos da Silva Ramos.

Ao casal Marlus Rolemberg e Marilsa Rolemberg, que nos momentos mais difíceis sempre nos deram apoio.

À todos os meus amigos da FEQ meu agradecimento pela amizade.

Ao Professor PhD Andrew Lydiatt, líder do Biochemical Recovery Group (BRG) da Universidade de Birmingham (Inglaterra) por ter me acolhido em seu laboratório.

À todos os funcionários e professores da FEQ, que direta ou indiretamente contribuíram na realização desse trabalho.

À minha esposa Édna pela amizade e companheirismo.

RESUMO

O presente trabalho refere-se ao uso da técnica de adsorção em leito expandido para recuperar e purificar enzimas. Aspectos fundamentais da adsorção em leito expandido são abordados, utilizando lisozima e soro albumina bovina como proteínas modelo, e as enzimas, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Saccharomyces cerevisiae*, xilanase (extrato comercial) e quitosanase produzida por *Bacillus cereus*.

A avaliação da influência do uso de dois distribuidores, poroso e do tipo prato perfurado, mostrou que o distribuidor do tipo prato perfurado favoreceu mais à adsorção em leito expandido e que os adsorventes Streamline® SP e Streamline® DEAE possuem uma ampla distribuição de tamanho de partículas favorecendo ao fenômeno de segregação (Capítulo 2 – Artigo publicado no IEX 2000 (Cambridge/UK)).

O uso de um processo integrado para recuperar e purificar a enzima intracelular Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase mostrou-se bem sucedido. O desempenho hidrodinâmico e cromatográfico foi estudado usando um adsorvente de estrutura pelicular (Pellicular) e dois adsorventes porosos comerciais (Streamline e Macrosorb) : Os resultados mostraram que o adsorvente Pellicular apresentou as melhores propriedades hidrodinâmicas e cromatográficas. (Capítulo 3 – Artigo em parceria e que será submetido à periódico internacional).

O estudo da influência do uso de uma altura do leito empacotado, de 0,050 m e de 0,075 m na ALE operando-se em 10% da curva de ruptura, mostrou que uma altura de 0,075 m foi mais eficiente. Para o sistema lisozima - Streamline® DEAE o rendimento aumentou com o aumento da velocidade linear enquanto que para o sistema BSA - Streamline® SP esse fato não foi observado. Neste caso, para o sistema BSA - Streamline® SP, a transferência de massa parece ser limitada pela menor densidade de carga acarretando assim em menores valores de

eficiência em 10% de ruptura. (Capítulo 4 – Artigo aceito para publicação no periódico *Bioseparation*).

O estudo da influência do conteúdo de células na adsorção em leite expandido mostrou que quando foi utilizado o extrato com o conteúdo de 5% de células (peso úmido), em leite expandido, o desempenho da purificação foi comprometido. (Capítulo 5 – Artigo aceito para publicação no periódico *Journal of Chromatography A*).

A adsorção de quitosanase de um caldo de fermentação de *Bacillus cereus* em leite empacotado permitiu a obtenção de um pico com um fator de purificação de 7,6 e uma recuperação de 67,4% que eluiu com 0,51 M de NaCl. Valores muito próximos a estes foram obtidos com o uso da adsorção em leite expandido com ambos os caldos, bruto e clarificado. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) realizada para o tubo que exibiu a maior atividade, quando o leite foi no modo expandido e com células, mostrou a presença de duas bandas. Este fato sugere três possibilidades, a existência de duas quitosanasas, a presença de uma proteína contaminante ou a existência de uma quitosanase com duas sub-unidades (dímera). Entretanto, grande parte dos contaminantes foram separados da quitosanase em uma única etapa. (Capítulo 6 – Artigo que será submetido a um periódico internacional).

Palavras-chaves: Adsorção em leite expandido; fluidização; enzimas; *downstream processing*

ABSTRACT

This work deals with the application of Expanded Bed Adsorption (EBA) to recovery and purify enzymes. Model proteins, lysozyme and bovine serum albumin (BSA), as well as some enzymes, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) from baker's yeast, xylanase (from a commercial extract) and chitinase from *Bacillus cereus* were used to study the EBA background and application.

The influence of two distributor (porous and perforated plate) showed that the perforated plate distributor was more favourable for the EBA. The Streamline® SP and the Streamline® DEAE adsorbents have a wide size distribution favourable for the segregation phenomena. (Chapter 2 – article published in IEX 2000 (Cambridge/UK)).

An integrated process was successful to recover and to purify an intracellular enzyme, Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (G3PDH). Performance of the hydrodynamic and chromatographic properties using a pellicular adsorbent (Pellicular) and two porous commercial adsorbents (Streamline and Macrosorb) showed that the former presented the best hydrodynamic and chromatographic properties. (Chapter 3 – paper that will be submitted to an international journal).

The influence of two settled bed height, 0.050 m and 0.075m, respectively, in the EBA operating at 10% of the breakthrough curve, showed that the former was more efficient. For the lysozyme - Streamline® DEAE system yield increased with the increase of the velocity while for the BSA - Streamline® SP system this behaviour was not observed. In this case, mass transfer seems to be limited probably due to its lower charge density. (Chapter 4 - paper accepted for publication in the Bioseparation Journal).

The influence of cell contents in the EBA using a 5% (wet weight) cell content showed that the purification performance was hampered. (Chapter 5 - paper accepted for publication in the Journal of Chromatography A).

The chitosanase adsorption of fermentation broth from *Bacillus cereus*, in packed mode, showed a chitosanase peak that eluted with 0.51 M NaCl, in this case a 7.6-fold purification factor with 67.4% of activity recovery were obtained. Similar values were obtained for both clarified and unclarified fermentation broth using the bed in the expanded mode. Experiment in expanded mode showed that two bands were present in the peak showing the highest activity, this suggests three possibilities, the existence of two chitosanases, the existence of a contaminant protein or the existence of a chitosanase with two sub-units. However, it was possible to separate the chitosanase from the main contaminants in just one step. (Chapter 6 – paper that will be submitted to an international journal).

Key-words: Expanded bed adsorption (EBA); fluidisation; enzymes; downstream processing

SUMÁRIO

	pg
RESUMO	xv
ABSTRACT	xix
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	xliii
NOMENCLATURA	li
INTRODUÇÃO	1
Capítulo 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1.1 <i>DOWNSTREAM PROCESSING</i>	5
1.1.1 - Desafios	6
1.1.2 - Tendências	6
1.1.3 – <i>Downstream processing</i> de algumas enzimas existentes na literatura	8
1.2 ADSORÇÃO EM LEITO EXPANDIDO (ALE)	11
1.2.1 – Princípios e operação	15
1.2.2 – Hidrodinâmica do leito expandido	17
- Observação visual	19
- Grau de expansão (H/H_0)	20
- Distribuição do tempo de residência (DTR)	20

1.2.3 - Adsorventes	22
- Adsorção por troca iônica	23
1.2.4 - Distribuidores	24
1.2.5 – Equilíbrio de adsorção	26
1.2.6 – Dispersão da fase líquida	27
1.2.7 – Dispersão da fase sólida	28
- Transporte de massa do fluido	30
- Transporte de massa na partícula	30
1.2.8 - Aplicações	31
1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
Capítulo 2 – DISTRIBUTOR EFFECT ON EXPANDED BED ADSORPTION	43
1. - INTRODUCTION	44
2. – EXPANDED BED ADSORPTION	44
2.1 – Classification (Segregation)	45
2.2 - Distributor	46
3. – MATERIAL AND METHODS	46
3.1 – Model protein	46
3.2 – Chromatographic adsorbent	46
3.3 – Experimental setup	47

3.3.1 – Expansion study	47
3.3.2 – Breakthrough curve	48
4. RESULTS AND DISCUSSION	48
4.1 – Adsorbent size distribution	48
4.2 – Expansion analysis	49
4.3 – Breakthrough analysis	51
5. CONCLUSIONS	52
Nomenclature	53
Acknowledgements	54
References	54
ERRATA	56
Capítulo 3 – INTEGRATED PROCESS FOR THE PURIFICATION OF AN INTRACELLULAR ENZYME	57
ABSTRACT	58
1. - INTRODUCTION	59
2. - EXPERIMENTAL	59
2.1 - Materials	59
Reagents and Chemicals	59
Enzyme and microorganism	59
Adsorbents	60

2.2 - Procedures	60
Preparing of stock solutions	60
Adsorbent cross-linking	61
Immobilisation of Cibracon Blue 3 FG-A	61
Estimation of the dye concentration	62
Estimation of the agarose content	62
Cell disruption	62
Kinetics assay	62
Isotherms	62
Bed expansion	63
Residence time distribution	63
Integrated process	64
2.3 - Assays	65
G3PDH enzyme activity	65
Determination of protein	66
3. – RESULTS AND DISCUSSION	66
3.1 - Estimation of the dye concentration	66
3.2 - Estimation of the agarose content	66
3.3 - Adsorption kinetics assay	67
3.4 - Isotherms	68

2.2 - Procedures	60
Preparing of stock solutions	60
Adsorbent cross-linking	61
Immobilisation of Cibracon Blue 3 FG-A	61
Estimation of the dye concentration	62
Estimation of the agarose content	62
Cell disruption	62
Kinetics assay	62
Isotherms	62
Bed expansion	63
Residence time distribution	63
Integrated process	64
2.3 - Assays	65
G3PDH enzyme activity	65
Determination of protein	66
3. – RESULTS AND DISCUSSION	66
3.1 - Estimation of the dye concentration	66
3.2 - Estimation of the agarose content	66
3.3 - Adsorption kinetics assay	67
3.4 - Isotherms	68

3.5 - Bed expansion	69
3.6 - Residence time distribution	70
3.7 - Integrated process	71
4. - CONCLUSIONS	72
REFERENCES	72
Capítulo 4 – EFFECT OF THE SETTLED BED HEIGHT ON EXPANDED BED ADSORPTION	77
ABSTRACT	78
1. - INTRODUCTION	79
1.2 - Classification (Segregation)	79
1.3 - B parameter	80
2. - MATERIAL AND METHODS	80
2.1 - Model protein	80
2.2 - Adsorbents	81
2.3 - Adsorbent size distribution	81
2.4 - Experimental setup	81
2.5 - Bed expansion measurements	82
2.6 - Breakthrough curve	83
3. - RESULTS AND DISCUSSION	84
3.1 - Adsorbent size distribution	84

3.2 - Bed expansion	85
3.3 - Breakthrough curves	86
3.4 - Analysis of B Parameter	88
4. - CONCLUSIONS	91
Acknowledgements	92
Nomenclature	92
References	93
Capítulo 5 - PREPARATIVE CHROMATOGRAPHY OF XYLANASE USING EXPANDED BED ADSORPTION (EBA)	95
ABSTRACT	96
1. - INTRODUCTION	97
2. - EXPERIMENTAL	99
2.1 Materials	99
2.1.1 Pulpzyme™ HC and reagents	99
2.1.2 Microorganism	99
2.1.3 Adsorbent	99
2.2 Equipment	99
2.3 Procedures	100
2.3.1 Residence time distribution (RTD)	100
2.3.2 Preparation of cells containing extract	101

2.3.3 Packed bed experiment	102
2.3.4 Expanded bed experiments with and without cells	102
2.4 Assays	102
2.4.1 Assay of xylanase activity	102
2.4.2 Determination of protein	103
2.4.3 Purification factor and yield	103
2.4.4 Electrophoresis	103
3. - RESULTS AND DISCUSSION	104
3.1 - Packed bed experiment	104
3.2 - Expanded bed experiments with and without cells	106
4. - CONCLUSIONS	110
Acknowledgements	111
References	111
Capítulo 6- CHITOSANASE EXTRACTION AND PURIFICATION BY EXPANDED BED ADSORPTION	113
ABSTRACT	114
1. - INTRODUCTION	115
2. - MATERIALS AND METHODS	116
2.1 - Microorganism	116
2.2 – Enzyme preparation	116

2.3 – Chitosanase activity assay	116
2.4 – Determination of protein	116
2.5 – Adsorbent	117
2.6 – Experimental Setup	117
2.6.1 – Batch uptake	117
2.6.2 – Equipment	118
2.6.3 – Packed bed experiments	118
2.6.4 -Expanded bed experiments with clarified and unclarified chitosanase fermentation broth	119
2.6.5 - SDS-PAGE Electrophoresis	120
3. - RESULTS AND DISCUSSION	120
3.1 - Batch uptake	120
3.2 - Packed bed experiments	121
3.3 - Expanded bed experiments with and without cells	123
4. - CONCLUSIONS	126
Acknowledgements	127
References	127
CONCLUSÕES	131
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	134
ANEXO – EXPANSÃO DE RESINAS USADAS PARA	135

ADSORÇÃO EM LEITO EXPANDIDO

LISTA DE FIGURAS E DE TABELAS

	pg.
 Capítulo 1	
Figura 1 – Diagrama de um processo purificação de um bioproduto	10
Figura 2 - Processos de adsorção: (a) leito fixo (b) leito expandido	12
Figura 3 – Parâmetros que influenciam a ALE	14
Figura 4 – Etapas usadas na adsorção em leito expandido (ALE)	16
Figura 5 – Grau de expansão do leito (H/H_0)	20
Figura 6 – Determinação do tempo de residência (DTR)	22
Figura 7 - Distribuidor multi-orifício (prato perfurado) e arranjos: (a) quadrático (b) triangular	25
Tabela 1 - Matrizes usadas na ALE	24
 Capítulo 2	
Figure 1 - Streamline TM SP adsorbent size distribution	50
Figure 2 - Bed height expansion	51
Figure 3 - Bed voidage behaviour	51
Figure 4 - Breakthrough curves (black symbols used for the perforated distributor)	52
Table 1 - Distributor characteristics	48
Table 2 - Expansion parameters	52

Table 3 - Adsorbent operating capacity (Q_{OP}) (protein mass (kg)/ m^3 adsorbent)	53
--	----

Capítulo 3

Figure 1 – Integrated process: (a) yeast feedstock (b) pump (c) bead mill (d) expanded bed	65
Figure 2 – Kinetics assay for the three adsorbents investigated	67
Figure 3 – Isotherms for the three adsorbents investigated	68
Figure 4 – Expansion degree for the three adsorbents studied	70
Table 1 – Dye concentration immobilised in the adsorbents	66
Table 2 – Agarose content in the adsorbents in percentage	67
Table 3 – Isotherm parameters	69
Table 4 – Parameters obtained from the RTD experiments	71
Table 5 – Purification parameters obtained from the integrated process	71

Capítulo 4

Figure 1 - Column used in the experiments. (a) rubber gasket (b) screen (c) perforated distributor (d) screw (e) ruler (f) piston	81
Figure 2 - Bed operating mode	83
Figure 3 - Size distribution of the Streamline™ SP. Accumulated (full line) and retained (dark) size distribution for the two adsorbents used	84

Figure 4 - Size distribution of the Streamline™ DEAE. Accumulated (full line) and retained (dark) size distribution for the two adsorbents used	84
Figure 5 - Bed expansion degree using nine different linear velocities for both 0.050 m and 0.075 m settled bed height	85
Figure 6 - Breakthrough curves of lysozyme onto Streamline™ SP for four different linear velocities using a 0.050 m settled bed height	86
Figure 7 - Breakthrough curves of lysozyme onto Streamline™ SP for four different linear velocities using a 0.075 m settled bed height	87
Figure 8 - Analysis of B parameter for lysozyme to Streamline™ SP	88
Figure 9 - Analysis of B parameter for BSA to Streamline™ DEAE	89
Capítulo 5	
Figure 1 - Column used in the experiments. (a) rubber gasket (b) screen (c) perforated distributor (d) screw (e) ruler (f) piston	100
Figure 2 - Xylanase purification using packed bed	105
Figure 3 - SDS page stained with Coomassie blue	105
Figure 4 - Axial liquid dispersion coefficient for different linear velocity	107
Figure 5 - Xylanase purification using expanded bed without cells	108
Figure 6 - Xylanase purification using expanded bed with cells	108

Table 1 - Purification in packed bed	106
Table 2 - Purification in expanded bed without cells	109
Table 3 - Purification in expanded bed with cells	110
Capítulo 6	
Figure 1 - Column used in the experiments. (a) rubber gasket (b) screen (c) perforated distributor (d) screw (e) ruler (f) piston	119
Figure 2 - Unclarified and clarified chitosanase uptake upon Streamline™ SP	121
Figure 3 - Purification of clarified chitosanase fermentation broth in packed bed.	122
Figure 4 - Purification of clarified chitosanase fermentation broth in expanded bed	124
Figure 5 - Purification of unclarified chitosanase fermentation broth in expanded bed	124
Figure 6 - SDS page stained with Coomassie blue for the peak of chitosanase	126
Table 1 - Purification of clarified chitosanase fermentation broth in packed bed	123
Table 2 - Purification of clarified chitosanase fermentation broth in expanded bed	125
Table 3 - Purification of unclarified chitosanase fermentation broth in expanded bed	125

NOMENCLATURA

A_{COL}	Área da seção transversal	L^2
A_d	Área do distribuidor	L^2
A_{or}	Área do orifício	L^2
A_T	Área da seção transversal do leito	L^2
C	Concentração da solução na saída da coluna	M/L^3
D	Coefficiente de difusão da proteína em solução	L^2/T
D_{axl}	Coefficiente de dispersão axial da fase líquida	L^2/T
D_{axp}	Coefficiente de dispersão axial da partícula	L^2/T
d_B	Diâmetro das partículas maiores	L
\bar{d}_p	Diâmetro médio da partícula	L
d_S	Diâmetro das partículas menores	L
F	Fração de área livre	---
g	Constante gravitacional	L/T^2
H	Altura do leito	L
H_{EXP}	Altura do leito expandido	L
m_p	Massa de adsorvente	M
n	Coefficiente de Richardson e Zaki	---
N	Número de pratos teórico	---

N_{or}	Número de orifícios	---
Pe	Número de Peclet	---
Pe_p	Número de Peclet da partícula	---
Q	Vazão de líquido	L^3/T
Q_{OP}	Capacidade dinâmica de operação do adsorvente	M/L^3
Re_p	Número de Reynolds da partícula ($Re_p = \frac{d_p \rho_L U}{\mu}$)	---
Re_t	Número de Reynolds terminal ($Re_t = \frac{d_p \rho_L U_T}{\mu}$)	---
Sc	Número de Schmidt	---
t	Tempo de residência médio	T
U	Velocidade do fluido	L/T
U_L	Velocidade linear (superficial) do fluido	L/T
U_{mf}	Velocidade de mínima fluidização	L/T
U_T	Velocidade terminal de uma partícula isolada	L/T
U_{TE}	Velocidade terminal obtida experimentalmente	L/T
V	Volume de solução de proteína	L^3
V_L	Volume total do leito	L^3
V_S	Volume total de sólidos no leito	L^3

Símbolos gregos

ε	Porosidade do leito	---
μ	Viscosidade da fase líquida	M/LT
ρ_L	Massa específica da fase líquida	M/L ³
ρ_P	Massa específica do adsorvente	M/L ³
σ	Metade da distância entre os pontos de leitura 15,85% e 84,15% da absorvância máxima	T

INTRODUÇÃO

Atualmente tem-se observado um interesse crescente nos produtos de origem biotecnológica, principalmente devido à sua ampla aplicação, como por exemplo, na indústria de fármacos. Dentre esses produtos pode-se destacar as proteínas, interferons, insulinas, hormônios de crescimento, vacinas, cujas técnicas de isolamento (separação) e purificação podem ser agrupadas no *downstream processing*.

As técnicas atuais para purificação de uma proteína intracelular usando cromatografia, envolvem pelo menos uma etapa de filtração ou centrifugação, para coleta do material particulado (células), seguida por uma etapa de rompimento celular. Após o rompimento, tem-se uma mistura de células rompidas contendo a proteína de interesse e contaminantes como, proteases, ácidos desoxirribonucléicos, etc., que deve ser centrifugada ou filtrada para remoção do material particulado. Em se tratando de uma enzima extracelular, a etapa de rompimento obviamente não se faz necessária. A necessidade de se usar uma solução clarificada ocorre principalmente, para que não ocorra o bloqueio da coluna cromatográfica pelo material particulado, aumentando assim a queda de pressão na coluna e acarretando perda do escoamento do fluido (comaltagem).

Por outro lado, a maioria dos processos existentes e de interesse para o setor industrial utiliza alguma forma particulada na corrente de alimentação. Como dependendo do produto de interesse, de 50 a 80% do custo total do produto se refere à etapa do *downstream processing* (Spalding 1991, Sadana e Beelaram, 1994), qualquer técnica que permita a redução das etapas do “downstream processing” deve ser vista com grande interesse, principalmente pela redução de custos e de tempo que a mesma proporcionará.

Nesse contexto, um renovado interesse vem sendo dado aos leitos fluidizados nos últimos anos, na área de recuperação de biomoléculas, principalmente pela sua aplicação em processos cuja alimentação apresenta material particulado.

A técnica de adsorção em leito expandido (ALE) está sendo usada com esse intuito, podendo ser a mesma aplicada em processos com alimentação contendo células (material particulado) estando ou não rompidas. Desde que o leito opere na forma expandida, não existe o bloqueio da coluna pelo material particulado em suspensão, e esses passarão preferencialmente pelos espaços vazios do leito.

Assim, a utilização da técnica de adsorção em leito expandido vêm se destacando como uma técnica promissora para o desenvolvimento industrial de recuperação e purificação de biomoléculas. Dessa forma, o presente trabalho estuda alguns aspectos fundamentais da adsorção em leito expandido (ALE), bem como sua aplicação na recuperação e purificação de enzimas.

Este trabalho está organizado da seguinte forma:

Capítulo 1: Apresenta-se uma revisão da literatura em português. Ênfase é dada para o *dowstream processing* e para a ALE.

Capítulo 2: Apresenta-se em inglês o artigo “Distributor Effect on Expanded Bed Adsorption”, apresentado no congresso IEX 2000 em Cambridge (Inglaterra) e publicado no livro IEX 2000.

Capítulo 3: Nesse capítulo é apresentado em inglês o artigo com o título provisório “Integrated Process for the Purification of an Intracellular Enzyme” que foi desenvolvido em parceria com o Biochemical Recovery Group da Universidade de Birmingham (Inglaterra) e que será submetido ao periódico *Biotechnology & Bioengineering*.

Capítulo 4: Nesse capítulo apresenta-se, em inglês, o artigo “Effect of Settled Bed Height on Expanded Bed Adsorption”, apresentado na terceira conferência sobre adsorção em leito expandido (EBA2000) em Karmichen-Partenkirchem (Alemanha) e aceito para publicação no periódico *Bioseparation*.

Capítulo 5 – Apresenta-se, em inglês, o artigo “Preparative Chromatography of Xylanase Using Expanded Adsorption (EBA)”, apresentado no prepsymposium

2001 em Washington (Estados Unidos) e aceito para publicação no periódico Journal of Chromatography A.

Capítulo 6 – Nesse capítulo apresenta-se, em inglês, o artigo “Chitosanase Extraction and Purification by Expanded Bed Adsorption (EBA)”, que será submetido à periódico internacional.

Capítulo 7 - Nesse capítulo apresenta-se as conclusões do trabalho.

O trabalho “Estudo da expansão de resinas usadas para adsorção em leitos expandidos (ALE)” apresentado no XXVI Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados (XXVI Enemp) realizado na cidade de Teresópolis/RJ em 1998 é apresentado em anexo.

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 *DOWNSTREAM PROCESSING*

Embora o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante (r-DNA) tenha possibilitado a obtenção de bioprodutos, como enzimas (celulases, lipases, acilases, etc.), hormônio de crescimento humano, agentes anti-câncer (citostáticos) em grandes quantidades, tais desenvolvimentos necessitam de processos de isolamento e purificação (*downstream processing*).

Downstream processing refere-se aos diferentes tipos de operações unitárias utilizados para recuperar e purificar o produto de um bioreator, com o nível de pureza desejado e com um custo mínimo. Nos anos 60 e 70 o objetivo principal da indústria biotecnológica referia-se à redução de custos de produção uma vez que o custo de desenvolvimento e fermentação (*upstream processing*) correspondia a até 80% do custo total do processo. Atualmente, devido às técnicas de manipulação genética e dos procedimentos de fermentação bem planejados e bem controlados houve uma redução considerável no custo do *upstream processing* (VAN DER WILEN, 1999). Entretanto, devido à crescente necessidade de obtenção de produtos com elevada pureza, como por exemplo, para os produtos usados na terapia gênica, grande esforço tem sido realizado no sentido de melhorar e tornar mais econômicas as etapas referentes ao *downstream processing*, uma vez que os processos de separação do bioproduto de seus contaminantes e as respectivas etapas de purificação podem, dependendo do caso, representar aproximadamente 80% do custo total do processo.

1.1.1 – Desafios

Se a tecnologia do DNA recombinante (r-DNA) favoreceu a indústria biotecnológica por um lado, por outro ela tornou a etapa de separação um pouco mais delicada. A purificação de moléculas de células recombinantes pode ser fortemente influenciada pela biologia molecular dos genes isolados e expressos (DYR e SUTTNAR, 1997). Nesse caso, a purificação das proteínas recombinantes difere um pouco da purificação convencional pois, devido à presença de corpos de inclusão, pode ser necessário o uso da técnica de proteínas de fusão com caudas, como por exemplo o uso de cauda de histidina ligada ao carbono terminal da cadeia peptídica, que facilitará a purificação da proteína alvo visto que a histidina interage com o complexo metal-IDA ligado ao adsorvente substituindo o metal, técnica de separação conhecida como adsorção por metal imobilizado (CHONG *et al.*, 1997; KAUFMANN (1997); ALONSO *et al.*, 1999; STEFFENS *et al.*, 2000; SOUSA (2001)). Em certos casos, uma etapa de renaturação também se faz necessária para que se obtenha a proteína em um estado bioativo (DYR e SUTTNAR, 1997). Um dos grandes desafios do *downstream processing* é a redução do tempo de produção, com respectiva redução dos níveis de resíduos (CHAUDHURI, 1995). Com relação a redução no tempo de processamento, a técnica de adsorção em leito expandido, surge como uma forte ferramenta principalmente para produtos recombinantes (RAYMOND *et al.*, 1998; FEUSER *et al.*, 1999; LEVISON *et al.*, 2000). Um outro parâmetro também importante é o desenvolvimento de matrizes cromatográficas que reduzam a resistência a transferência de massa, reduzindo assim o tempo de processamento (O'BRIEN *et al.*, 1996; LEVISON *et al.*, 1997; CONDER e HAYEK (2000); PAI *et al.*, 2000; PALSSON *et al.*, 2000).

1.1.2 – Tendência

A tendência atual para o *downstream processing* refere-se principalmente ao uso do chamado “processo integrado” que trata a cultura de células (fermentação) e a etapa de purificação não mais como duas unidades distintas e sim como uma só unidade. Nesse caso, o desenvolvimento das etapas de fermentação e purificação em paralelo melhoraria a comunicação dentro da indústria e permitiria a

visualização completa do processo (CHAUDHURI, 1995). Um exemplo de aplicação do processo integrado foi relatado por JONASSON *et al.* (2000) para a obtenção do hormônio proinsulina humana à partir de técnicas recombinantes usando *E. coli* como microrganismo hospedeiro. VAN DER WIELEN (2001) menciona que as leis atuais de mercado, traduzida em uma necessidade de se conseguir ou compartilhar um determinado mercado para um produto, em um curto espaço de tempo, impõe uma competitividade de preço na qual o projeto racional do bioprocessamento é fator essencial na redução do custo total deste. Esse autor classifica os produtos biotecnológicos em três classes, são elas:

(1) biofarmacêuticos (anticorpos monoclonados, vacinas, insulina e produtos aplicados a terapia gênica) que são em sua maior parte produzidos em uma escala modesta (de 1 a 10 toneladas/ano) porém com um alto preço de venda, usualmente acima de US\$ 10.000/kg.

(2) farmacêuticos (antibióticos) que são produzidos em média escala (de 100 a 1000 toneladas/ano) e preço médio de vendas na ordem de US\$ 10 a 100/kg, sendo esse atrativo mercado alvo de uma concorrida disputa de preços.

(3) Commodities tais como etanol (13.000.000 toneladas/ano), ácidos orgânicos (100.000 – 300.000 toneladas/ano) e amino ácidos (10.000 – 800.000 toneladas/ano). Nesse caso, grandes quantidades de biomassa residual de plantações de agricultura, bem como, de açúcares advindos de fermentação de baixo custo, estão sendo considerados como matéria-prima para a obtenção de produtos químicos por fermentação.

SCHUGERL (2000) menciona que a recuperação de produtos usando um processo integrado, principalmente para o etanol e o butanol, oferece uma desvantagem econômica, tornando-os não competitivos com os produtos de origem petroquímica. O uso do processo integrado para a recuperação de ácido láctico usando eletrodialise pode ser bem sucedido em nível industrial. Porém, o processo integrado para a recuperação de proteínas pode ser caro, necessitando assim que sejam desenvolvidos e implementados métodos mais econômicos.

Com relação aos produtos, sem dúvida alguma, a tendência atual é a obtenção de biomoléculas a serem aplicadas à terapia gênica, como por exemplo, a purificação de plasmídeo de DNA para produção de vetores e a produção de vacinas de DNA (YASUKAWA *et al.*, 1997; BARNTHOUSE *et al.*, 1998; LEVISON *et al.*, 1998; PRAZERES *et al.*, 1998; BRAAS *et al.*, 2000; CRUZ *et al.*, 2000; FERREIRA *et al.*, 2000; LEVY *et al.*, 2000), a produção da glicoproteína fator IX (BRANOVIC *et al.*, 2000), hormônio de crescimento humano (BAILEY e MEAGHER (2000)), imunoglobulina A (IgA) (LUELLAU *et al.*, 1998) e do fator tecidual ativador do plasminogênio (t-PA) (ROUF *et al.*, 2000).

1.1.3 – *Downstream processing* de algumas enzimas existentes na literatura

PRICE e STORCK (1975) obtiveram uma quitosanase extracelular a partir de *Streptomyces sp* N° 6. A enzima foi purificada usando seis etapas, dentre elas três cromatográficas, usando sephadex G-100, CM-celulose e dietilaminoetil-celulose, respectivamente. O processo final resultou em um fator de purificação de 2,1 e uma recuperação de 28%. A massa molar da enzima purificada foi estimada por SDS-page (26000 Da) e por permeação em gel Sephadex G-100 (29000 Da).

PELLETIER e SYGUSCH (1990) obtiveram três enzimas com atividade quitosanólítica usando o *Bacillus megaterium* P1 e quitosana e D-glicosamina como meio indutor. Estas enzimas foram identificadas por esses pesquisadores como quitosanase A, B e C. A quitosanase A foi purificada usando apenas três etapas: uma precipitação com sulfato de amônio (50 a 90% de saturação) seguida por uma cromatografia de troca catiônica (com o adsorvente Mono S e eluição com 0,06-0,08 de KCl) e por uma filtração em gel. Um fator de purificação (FP) final de 499 com uma recuperação de 35% foram apresentados para a quitosanase A. As massas molares das três enzimas determinadas por SDS-page foram de 43000, 39500 e 22000 Da, para as quitosanases A, B e C, respectivamente.

YOSHIHARA *et al.* (1992) produziram e purificaram uma quitosanase usando um gênero *Pseudomonas*. A bactéria denominada *Pseudomonas sp.* H-14 produziu uma quitosanase que foi purificada em três etapas, com fator de

purificação final de 1,6 e rendimento de 55,2%. A enzima apresentou uma massa molar de 35000 Da obtida por SDS-page e ponto isoelétrico (pI) de 10,1.

ALFONSO *et al.* (1992) produziram e purificaram duas quitosanases usando um gênero *Mucor rouxii*. Duas quitosanases identificadas como quitosanase A e B foram purificadas em quatro etapas, com fator de purificação final de 54,0 e rendimento de 72,0% para a quitosanase A e com fator de purificação final de 130,0 e rendimento de 25,0% para a quitosanase B. A quitosanase A apresentou uma massa molar de 76000 Da e a quitosanase B de 58000 Da. O pI das enzimas determinadas por SDS foram 4,9 e 4,7, para as enzimas A e B, respectivamente.

SHIMOSAKA *et al.* (1993) produziram e purificaram uma quitosanase a partir do microrganismo *Fusarium solani* nomeado *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* SUF386. Um procedimento com seis etapas foi utilizado para purificar a enzima. Um fator de purificação de 35,6 e uma recuperação de 10% foram obtidos no final. A enzima, caracterizada como uma endo-quitosanase, apresentou massa molar de 36000 Da, com pH de máxima atividade de 5,6 a 40 °C.

YAMASAKI *et al.* (1993) purificaram uma enzima com atividade quitosanólítica obtida de *Enterobacter sp.* G-1. Esses pesquisadores utilizaram três etapas para purificar a enzima, são elas: precipitação com sulfato de amônio (30% de saturação), seguida por uma focalização isoelétrica e por filtração em gel. A enzima apresentou uma massa molar de 50000 Da com um pI de 5,5. Um fator de purificação de 11 e uma recuperação de 25,8% da atividade inicial foram obtidos no final do processo.

OKAJIMA *et al.* (1994) purificaram uma quitosanase produzida por *Amycolatopsis sp.* CsO-2. Um procedimento em três etapas foi utilizado para purificar esta enzima. Inicialmente uma precipitação com sulfato de amônio (30-80% de saturação) foi utilizada como etapa de concentração, seguida de uma diálise e cromatografia de troca catiônica. A enzima apresentou um fator de purificação de 64,7 vezes com uma recuperação de 63%. A massa molar determinada por SDS-page e permeação em gel foi de 27000 Da e ponto isoelétrico (pI) de 8,8.

SHIMOSAKA *et al.* (1995) produziram e purificaram duas quitosanases usando um gênero *Acinetobacter sp.* linhagem CHB101. Duas quitosanases identificadas como I e II foram purificadas em quatro etapas, com fator de purificação final de 6,4 e rendimento de 17,0% para a quitosanase I e com fator de purificação final de 15,4 e rendimento de 16,0% para a quitosanase II. A quitosanase I apresentou uma massa molar de 37000 Da e a quitosanase II de 30000 Da.

HYEAN-WOO *et al.* (1996) purificaram uma quitosanase produzida por *Bacillus sp.* HW-002. Um procedimento em oito etapas foi utilizado para purificar esta enzima. A enzima apresentou um fator de purificação de 251,0 vezes com uma recuperação de 21%. A massa molar de 46000 Da foi determinada por SDS-page enquanto que um valor de 23000 Da foi obtido por permeação em gel.

AK *et al.* (1998) produziram e purificaram uma quitosanase a partir de um fungo o *Penicillium spiculosum*. Um procedimento com duas etapas foi utilizado para purificar a enzima, consistindo basicamente de uma precipitação com sulfato de amônio seguido por uma cromatografia de troca iônica usando CM-sephadex. Um fator de purificação de 49,97 vezes e uma recuperação de 8,57% foram obtidos no final.

ABDEL-AZIZ (1999) produziu e purificou duas quitosanases usando um gênero *Bacillus alvei*. Duas quitosanases identificadas como A e B muito embora apenas uma quitosanase tenha sido purificada. Dessa forma, após o uso de quatro etapas, a quitosanase A foi purificada com banda única no gel de SDS com fator de purificação final de 49,0 vezes e rendimento de 19,0%.

1.2 ADSORÇÃO EM LEITO EXPANDIDO

O desenvolvimento de técnicas que reduzam o número de etapas do “downstream processing” é de grande interesse na área biotecnológica, uma vez que o mesmo pode comprometer em até 80% do custo do processo de recuperação de um bioproduto. A Figura 1 mostra um diagrama de um processo de purificação de um bioproduto com os diferentes estágios do “downstream processing”.

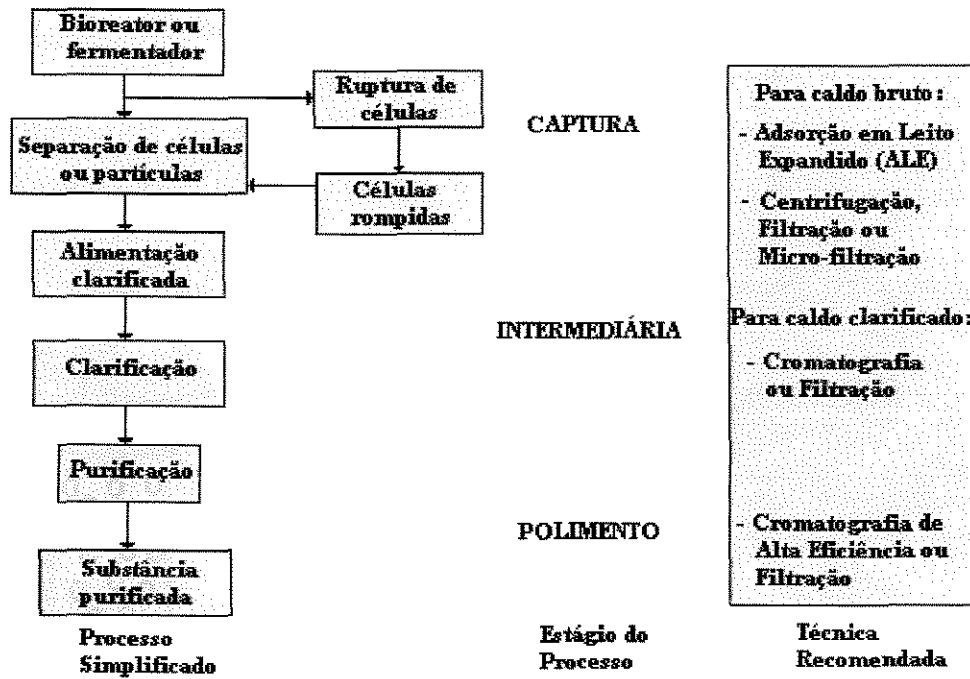


Figura 1 – Diagrama de um processo de purificação de um bioproduto

A adsorção em leito expandido é uma técnica baseada na fluidização. Embora utilizados inicialmente na década de 70 como ferramenta para a recuperação de proteínas, os leitos fluidizados não mostraram na época muito interesse principalmente pelas dificuldades técnicas existentes, como por exemplo, a limitação das propriedades físicas das matrizes adsorventes (DASARI *et al.*, 1993). É notável, porém, o crescente interesse recente dos pesquisadores (CHASE, 1994; CHASE e DRAEGER, 1992; CHANG *et al.*, 1993; DASARI *et al.*, 1993; DE LUCA *et al.*, 1994; McCREATH *et al.*, 1995; FREJ *et al.*, 1994; BATT *et al.*,

1995; CHANG e CHASE, 1996 (a); FREJ *et al.*, 1997; KARAU *et al.*, 1997; PEREIRA *et al.*, 1998; ANSPACH *et al.*, 1999; FEUSER *et al.*, 1999; LEVISON *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2000) na aplicação da técnica de adsorção em leito expandido para recuperar e purificar proteínas de soluções contendo ou não material particulado. Conforme se observa na Figura 1 a adsorção em leito expandido permite a captura, a recuperação e a purificação inicial da biomolécula alvo em uma única etapa.

A Figura 2 ilustra o princípio de funcionamento de um processo de adsorção em leito fixo e expandido. Pode-se observar que operando em leito fixo o material particulado bloqueia a coluna (Figura 2a). Entretanto, ao ser operado de forma expandida o material particulado passa pelo leito sem haver a obstrução da coluna (Figura 2b).

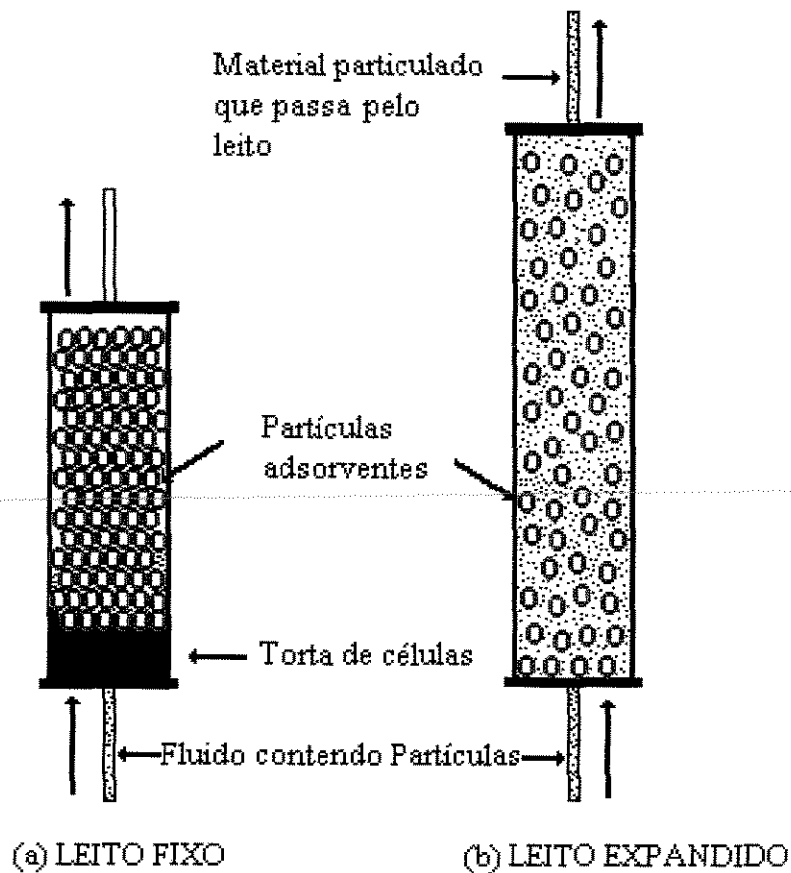


Figura 2 - Processos de adsorção: (a) leito fixo (b) leito expandido. (CHASE e DRAEGER, 1992)

BUIJS e WESSELINGH (1980) tentaram estabilizar o leito num processo tipo “cascata”. Nesse estudo, o leito foi dividido em um número de pequenos compartimentos, cada um trabalhando como um leito fluidizado. Quando estes compartimentos foram considerados juntos, houve um aumento na eficiência global do leito. Outras técnicas de estabilização do leito são encontradas na literatura, sendo que a maior parte baseia-se no uso de partículas adsorventes levemente magnetizadas (CHETTY e BURNS, 1991; TERRANOVA e BURNS, 1991) havendo, porém, dificuldades para aumento de escala pelo uso de equipamentos caros (HJORTH *et al.*, 1995).

A principal vantagem da utilização da adsorção em leito expandido, sobre a técnica cromatográfica convencional em leito fixo, é que a coluna pode ser alimentada com solução contendo células ou resíduos celulares em suspensão (Ex. caldos de fermentação ou homogenizados celulares) sem a necessidade de remoção prévia das mesmas, reduzindo assim a etapa do processo referente à filtração ou centrifugação, ou seja, reduzindo o número de etapas no processo e evita-se a perda da atividade da biomolécula alvo devido à presença de proteases, ácidos nucleicos, etc.

As partículas adsorventes utilizadas na adsorção em leito expandido possuem uma distribuição de tamanho e de densidade. Essa distribuição de tamanho e de densidade provoca o fenômeno de segregação no leito, que nada mais é que um gradiente de concentração dentro do leito, com as partículas menores ou menos densas posicionando-se na parte superior do leito e as partículas maiores ou mais densas posicionando-se na parte inferior. Dessa forma, o leito expandido pode ser considerado como composto por diversos leitos fixos agrupados formando o leito total. É esse comportamento que dá estabilidade ao leito e faz com que na adsorção em leito expandido o fluido apresente um comportamento mais próximo de um regime empistonado (*plug flow*) que o de completamente misturado. WEN e YU (1966) definem como condição para a existência de um leito classificado que a razão de diâmetro seja maior que 1,3 ($d_B/d_S > 1,3$), enquanto AL DIBOUNI e GARSIDE (1979) definiram que a razão

de diâmetro seja maior que 2,2 ($d_B/d_S > 2,2$), para que se obtenha um leito classificado.

O desempenho de um método cromatográfico para a purificação de proteínas pode ser caracterizado pela sua capacidade e resolução. No caso de uma operação de recuperação primária acrescenta-se ainda a eficiência de clarificação e a redução do volume do processo (THÖMMES, 1997). Considerando a adsorção em leito expandido, o desempenho global é influenciado pelos parâmetros do sistema e pelos parâmetros de operação. Dessa forma, existe uma gama de parâmetros que influencia a adsorção de proteínas em leito expandido, conforme pode ser observado na Figura 3. A seguir far-se-á uma análise dos principais parâmetros, dentre àqueles que são mostrados na Figura 3, que influenciam o desempenho da adsorção de proteínas em leito expandido. Antes, porém, comenta-se sobre o modo e o princípio de operação usando a adsorção em leito expandido.

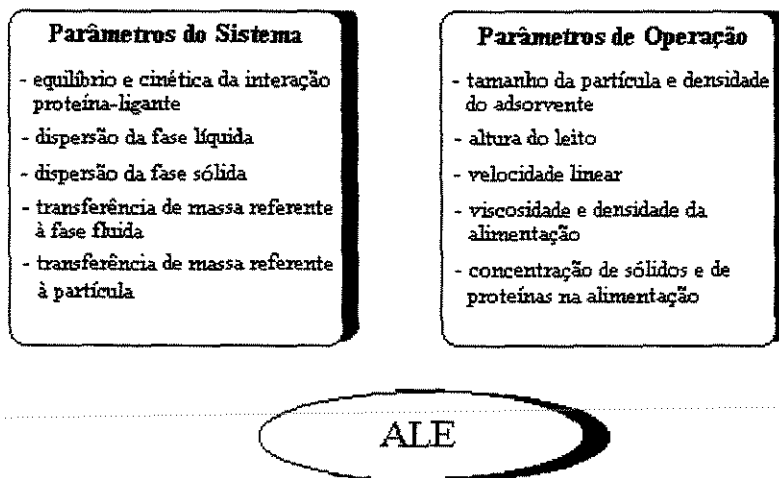


Figura 3 – Parâmetros que influenciam a adsorção em leito expandido (ALE) (THÖMMES, 1997)

1.2.1 – Princípios e Operação

A adsorção em leito expandido baseia-se na fluidização. Dessa forma, partindo-se de um leito fixo e aumentando-se a vazão de fluido atinge-se uma velocidade na qual a força de arraste iguala-se ao peso das partículas, ou seja, a força de arraste iguala-se a queda de pressão em uma determinada área transversal. Então, um leito fluidizado estável é formado quando as partículas adsorventes são suspensas devido ao equilíbrio entre a velocidade de sedimentação e a velocidade do fluido ascendente. Diferente da técnica de fluidização convencional, que é caracterizada principalmente pela ocorrência de mistura, resultando assim em uma baixa eficiência de ligação adsorvente-proteína, essa técnica opera em condições “suaves” de fluidização, ocasionado pela segregação das partículas adsorventes e caracterizado por um baixo Re_p (Reynolds da partícula) da ordem de 0,5-1, aumentando então a eficiência da ligação adsorvente-proteína.

O equipamento utilizado na adsorção em leito expandido consiste basicamente de uma coluna com um distribuidor e um pistão, que permite a mudança de posicionamento durante o processo e os acessórios comuns aos processos cromatográficos como bombas, registradores, etc.

O modo de operação da adsorção em leito expandido difere um pouco dos processos cromatográficos convencionais (leito fixo) uma vez que se opera com uma maior porosidade do leito, da ordem de 0,7 a 0,8 (para velocidade linear (superficial) na ordem de 300,0 a 400,0 cm/h), quando comparado com os processos em leito fixo cujos valores típicos de porosidade do leito é de aproximadamente 0,4. É baseado nesse fato que se utiliza o leito expandido como alternativa para os processos biotecnológicos que contém material particulado, uma vez que as células rompidas ou não, podem passar pelo leito sem obstruir a coluna.

Na adsorção em leito expandido o equilíbrio entre o sistema tamponante e o adsorvente é realizado com o fluxo ascendente e com o leito na forma expandida. Ou seja, nessa etapa o pistão é posicionado na parte superior da coluna permitindo assim a expansão do leito. No equilíbrio, o volume de fluido aplicado

ao leito é geralmente cinco vezes o volume do leito empacotado do adsorvente. Após a etapa de equilíbrio segue-se a etapa de aplicação do material. Essa etapa também é realizada com fluxo ascendente e com o leito na forma expandida, ou seja, com uma maior porosidade do leito. Aplicada à amostra, realiza-se a lavagem, também com o fluxo ascendente, para se retirar do leito o material fracamente ligado ao adsorvente, tais como células residuais, outros tipos de materiais particulados e moléculas não adsorvidas. Em seguida, o fluxo de solução tamponante para o leito é interrompido, espera-se a sedimentação do adsorvente e o pistão é abaixado até a superfície do adsorvente. Nessa etapa o sentido do fluxo é invertido e a eluição é realizada com o sentido do fluxo descendente com o leito fixo. Pode-se utilizar a eluição da proteína alvo com o leito expandido, porém aumenta-se o volume de eluição, diluindo-se a proteína alvo na solução, o que não é interessante. Após a eluição, a regeneração do adsorvente é realizado *in situ*, por um procedimento chamado *clean-in-place*. CHANG e CHASE (1996 (a)) propõem o uso de cloreto de sódio (NaCl, 1M) ou hidróxido de sódio (NaOH, 0,5 a 1M). Como na eluição, o *clean-in-place* pode ser realizado tanto na forma expandida como em leito fixo, sendo que o procedimento de limpeza no modo fixo é mais comum. A Figura 4 ilustra as etapas usadas na adsorção em leito expandido.

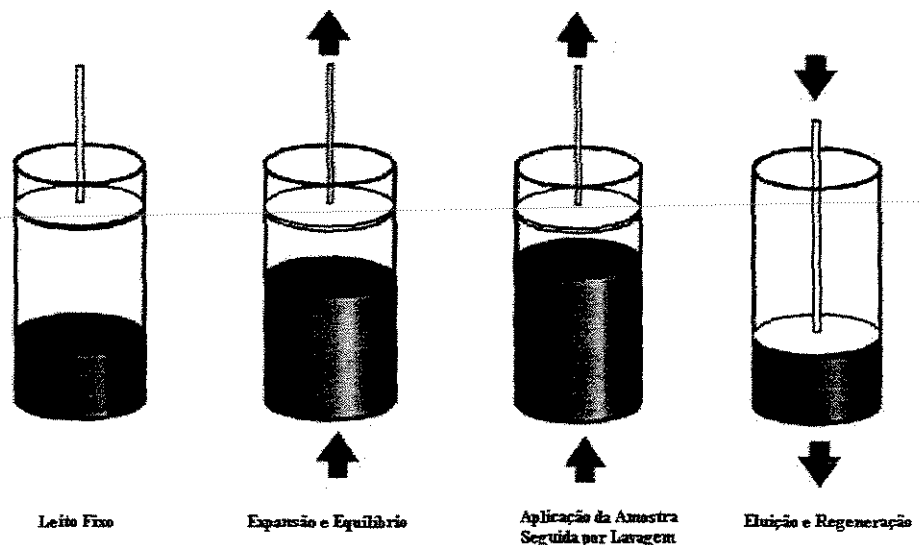


Figura 4 – Etapas usadas na adsorção em leito expandido (EBA HANDBOOK, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, 1997)

1.2.2 - Hidrodinâmica do leito expandido

O conhecimento do comportamento do leito em função das propriedades físicas das partículas e do fluido é de fundamental importância para as operações usando leito expandido. Essa caracterização ocorre principalmente medindo-se a expansão do leito em função da velocidade do fluido, ou observando-se a influência de outros fatores como distribuição de tamanho de partículas, viscosidade do fluido, presença de células, condutividade do caldo, na ligação proteína-adsorvente. CHASE e DRAEGER (1992) mencionam que o sucesso da purificação de proteínas, usando a adsorção em leito expandido, depende crucialmente da habilidade do sistema em produzir um leito com expansão estável. Essa condição é fundamental para que se possa realizar um aumento de escala, partindo-se de resultados obtidos em pequena escala no laboratório.

Como enfatizado anteriormente, a obtenção de um leito com expansão estável é uma condição *sine qua non* para a aplicação da adsorção em leito expandido, estando a estabilidade do leito ligada diretamente ao distribuidor utilizado (SANTOS *et al.*, 2000).

No estudo da estabilidade do leito deve-se conhecer qual o efeito da velocidade do fluido na expansão. Dessa forma, como a adsorção em leito expandido é baseada na fluidização, é prática correlacionar a expansão leito devido à vazão usando a equação de Richardson e Zaki.

RICHARDSON e ZAKI (1954) estudaram a sedimentação e fluidização de vidro, divinil-benzeno e balas de chumbo usando soluções como cloreto de sódio, M-cresol, bromofórmio e glicerol e obtiveram uma equação que relaciona a velocidade do fluido (U) e a velocidade terminal da partícula (U_t), com a porosidade do leito (ε) na forma:

$$\frac{U}{U_t} = \varepsilon^n \quad (1)$$

sendo que o índice de expansão (ou índice de Richardson-Zaki) n é uma função do número de Reynolds terminal (Re_t).

$$Re_t = \frac{d_p \rho_L U_T}{\mu} \quad (2)$$

A velocidade terminal de uma partícula isolada (U_T) no regime de Stokes ($Re_p < 0,1$) é dada por:

$$U_T = \frac{g d_p^2 (\rho_p - \rho_L)}{18\mu} \quad (3)$$

sendo Re_p dado por:

$$Re_p = \frac{d_p \rho_L U}{\mu} \quad (4)$$

Para situações em que o diâmetro das partículas é muito menor que o diâmetro da coluna, pode-se obter n a partir das equações:

$$n = 4,35 Re_t^{-0,03} \quad \text{para } 0,2 < Re_t < 1 \quad (5)$$

$$n = 4,45 Re_t^{-0,1} \quad \text{para } 1 < Re_t < 500 \quad (6)$$

$$n = 2,39 \quad \text{para } 500 > Re_t \quad (7)$$

sendo que a porosidade do leito (ε) é relacionada com a altura do leito (H) por:

$$\varepsilon = 1 - \frac{V_s}{V_L} = 1 - \frac{V_s}{A_T H} = 1 - \frac{m_p}{\rho_p A_T H} \quad (8)$$

Sendo V_s o volume do adsorvente, V_L o volume do leito, A_T a área da seção transversal da coluna. A Equação 1 relaciona a velocidade superficial do fluido (U) com a velocidade terminal de uma partícula isolada em um fluido infinito (U_T), a porosidade do leito (ε) e um coeficiente (n), conhecido como coeficiente de Richardson e Zaki, sendo (n) função do número de Reynolds da partícula (Re_p). A principal informação que esta equação nos fornece é que a velocidade terminal de uma partícula isolada é reduzida pela presença de outras.

Pode-se determinar experimentalmente a velocidade terminal de uma partícula isolada (U_T) e o coeficiente de Richardson e Zaki (n) para um dado leito se forem conhecidos os valores da porosidade para uma dada velocidade do fluido. Linearizando a Equação (1) obtém-se uma relação entre a velocidade superficial do fluido (U) e a porosidade do leito (ε) na forma:

$$\text{Log } U = \text{Log } U_T + n \text{Log } \varepsilon \quad (9)$$

sendo o coeficiente angular igual a (n) e o coeficiente linear igual a logaritmo de U_T .

O trabalho de RICHARDSON e ZAKI (1954) é sem dúvida uma referência para o estudo da hidrodinâmica dos leitos fluidizados sólido-líquido que motivou outros trabalhos na área (WEN e YU, 1966; VOLPICELLI *et al.*, 1966; WALLIS, 1977; GIBILARO *et al.*, 1984; THOMAS e YATES, 1985; ROWE, 1987; DI FELICE, 1995). A Equação (1) é usada sem modificação na literatura para descrever o comportamento de leito expandido, ajustando bem os dados obtidos (DASARI *et al.*, 1993; DE LUCA *et al.*, 1994; THÖMMES *et al.*, 1995 (a)). Entretanto, existem algumas objeções na comparação de alguns sistemas com os parâmetros propostos por RICHARDSON e ZAKI (1954). THOMAS e YATES (1985) questionam em seu trabalho a aplicação direta da Equação 1 e apresentam algumas correlações úteis para as aplicações biotecnológicas, principalmente para o cálculo de Re_t . DASARI *et al.* (1993) apresentam valores para o índice de Richardson e Zaki (n) superiores aos apresentados por RICHARDSON e ZAKI (1954) fluidizando sílica porosa com diol-Lichroprep ($d_p = 40-60\mu\text{m}$) em água ($n=5,02$) e com um fluido amniótico bovino ($n=7,75$).

Considerando ainda a formação de um leito estável, existem três modos de se avaliar a estabilidade do leito, são elas:

- **Observação visual**

A observação visual da estabilidade do leito é utilizada mais com o caráter confirmativo, por ser esta rápida e não dispendiosa. Um fato desfavorável para o

uso desse modo é que não se garante a reprodutibilidade dos resultados (EBA HANDBOOK, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, 1997).

▪ **Grau de expansão (H/H_0)**

Este é o modo mais prático e utilizado na caracterização de um leito expandido. O grau de expansão é um número adimensional, o mesmo consiste da medida relativa da altura do leito expandido, para uma determinada vazão, com a altura do leito fixo do adsorvente. A Figura 5 ilustra um exemplo do cálculo do grau de expansão do leito.

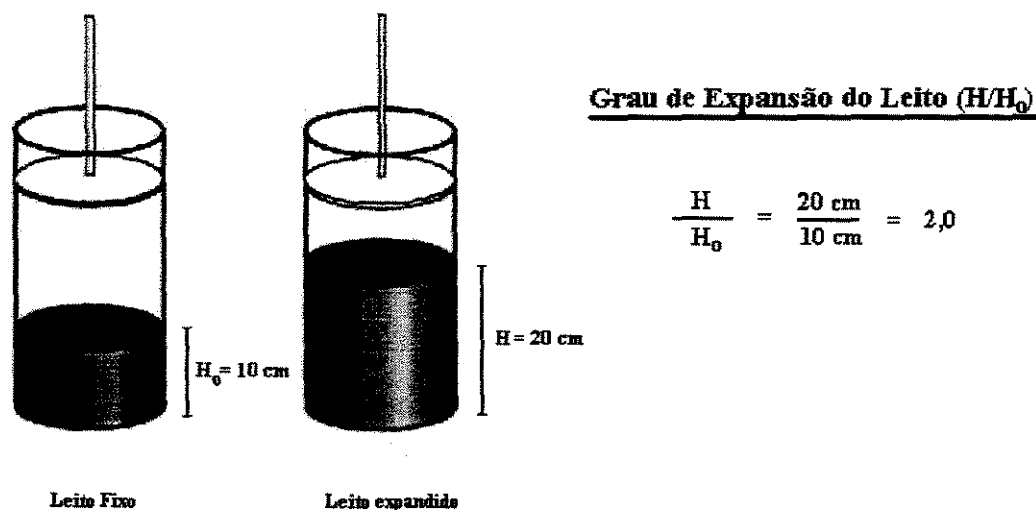


Figura 5 – Grau de expansão do leito (H/H_0)

Grande parte dos trabalhos existentes na literatura caracteriza a expansão do leito utilizando o grau de expansão, cita-se como exemplo, os trabalhos de CHANG e CHASE (1996 (a)) e de KARAU *et al.* (1997).

▪ **Distribuição do tempo de residência (DTR)**

A distribuição do tempo de residência (DTR) é obtida utilizando-se uma técnica de estímulo e resposta (LEVENSPIEL, 1972), usando-se um traçador e

caracteriza o tipo de escoamento existente dentro da coluna. O conhecimento do tipo de escoamento existente, ou seja, se o mesmo é empistonado (*plug flow*), de mistura perfeita (*back mixing*), ou se intermediária entre estes dois, é de fundamental importância, pois as diferentes características destes influenciam a cinética de adsorção proteína-adsorvente. Outro fator importante é que, a partir dos parâmetros obtidos da distribuição do tempo de residência (DTR) pode-se avaliar a possibilidade, ou não, de se aplicar a amostra ao leite.

Dentre as técnicas de estímulo e resposta existentes, as técnicas conhecidas como *pulso* e *frontal*, sendo esta última a mais utilizada na indústria, também é aplicada no estudo da expansão do leite. A DTR é caracterizada a partir do número de Peclet (Pe) (CHANG e CHASE, 1996 (a)), ou de um número adimensional similar, como por exemplo, o número de Bodenstein (Bo) (THÖMMES *et al.*, 1995 (a); KARAU *et al.*, 1997). Usando-se a técnica frontal com sinal negativo e comparando as variâncias dos modelos de dispersão axial com os de tanques em série (FREJ *et al.*, 1997) valores do coeficiente de dispersão axial (D), número de pratos (N) e altura de pratos teóricos podem ser obtidos. Dessa forma, a relação entre o número de pratos teóricos e o coeficiente de dispersão axial é dado por:

$$N = \frac{U H}{2 \varepsilon D_{axl}} \quad (10)$$

(U) a velocidade do fluido, (D_{axl}) o coeficiente de dispersão axial da fase líquida, (N) o número de pratos teóricos e (H) a altura do leite expandido.

Nesse procedimento de determinação da DTR (Frej *et al.*, 1997), a solução contendo o traçador é bombeada para o leite até que a leitura no detector seja máxima (100%) (esta etapa refere-se ao sinal positivo). Uma vez que o traçador esteja produzindo uma resposta máxima, marca-se no papel um tempo de referência (tempo zero) e espera-se que a resposta chegue a linha de base (esta etapa refere-se ao sinal negativo). Define-se então o tempo de residência médio (t) como sendo a distância no papel, do tempo zero até a leitura (absorbância) de 50%. O desvio padrão (σ) é definido como a metade da distância entre os pontos

de leitura 15,85% e 84,15% da absorvância máxima. O número de pratos teóricos (N) é determinado, da técnica de sinal negativa, por:

$$N = \frac{t^2}{\sigma^2} \quad (11)$$

A Figura 6 mostra um esquema da utilização da técnica frontal na determinação do tempo de residência (DTR).

Os dados da literatura mostram que o escoamento em leito expandido aproxima-se do empistonado (BATT *et al.*, 1995; KARAU *et al.*, 1997), valores do coeficiente de dispersão da fase líquida para a adsorção em leito expandido variam da ordem de 10 a 10^{-3} cm^2/s , porém a maior parte dos dados descritos na literatura mostram o valor da ordem de $0,1$ cm^2/s .

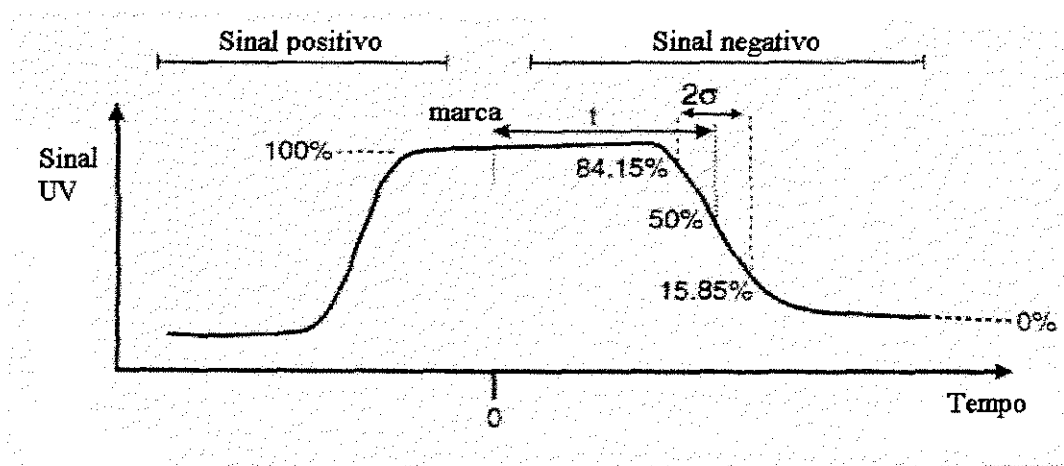


Figura 6 – Determinação do tempo de residência (DTR) (EBA HANDBOOK, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, 1997)

1.2.3 - Adsorventes

A escolha do adsorvente é um parâmetro muito importante quando se usa um leito expandido. Dessa forma, a capacidade física e química dos adsorventes deve ser considerada, uma vez que, a própria expansão do leito pode provocar a atrição das partículas adsorventes comprometendo assim o processo. Dentre os adsorventes existentes, os que se baseiam na troca iônica são mais utilizados, muito embora não tenham uma alta especificidade quando comparados com os

adsorventes de afinidade, porém o seu reduzido custo e seus ligantes mais robustos os tornam mais atrativos. Os adsorventes de troca iônica estão sendo usados nos processos de purificação de proteínas, sejam em escala laboratorial ou na produção em planta industrial. A principal característica que um adsorvente deve apresentar para que possa ser usado em leito expandido é que o mesmo apresente uma maior massa específica que o meio de fluidização e uma distribuição de tamanho que favoreça a segregação do leito. Para o aumento da massa específica pode-se utilizar quartzo como os produzidos pela Amersham Pharmacia Biotech, ou qualquer outro tipo de material denso, como por exemplo, aço inoxidável como os adsorventes fabricados pela companhia Up Front. Um novo adsorvente de estrutura pelicular (Pellicular), baseado em núcleo de zircônia revestido por agarose que lhe confere uma maior massa específica, permitindo que uma maior produtividade seja obtida sem comprometer as propriedades hidrodinâmicas e cromatográficas, foi desenvolvido no Biochemical Recovery Group (BRG) da Universidade de Birmingham (UK). No capítulo 3 desta tese está apresentada a comparação entre o adsorvente Pellicular e dois adsorventes comerciais (Streamline e Macrosorb).

▪ Adsorção por troca iônica

A adsorção de proteínas por troca iônica é baseada na distribuição de carga das proteínas (SCOPES, 1988). As proteínas são adsorvidas nas resinas trocadoras de íons por ligações eletrostáticas entre as cargas opostas da superfície da proteína e o grupo carregado do adsorvente. Nesse contexto, as cargas são balanceadas por contra-íons, como por exemplo, íons cloreto, íons metálicos ou mesmo íons existentes na solução tampão. O resultado é a neutralidade do adsorvente e o saldo de carga da proteína será de mesmo sinal que os contra-íons deslocados.

Atualmente, existem poucas resinas de troca iônica disponíveis comercialmente para uso em leito expandido. Na Tabela 1 estão apresentadas as principais resinas disponíveis comercialmente.

Tabela 1 - Matrizes usadas na adsorção em leite expandido

Nome Comercial	Característica	Uso
Streamline® SP	Trocadora de cátions (forte)	Troca iônica
Streamline® DEAE	Trocadora de ânions (fraca)	Troca iônica
Streamline® Q XL*	Trocadora de ânions (forte)	Troca iônica
Streamline® SP XL*	Trocadora de cátions (forte)	Troca iônica
UFC High exchange media	Alimentação com baixa força iônica	Troca iônica

* - Segundo os fabricantes, estas resinas oferecem maior capacidade dinâmica de ligação, assim como maior produtividade.

1.2.4 - Distribuidores

Os distribuidores são utilizados como suporte para o leite estático, e para assegurar uma distribuição uniforme do fluido dentro do leito. Os distribuidores devem evitar a erosão das partículas, operar sem obstruir e com a menor queda de pressão possível, para minimizar o consumo de energia (GELDART, 1985). Os tipos de distribuidores mais utilizados nos estudos biotecnológicos são os porosos e o tipo multi-orifício. Um dos principais parâmetros que caracteriza um distribuidor é a fração de área livre (F) (KUNII e LEVENSPIEL, 1991). Esse parâmetro relaciona a área disponível para passagem do fluido com a área total do distribuidor, na forma:

$$F = \frac{N_{or} A_{or}}{A_d} \quad (12)$$

N_{or} é o número de orifícios do distribuidor; A_{or} a área do orifício; A_d a área do distribuidor. A Figura 7 ilustra um distribuidor tipo multi-orifício com os dois tipos de arranjos mais utilizados para a distribuição dos orifícios. Na parte superior destaca-se o arranjo quadrático e na inferior o arranjo triangular. GELDART

(1985) sugere o uso do distribuidor com arranjo triangular ao invés do distribuidor com arranjo quadrático.

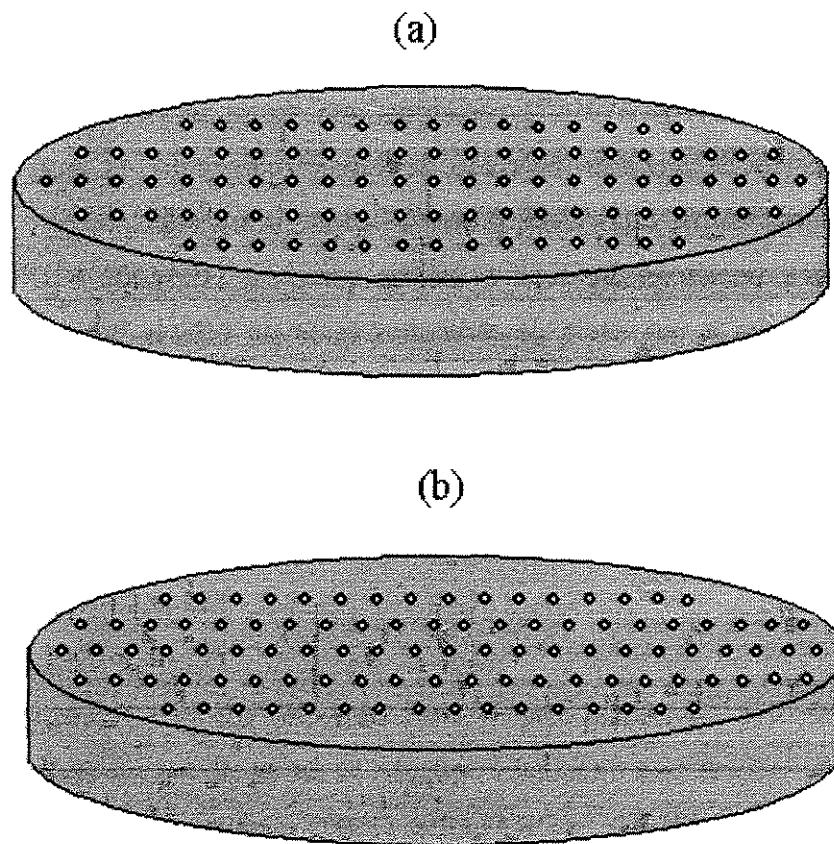


Figura 7 - Distribuidor multi-orifício (prato perfurado) e arranjos. (a) quadrático (b) triangular

Como enfatizado anteriormente, o sucesso da adsorção em leito expandido depende da formação de um leito estável. Dessa forma, o distribuidor possui um papel fundamental, junto com o adsorvente, na formação da estabilidade do leito. Por outro lado, nota-se uma escassez de dados na literatura sobre as características dos distribuidores utilizados na adsorção em leito expandido. O principal motivo desse fato talvez seja porque, a maioria dos trabalhos existente utiliza colunas produzidas para fins comerciais, sendo os dados da característica do distribuidor omitidos nos catálogos. Ao nosso conhecimento, somente no trabalho de DE LUCA *et al.* (1994) e SANTOS *et al.* (2000) pode-se

encontrar dados a respeito do distribuidor usado para a adsorção em leite expandido.

1.2.5 – Equilíbrio da adsorção

THÖMMES (1997) menciona que ao se utilizar leitos fluidizados para adsorção de proteínas do caldo de fermentação bruto, as propriedades do caldo influenciam na capacidade proteína-ligante, principalmente devido à presença de ácidos nucleicos, lipídeos e células rompidas. CHASE e DRAEGER (1992) estudaram a influência de diferentes tipos de células no equilíbrio de ligação usando proteínas modelos adsorvidas em partículas de agarose convencional. Estes pesquisadores verificaram que a presença de células (3% peso seco) de *Saccharomyces cerevisiae* reduziu a capacidade de ligação no equilíbrio da BSA (soro albumina bovina) para a resina Q-sepharose Fast Flow em 49%. A capacidade de uma resina de troca de cátions a S-sepharose Fast Flow teve uma redução de apenas 8%. A possível interação das cargas negativas presentes na superfície das células com os sítios ativos do adsorvente resultou, segundo esses pesquisadores, em uma maior redução na resina de troca aniônica comparada com a catiônica. CHASE e DRAEGER (1992) também mostraram que a capacidade máxima de adsorção da imunoglobulina humana G (hIgG) para a resina Protein A sepharose Fast Flow, um adsorvente de afinidade, foi reduzida em 17% quando na presença também de células de *Saccharomyces cerevisiae* nas mesmas condições que utilizadas no trabalho anterior. Usando adsorventes Streamline® DEAE, em leite expandido, CHANG e CHASE (1996 (a)) não encontraram diferenças significativas na adsorção de glucose-6-fosfato desidrogenase usando o caldo clarificado e não clarificado. Com uma aplicação de 25% em peso do homogenado, esses autores encontraram uma capacidade máxima de ligação enzima-adsorvente de 17 U/ml e 15 U/ml, para o caldo clarificado e não clarificado, respectivamente, para um Re_p igual a 0,04.

De maneira similar aos processos cromatográficos em leite fixo, fatores como, concentração de proteína, condutividade e pH do caldo, além da presença de células podem interferir na capacidade de ligação proteína-adsorvente quando se utiliza a técnica de adsorção em leite expandido.

1.2.6 – Dispersão da fase líquida

A importância do estudo da dispersão da fase líquida na adsorção em leito expandido deve-se ao fato da distribuição do tempo de residência (DTR) influenciar o processo de adsorção. A medida da mistura axial da fase líquida é realizada através da análise da distribuição do tempo de residência (DTR), conforme procedimento mostrado anteriormente, para o modo frontal. Devido à mobilidade das partículas, os leitos fluidizados possuem uma tendência de comportarem-se como sistemas misturados. É possível também torná-los similares aos leitos empacotados (fixos), controlando a dispersão axial da fase líquida, sendo este um dos principais fatores almejados e na qual se baseia a adsorção em leito expandido.

No estudo da distribuição do tempo de residência (DTR) utiliza-se traçadores. Dessa forma, dependendo do tamanho das moléculas do traçador utilizado, estas podem sofrer retardamento ao passar pelos poros do adsorvente. Uma forma de se avaliar esse retardamento é comparando-se o tempo médio obtido a partir da distribuição com o tempo espacial (tempo de residência hidrodinâmico), que é função da vazão volumétrica, da porosidade do leito e do volume da coluna. Os principais traçadores utilizados no estudo da distribuição do tempo de residência são acetona, triptofano, cloreto de sódio (NaCl), traçadores radiativos e azul de dextrana.

O coeficiente de dispersão axial é geralmente obtido a partir do número de Peclet (ou Bodenstein) que relaciona o transporte convectivo do líquido com o difusivo na forma:

$$Pe = \frac{UH}{D_{axl}} \quad (13)$$

U é a velocidade do fluido, H a altura do leito expandido e D_{axl} o coeficiente de dispersão axial da fase líquida.

Uma outra forma de caracterizar a mistura de líquido é a que não considera o efeito da altura do leito expandido (H) na dispersão da fase líquida. Nesse caso define-se o Peclet da partícula, na forma:

$$Pe_p = \frac{U \bar{d}_p}{D_{axl}} \quad (14)$$

sendo U e a velocidade intersticial, \bar{d}_p o diâmetro médio da partícula e D_{axl} o coeficiente de dispersão axial.

Existem muitas correlações na literatura de fluidização que relacionam a mistura axial com o número de Peclet da partícula, com uma ampla faixa de vazões. Segundo THÖMMES (1997), a correlação proposta por TAN e FAN (1990) é a que tem apresentado melhores resultados para o caso de adsorção de proteínas. Estes pesquisadores utilizaram partículas de baixa densidade (1040-1300 kg/m³) e com tamanho um pouco maior que as utilizadas em processos cromatográficos, e propuseram à seguinte correlação:

$$Pe_p = 0,23 \left(\frac{\rho_p}{\rho_l} \right)^{-2,637} e^{-2,4467} \quad (15)$$

1.2.7 – Dispersão da fase sólida

O conhecimento da dispersão da fase sólida é muito importante na avaliação da adsorção ligante-proteína. THÖMMES (1997) menciona a falta de dados descrevendo a mistura de sólidos para partículas disponíveis para a adsorção de proteínas. Então, a avaliação é sempre realizada em função das correlações existentes para a fluidização convencional. Na fluidização convencional, o leito é caracterizado por apresentar uma mistura uniforme, comportando-se de forma similar à adsorção em tanques de mistura. Tal comportamento diminui o processo de adsorção ligante-proteína. Como mencionado anteriormente, o modo ideal de operação do leito, para a adsorção em leito expandido, deve ser o tipo que se aproxima do tipo empistonado.

CARLOS e RICHARDSON (1968) mostraram que o movimento de partículas em um leito fluidizado é aleatório e pode ser descrito por um modelo difusivo. Porém, sabe-se que existe uma significativa contribuição convectiva na mistura dos sólidos. Nesse caso, estes pesquisadores mostraram que as partículas ascendem pelo centro do leito e descem próximo às paredes. É atualmente aceito que, o coeficiente de dispersão do sólido é função da porosidade (AL DIBOUNI e GARSIDE, 1979).

VAN DER MEER *et al.* (1984) propuseram uma correlação para a dispersão do sólido, usando duas frações de diferentes tamanhos em um leito fluidizado segregado, contendo resinas de troca iônica similares às usadas para purificação de proteínas, na forma:

$$D_{exp} = 0,04 U^{1,8} \quad (16)$$

A Equação 16 é aplicada nas condições: $0,5 < \varepsilon < 0,9$ e $0,002 < U < 0,02$ m/s, e D_{exp} sendo expresso em m^2/s .

Estes pesquisadores também propuseram uma outra correlação, baseada no ajuste de dados existentes na literatura, ampliando a faixa de velocidade, na forma:

$$D_{exp} = 0,25 U^{2,2} \quad (17)$$

A Equação 17 é aplicada nas condições: $0,5 < \varepsilon < 0,9$ e $0,002 < U < 0,30$ m/s, e D_{exp} sendo expresso em m^2/s .

THÖMMES (1997) obteve uma diferença menor que 10% entre o coeficiente de dispersão da fase líquida ($9,0 \times 10^{-6} m^2/s$) e o coeficiente de dispersão da fase sólida ($1,1 \times 10^{-7} m^2/s$), sugerindo que somente uma pequena mistura de sólido influi no desempenho da adsorção de proteína.

- Transporte de massa no fluido

Antes de se difundir para a superfície interna dos poros, a proteína deve ser transferida da solução para a superfície do adsorvente. Dessa forma, é comum expressar o coeficiente de transporte de massa (k_f) em termos do número de Reynolds e do número de Schmidt, que se baseia na existência de um filme, ou seja, de uma película formada na superfície externa da partícula. Para os processos com leitos fluidizados é importante considerar o efeito da expansão do leito, que por sua vez é função da velocidade. THÖMMES (1997) apresenta uma correlação para o cálculo do coeficiente de transferência de massa na fase líquida, que considera o efeito da expansão do leito, na forma:

$$k_f = \frac{D}{\bar{d}_p} \left[2 + (1,5 ((1 - \varepsilon) Re_p)^{1/2} Sc^{1/3}) \right] \quad (18)$$

O valor de k_f pode variar com os parâmetros de operação e de processos, cita-se como exemplo, a vazão, a viscosidade da alimentação e o tamanho das partículas. Finalizando, THÖMMES (1997) enfatiza que na adsorção de proteínas usando leito expandido a influência da expansão do leito com a velocidade linear não deve ser desprezada, assim como o transporte de massa da fase fluida deve ser considerado sob certas condições, como parâmetro do sistema governando a adsorção.

- Transporte de massa na partícula

Na adsorção de proteínas os adsorventes são porosos com sítios ativos na sua superfície interna. Então, uma proteína de grande tamanho pode ser impedida de penetrar através dos referidos poros. Sabe-se que a adsorção de proteínas em colunas cromatográficas é um processo cuja taxa de difusão para os poros dos adsorventes é fator limitante (SKIDMORE *et al.*, 1990). HJORTH *et al.* (1995) determinaram a capacidade dinâmica da lizosima e de soro albumina bovina para a resina Streamline® SP, usando leito expandido. Estes pesquisadores observaram uma redução da capacidade de adsorção com o aumento da velocidade. Sendo o efeito da BSA maior que o da lizosima, devido ao seu maior tamanho. Então, os

parâmetros que influem na cromatografia usando leito fixo também influem na adsorção usando o leito expandido, entre estes se destacam a difusividade efetiva e o tamanho da partícula.

1.2.8 – Aplicações

Adsorção em leito expandido pode ser usada para processar praticamente todos os tipos materiais como, por exemplo, proteína recombinante de homogenados de bactéria (FREJ *et al.*, 1994; HANSSON *et al.*, 1994), corpos de inclusão (FREJ *et al.*, 1997), purificação de anticorpos monoclonais (THÖMMES *et al.*, 1995 (b); THÖMMES *et al.*, 1996; BORN *et al.*, 1996), caldos de fermentação não clarificados de bactérias e leveduras (CHANG e CHASE, 1996 (b); McCREATH *et al.*, 1995), na extração de proteínas do leite (NOPPE *et al.*, 1996) e extrato de tecido animal (GARG *et al.*, 1996).

1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-AZIZ, S. M., Production and some properties of two chitosanases from *Bacillus alvei*. *Journal of Basic Microbiology*, vol. 39, nº 2, p. 79-87, 1999.
- AK, O., BAKIR, U., GURAY, T., Production, purification and characterization of chitosanase from *Penicillium spinulosum*. *Biochemical Archive*, vol. 14, p. 221-225, 1998.
- AL-DIBOUNI, M. R., GARSIDE, J., Particle mixing and classification in liquid fluidised beds. *Trans. Inst. Chem. Engineering*, vol. 57, p. 94-103, 1979.
- ALFONSO, C., MARTINEZ, M. J., REYES, F., Purification and properties of two endo-chitosanases from *Mucor rouxii* implicated in its cell wall degradation FEMS. *Microbiology Letters*, vol. 95, p. 187-194, 1992.
- ALONSO, J., BARREDO, J. L., ARMISÉN, P., DÍEZ, B., SALTO, F., GUISÁN, J. M., GARCÍA, J. L., CORTÉS, E., Engineering the D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis* to facilitate its overproduction in *Escherichia coli* and its downstream processing by tailor-made metal chelate supports. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 25, p. 88-95, 1999.
- AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, *EBA HANDBOOK: Principles and Methods*. Uppsala, ISBN 91-630-5519-8, 160p., 1997.
- ANSPACH, F. B., CURBELO, D., HARTMANN, R., GARKE, G., DECKWER, W-D., Expanded-bed chromatography in primary protein purification. *Journal of Chromatography A*, vol. 865, p. 129-144, 1999.
- BAILEY, S. M., MEAGHER, M. M., Separation of soluble protein from inclusion bodies in *Escherichia coli* lysate using crossflow microfiltration. *Journal of Membrane Science*, vol. 166, p. 137-146, 2000.
- BARNTHOUSE, K. A., TROMPETER, W., JONES, R., INAMPUDI, P., RANDALL, R., CRAMER, S. M., Cation-exchange displacement

-
- chromatography for the purification of recombinant protein therapeutics from variants. *Journal of Biotechnology*, vol. 66, p. 125-136, 1998.
- BATT, B. C., YABANNAVAR, V. M., SINGH, V., Expanded Bed Process for Protein Recovery from Whole Mammalian Cell Culture Broth. *Bioseparation*, vol. 5, p. 41-52, 1995.
- BORN, C., THÖMMES, J., BISELLI, M., WANDREY, C., KULA, M-R., An approach to integrate antibody production: Coupling of fluidized bed cultivation and fluidized bed adsorption. *Bioprocess Engineering*, vol. 15, p. 21-29, 1996.
- BRAAS, G. M. F., WALKER, S. G., LYDDIATT, A., Recovery in aqueous two-phase systems of nanoparticulates applied as surrogate mimics for viral gene therapy vectors. *Journal of Chromatography B*, vol. 743, p. 409-419, 2000.
- BRANOVIC, K., BUCHACER, A., BARUT, M., STRANCAR, A., JOSIC, D., Application of monoliths for downstream processing of clotting factor IX. *Journal of Chromatography A*, vol. 903, p. 21-32, 2000.
- BUIJS, A., WESSELINGH, J.A., Batch fluidized ion-exchange column for streams containing suspended particles. *Journal of Chromatography A*, vol. 210, p. 319-327, 1980.
- CARLOS, C. R., RICHARDSON, J. F., Solids movement in fluidised beds – I Particle velocity distribution. *Chemical Engineering Science*, vol. 23, p. 813-824, 1968.
- CHANG, Y. K., CHASE, H. A., Development of Operating Conditions for Protein Using Expanded Bed Techniques: The Effect of the Degree of Bed Expansion on Adsorption Performance. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 49, p. 512-526, 1996 (a).
- CHANG, Y. K.; CHASE, H. A., Ion Exchange Purification of G6PDH From Unclarified Yeast Cell Homogenates Using Expanded Bed Adsorption. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 49, p. 204-216, 1996 (b).

-
- CHANG, Y. K., McCREATH, G. E., DRAEGER, N. M., CHASE, H. A., Novel Technologies for Direct Extraction of Proteins. *Trans. Inst. Chem. Engs.*, vol. 71 B, p. 299-303, 1993.
- CHASE, H. A., Purification of proteins by adsorption chromatography in expanded beds. *TIBTECH*, vol. 12, p. 296-303, 1994.
- CHASE, H. A., DRAEGER, N. M., Affinity purification of proteins using expanded beds. *Journal of Chromatography A*, vol. 597, p. 129-145, 1992.
- CHAUDHURI, J. B., Separations in biotechnology. *Trends in Biotechnology*, vol. 13, p. 12-14, 1995.
- CHETTY, A. S., BURNS, M. A., Continuous Protein Separations in a Magnetically Stabilized Fluidized Bed Using Nonmagnetic Supports. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 38, p. 963-971, 1991.
- CHONG, S., MERSHA, F. B., COMB, D. G., SCOTT, M. E., LANDRY, D., VENCE, L. M., PERLER, F. B., BENNER, J., KUCERA, R. B., HIRVONEN, C. A., PELLETIER, J. J., PAULUS, H., XU, M-Q., Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element. *Gene*, vol. 192, p. 271-281, 1997.
- CONDER, J. R., HAYEK, B. O., Adsorption and desorption kinetics of bovine serum albumin in ion exchange and hydrophobic interaction chromatography on silica matrices. *Biochemical Engineering Journal*, vol. 6, p. 225-232, 2000.
- CRUZ, P. E., PEIXOTO, C. C., DEVOS, K., MOREIRA, J. L., SAMAN, E., CARRONDO, M. J. T., Characterization and downstream processing of HIV-1 core and virus-like-particles produced in serum free medium. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 26, p. 61-70, 2000.
- DASARI, G., PRINCE, I., HEARN, M. T. W., High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins, CXXIV. Physical

- characterisation of fluidized-bed behaviour of chromatographic packing materials. *Journal of Chromatography A*, vol. 631, p. 115-124, 1993.
- DE LUCA, L., HELLENBROICH, D., TITCHENER-HOOKER, N. J., CHASE, H. A., A study of the expansion characteristics and transient behaviour of expanded beds of adsorbent particles suitable for bioseparations. *Bioseparation*, vol. 4, p. 311-318, 1994.
- DI FELICE, R., Hydrodynamics of Liquid Fluidisation. *Chemical Engineering Science*, vol. 50, nº 8, p. 1213-1245, 1995.
- DYR, J. E., SUTTNAR, J., Separation used for purification of recombinant proteins. *Journal of Chromatography B*, vol. 699, p. 383-401, 1997.
- FERREIRA, G. N. M., MONTEIRO, G. A., PRAZERES, D. M. F., CABRAL, J. M. S., Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications. *Trends in Biotechnology*, vol. 18, p. 380-388, 2000.
- FEUSER, J., HALFAR, M., LUTKEMEYER, D., AMESKAMP, N., KULA, M-R., THÖMMES, J., Interaction of mammalian cell culture broth with adsorbents in expanded bed adsorption of monoclonal antibodies. *Process Biochemistry*, vol. 34, p. 159-165, 1999.
- FREJ, A-K. B., HJORTH, R., HAMMARSTRÖM, Å., Pilot Scale Recovery of Recombinant Annexin V from Unclarified *Escherichia coli* Homogenate Using Expanded Bed Adsorption. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 44, p. 922-929, 1994.
- FREJ, A-K. B., Expanded Bed Adsorption for Recovery of Renatured Human Interleukin 8 from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Bioseparation*, vol. 6, 265-271, 1996.
- FREJ, A-K. B., JOHANSSON, H. J., JOHANSSON, S., LEIJON, P., Expanded bed adsorption at production scale: scale-up verification, process example and sanitization of column and adsorbent. *Bioprocess Engineering*, vol. 16, p. 57-63, 1997.

- GARG, N., YU, I., MATTIASSON, G., MATTIASSON, B., Polymer-Shielded Dye-Ligand Chromatography of Lactate Dehydrogenase from Porcine Muscle in an Expanded Bed System. *Bioseparation*, vol. 6, p. 193-199, 1996.
- GELDART, D., The Design of Distributors for Gas-Fluidized Beds. *Powder Technology*, vol. 42, p. 67-78, 1985.
- GIBILARO, L. G., WALDRAM, S. P., FOSCOLO, P. U., A simple mechanistic description of the unsteady state expansion of liquid fluidised beds. *Chemical Engineering Science*, vol. 39, n° 3, p. 607-610, 1984.
- HANSSON, M., STAHL, S., HJORTH, R., UHLÉN, M., MOKS, T., Single-Step Recovery of a Secreted Recombinant Protein by Expanded Bed Adsorption. *Bio/Technology*, vol. 12, p. 285-288, 1994.
- HJORTH, R., KÄMPE, S., CARLSSON, M., Analysis of some operating parameters of novel adsorbents for recovery of proteins in expanded beds. *Bioseparation*, vol. 5, p. 217-223, 1995.
- HYEAN-WOO, L., CHOI, J-W., HAN, D-P., PARK, M-J., LEE, N-W., YI, D-H., Purification and characteristics of chitosanase from *Bacillus sp. HW-002*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 6, n° 1, p. 19-25, 1996.
- JONASSON, P., NYGREN, P-A., JORVNALL, H., JOHANSSON, B-L., WAHREN, J., UHLÉN, M., STAHL, S., Integrated bioprocess for production of human proinsulin C-peptide via heat release of an intracellular heptameric fusion protein. *Journal of Biotechnology*, vol. 76, p. 215-226, 2000.
- KARAU, A., BENKEN, C., THÖMMES, J., KULA, M-R., The Influence of Particle Size Distribution and Operating Conditions on the Adsorption Performance in Fluidized. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 55, p. 54-64, 1997.
- KAUFMANN, M., Unstable proteins: how to subject them to chromatographic separations for purification procedures. *Journal of Chromatography B*, vol. 699, p. 347-369, 1997.

-
- KUNIL, D., LEVENSPIEL, O., *Fluidization Engineering*, 2 ed. Stoneham, Butterworth-Heinemann, 1991. 491p.
- LEVENSPIEL, O., *Chemical Reaction Engineering*, New York, Wiley, 1972.
- LEVISON, P. R., MUMFORD, C., STREATER, M., BRAND-NIELSEN, A., PATHIRANA, N. D., BADGER, S. E., Performance comparasion of low-pressure ion-exchange chromatography media for protein separation. *Journal of Chromatography A*, vol. 760, p. 151-158, 1997.
- LEVISON, P. R., BADGER, S. E., HATHI, P., DAVIES, M. J., BRUCE, I. J., GRIMM, V., New approches to the isolation of DNA by ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, vol. 827, p. 337-344, 1998.
- LEVISON, P. R., HOPKINS, A. K., HATHI, P., BADGER, S. E., MANN, F., DICKSON, N., PURDOM, G., Suspended bed chromatography, a new approach in downstream processing. *Journal of Chromatography A*, vol. 890, p. 45-51, 2000.
- LEVY, M. S., O'KENNEDY, R. D., AYAZI-SHAMLOU, P., DUNNILL, P., Biochemical engineering approaches to the challenges of producing pure plasmid DNA. *Trends in Biotechnology*, vol. 18, p. 296-304, 2000.
- LUELLAU, E., STOCKAR, U., VOGT, S., FREITAG, R., Development of a downstream processing for the isolation and separation of monoclonal immunoglobulin A monomers, dimers and polymers from cell culture supernatant. *Journal of Chromatography A*, vol. 796, p. 165-175, 1998.
- McCREATH, G. E., CHASE, H. A., OWEN, R. O., LOWE, C. R., Expanded Bed Affinity Chromatography of Dehydrogenases from Baker's Yeast Using Dye-Ligand Perfluoropolymer Supports. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 48, p. 341-354, 1995.
- NOPPE, W., HANSSENS, I., DE CUYPER, M., Simple two-step procedure for the preparation of highly active pure equine milk lysozyme. *Journal of Chromatography A*, vol. 719, p. 327-331, 1996.

- O'BRIEN, S. M., THOMAS, O. R. T., DUNNILL, P., Non-porous magnetic chelator supports for protein recovery by immobilised metal affinity adsorption. *Journal of Biotechnology*, vol. 50, p. 13-25, 1996.
- OKAJIMA, S., ANDO, A., SHINOYAMA, H., FUJII, T., Purification and characterization of an extracellular chitosanase produced by *Amycolatopsis sp. CsO-2*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, vol. 77, n° 6, p. 617-620, 1994.
- PAI, A., GONDKAR, S., LALI, A., Enhanced performance of expanded bed chromatography on rigid superporous adsorbents matrix. *Journal of Chromatography A*, vol. 867, p. 113-130, 2000.
- PALSSON, E., GUSTAVSSON, P-E., LARSSON, P-O., Pellicular expanded bed matrix suitable for high flow rates. *Journal of Chromatography A*, vol. 878, p. 17-25, 2000.
- PELLETIER, A., SYGUSCH, J., Purification and characterization of three chitosanase activities from *Bacillus megaterium P1*. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 56, n° 4, p. 844-848, 1990.
- PEREIRA, J. M., VIEIRA E ROSA, P. T., PASTORE, G. M., SANTANA, C. C., Expanded-Bed Adsorption Utilizing Ion-Exchange Resin to Purify Extracellular β -Galactosidase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 70-72, p. 779-787, 1998.
- PRAZERES, D. M. F., SCHLUEP, T., COONEY, C., Preparative purification of supercoiled plasmid DNA using anion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, vol. 806, p. 31-45, 1998.
- PRICE, J. S., STORCK, R., Production, purification, and characterization of an extracellular chitosanase from *Streptomyces*. *Journal of Bacteriology*, vol. 124, n° 3, p. 1574-1585, 1975.
- RAYMOND, F., ROLLAND, D., GAUTHIER, M., JOLIVET, M., Purification of a recombinant protein expressed in yeast: optimization of analytical and

preparative chromatography. *Journal of Chromatography B*, vol. 706, p. 113-121, 1998.

RICHARDSON, J. F., ZAKI, W. N., Sedimentation and Fluidisation: Part I. *Trans. Inst. Chem. Engs.*, vol. 32, p. 35-53, 1954.

ROUF, S. A., MOO-YOUNG, M., SCHARER, J. M., DOUGLAS, P. L., Single versus multiple bioreactor scale-up: economy for high-value products. *Biochemical Engineering Journal*, vol. 6, p. 25-31, 2000.

ROWE, P. N., A convenient empirical equation for estimation of the Richardson-Zaki exponent. *Chemical Engineering Science*, vol. 42, n° 11, p. 2795-2796, 1987.

SADANA, A., BEELARAM, A. M., Efficiency and economics of bioseparation: Some case studies. *Bioseparation*, vol. 4, p. 221-235, 1994.

SANTOS, E. S., GUIRARDELLO, R., FRANCO T. T., Distributor Effect on Expanded Bed Adsorption. In: *Ion Exchange at the Millenium (proceedings of IEX 2000)*, ed. by J. A. Greig, SCI press, London, 408p., 2000.

SCHUGERL, K., Integrated process of biotechnology products. *Biotechnology Advances*, vol. 18, p. 581-599, 2000.

SCOPES, R.K., *Protein purification, Principles and Practice*, 2^a ed., New York, Springer-Verlag, 1988.

SHIMOSAKA, M., NOGAWA, M., OHNO, Y., OKAZAKI, M., Chitosanase from the plant pathogenic fungus, *Fusarium solani f. sp. Phaseoli* – purification and some properties. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, vol. 57, n° 2, p. 231-235, 1993.

SHIMOSAKA, M., NOGAWA, M., WANG, X-Y., KUMEHARA, M., OKAZAKI, M., Production of two chitosanases from a chitosan-assimilating bacterium, *Acinetobacter sp. Strain CHB101*. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 61, n° 2, p. 438-442, 1995.

SKIDMORE, G. L., HORSTMAN, B. J., CHASE, H. A., Modelling Single-Component Protein Adsorption to the Cation Exchanger S Sepharose® FF. *Journal of Chromatography A*, vol. 498, p. 113-128, 1990.

SOUSA, K. A., *Extração e Purificação de Peroxidase de Soja (Glycine max) por adsorção de afinidade de metal imobilizado*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2001. 89 p. Dissertação (Mestrado)

SPALDING; B. J., Downstream processing: key to slashing production costs 100 fold. *Bio/Technology*, vol. 9, p. 229-233, 1991.

STEFFENS, M. A., FRAGA, E. S., BOGLE, I. D. L., Synthesis of purification tags for optimal downstream processing. *Computers and Chemical Engineering*, vol. 24, p. 717-720, 2000.

TANG, W., FAN, L., Axial liquid mixing in liquid-solid and gas-liquid-solid fluidized beds containing low density particles. *Chemical Engineering Science*, vol. 45, nº 2, p. 543-551, 1990.

TERRANOVA, B. E., BURNS, M. A., Continuous Cell Suspension Processing Using Magnetically Stabilized Fluidized. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 37, p. 110-120, 1991.

THOMAS, C. R., YATES, J. G., Expansion Index for Biological Fluidised Beds. *Trans. Inst. Chem. Engs.*, vol. 63, p. 67-69, 1985.

THÖMMES, J., WEIHER, M., KARAU, A., KULA, M-R., Hydrodynamics and Performance in Fluidized Bed Adsorption. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 48, p. 367-374, 1995 (a).

THÖMMES, J., HALFAR, M., LENZ, S., KULA, M-R., Purification of Monoclonal Antibodies from Whole Hybridoma Fermentation Broth by Fluidized Bed Adsorption. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 45, p. 205-211, 1995 (b).

- THÖMMES, J., BADER, A., HALFAR, M., KARAU, A., KULA, M-R.,
Isolation of monoclonal antibodies from cell containing hybridoma broth
using a protein A coated adsorbent in expanded bed. *Journal of
Chromatography A*, vol. 752, p. 111-122, 1996.
- THÖMMES, J., Fluidized Bed Adsorption as a Primary Recovery Step in Protein
Purification. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 58, p.
185-230, 1997.
- VAN DER MEER, A. P., BLANCHARD, C. M. R. J. P., WESSELINGH, J. A.,
Mixing of particles in liquid fluidised. *Chem. Eng. Res. Des.*, vol. 62, p. 214-
222, 1984.
- VAN DER WIELEN, L. A. M., Pitfalls and challenges in bioseparation processes.
In: *Advanced Course on Downstream Processing*, Delft, 1999.
- VAN DER WIELEN, L. A. M., Cost reduction: Scope for novel and integrated
bioprocess technology. In: *10th European Congress on Biotechnology (10
ECB)*, Madri, 2001.
- VOLPICELLI, G., MASSIMILLA, L., ZENZ, F. A., Nonhomogeneities in solid-
liquid fluidization. *Chem. Eng. Prog. Symp. Ser.*, vol. 62, p. 42-50, 1966.
- WALLIS, G. B., A simple correlation for fluidisation and sedimentation. *Trans.
Inst. Chem. Engs.*, vol. 55, p. 74-75, 1977.
- WEN, C. Y., YU, Y. H., Mechanics of fluidization. *Chem. Eng. Prog. Symp. Ser.*,
vol. 62, p. 100-111, 1966.
- YAMASAKI, Y. I., HAYASHI, Y., OHTA, T., NAKAWAGA, M.,
KAWAMUKAI, M., MATSUDA, H., Purification and mode of action of
chitosanolytic enzyme from *Enterobacter sp. G-1*. *Bioscience Biotechnology
and Biochemistry*, vol. 57, p. 444-449, 1993.
- YASUKAWA, H., KAKIKAWA, M., MASAMUNE, Y., TAKETO, A.,
KODAIRA, K-I., Purification and DNA-binding properties of the integrase

protein Int encoded by *Lactobacillus plantarum* phage. *Gene*, vol. 204, p. 219-225, 1997.

YOSHIHARA, K., HOSOKAWA, J., KUBO, T., NISHIYAMA, M., KOBA, Y.,
Purification and properties of a chitosanase from *Pseudomonas sp. H-14*.
Bioscience Biotechnology and Biochemistry, vol. 56, nº 6, p. 972-973, 1992.

**Capítulo 2 - DISTRIBUTOR EFFECT ON EXPANDED BED
ADSORPTION**

DISTRIBUTOR EFFECT ON EXPANDED BED ADSORPTION

E. S. SANTOS, R. GUIRARDELLO, T. T. FRANCO

*School of Chemical Engineering, State University of Campinas,
Albert Einstein 500, Campinas, São Paulo, Brazil*

Artigo apresentado no congresso IEX 2000 em Cambridge (Inglaterra) e publicado no livro IEX 2000.

1. INTRODUCTION

Expanded bed adsorption is a new key tool used in biotechnology processes. It is based on fluidisation; mainly exploring the classification (segregation) property of the fluidised bed. The main advantage in using the expanded bed adsorption rather than conventional chromatography methods is the possibility of submitting feedstock containing particulate to the column. Conventional packed bed chromatography usually requires a step of centrifugation or filtration to eliminate the particulate material. As cells suspension can enter directly in the expanded bed, the yield can be raised and process time is reduced.

Although columns and resins for expanded bed adsorption have been marketed for some time, there are still some aspects of expanded bed adsorption which require investigation; particle attrition, distributor design, as well as mass transfer effect.

This work has studied the distributor effect on expanded bed adsorption. The adsorption of lysozyme to Streamline SPTM using two different distributors is shown.

2. EXPANDED BED ADSORPTION

Expanded bed adsorption is based on the fluidisation unit operation. Once the bed is packed, the increase in the flow-rate of the fluid, when there is no restraint to the expansion of the particles, generates a situation in which the pressure drop in a given cross area is equal to the friction force. That is, particle-fluid interaction forces must balance the particle weight. Once this situation is reached, a further increase in fluid velocity (flow-rate) leads to a bed expansion. This velocity is called the minimum fluidisation velocity (U_{mf}) and once fluidisation happens, an increase in the bed voidage is observed. When the bed operates in a situation in

which a low Reynolds number is obtained, that is, in laminar regime, the Stokes' equation, shown as Equation 1, estimates the isolated particle settling velocity.

$$U_T = \frac{d_p^2 (\rho_S - \rho_L) g}{18 \mu} \quad (1)$$

According to Thömmes (1997), the particles in a fluidised bed can not be treated independently, but in fact they interact with each other due to adhesion forces. Thus, further considerations of the fluidisation of adsorbents particles are always required. According to Chang and Chase (1996) and Karau et al. (1996), the Richardson and Zaki (1954) correlation, shown in the Equation 2, is used to represent the bed expansion behaviour. The main information from this equation is the reduction in the isolated particle settling velocity due the other particles.

$$U_L = U_{TE} \varepsilon^n \quad (2)$$

The bed expansion is usually represented by two parameters (U_{TE}) and (n), obtained from Equation 2. The knowledge of bed voidage as a function of fluid superficial velocity allows the calculation of both parameters by linear regression in a log-log graph. The bed voidage was calculated using the Equation 3 and is given by:

$$\varepsilon = 1 - \frac{m_P}{A_{COL} H_{exp} \rho_P} \quad (3)$$

2.1 Classification (Segregation)

The adsorption of protein in an expanded bed is carried out by adsorbents showing a size/density distribution. The advantage of using a bed with particles containing different size and/or density is that it generates the classification (segregation) phenomenon. That is, the smaller/lighter particles tend to remain in the top region, while the larger/heavier ones tend to stay at the bottom of the bed,

in the region of the distributor. This fact reduces the particles mobility into the bed thereby improving the adsorption performance.

Wen and Yu (1966) have reported as a condition for the existence of classification (segregation) phenomenon that the ratio between larger and smaller particles (d_B/d_S) in the bed must be above 1.3. However, Al-Dibouni and Garside (1979) have suggested an approach in which d_B/d_S must be larger than 2.2 for that classification to exist.

2.2 Distributor

Geldart (1985) has reported that the most important distributor function is working as a support to the static bed and preventing solids back-flow. Most studies on expanded bed adsorption have used manufactured distributors. However, De Luca et al. (1994) have shown that there is an influence of the distributor in the expansion characteristics for the adsorbent used to expanded bed adsorption. They have concluded that the Richardson and Zaki correlation described well the bed expansion, though the fluidisation parameters values were function of the distributor design.

3. MATERIAL AND METHODS

3.1 Model protein

Lysozyme (EC 3.2.1.17) from chicken egg white was used as a model protein. The enzyme was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), catalog number L-6876. It has a relative molecular mass of 14,500 Daltons and an isoelectric point at pH 11, as cited by Skidmore et al.(1990).

3.2 Chromatography adsorbent

StreamlineTM SP strong cation exchange adsorbent was purchased from Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden. The adsorbents particles are composed of a crystalline quartz core covered by 6% cross-linked agarose. The

particles are spherical with a particle density (ρ_p) of 1.18 kg/m^3 and a particle size distribution from 1.0×10^{-4} to 3.0×10^{-4} m. Its size distribution behaviour was assessed by laser using a Malvern Mastersizer/E equipment, shown in the Results and Discussion Section.

3.3 Experimental setup

A house-column was especially designed for this work. The column is made from acrylic, 0.25m tall, with an inner diameter of 0.025m ($A_{\text{COL}} = 4.9 \times 10^{-4} \text{ m}^2$). It had a piston allowing change to different positions depending on the bed expansion. The distributor was put at the bottom of the column. A net of mesh equivalent to 6.0×10^{-5} m was put below the perforated plate distributor and in the inner part of the piston. This avoided the loss of adsorbent by elutriation or by back-flow. For the porous distributor, the net was not necessary. The column was coupled to a GradifacTM system that allows the monitoring of both flow-rate and optical density of the protein solution at the exit of the column. The characteristics of the two distributors used are shown in the Table 1 below.

Table 1 Distributor characteristics

Type	Raw Material	N_{or}	d_{or} (m)	ϕ (%)
Porous	glass	---	---	---
Perforated plate	steel	5.0	0.001	0.8

3.3.1 Expansion study: Initially, a bed volume (V_L) of $36.8 \times 10^{-5} \text{ m}^3$ was poured into the column. This volume produced a packed bed height (H) of 0.075 m. At this stage, the adsorbent weight put in the column was known. This allowed the calculation of the bed voidage for each height. During the equilibration, the column was irrigated at the bottom in order to expand the bed with Tris/HCl (50 mM, pH 7.5) at room temperature (25°C). At the beginning, the liquid flow-rate (Q) was gradually increased until 1.5 times the flow-rate was achieved. Then it

was reduced to the experiment flow-rate. Once the bed height was not changed, it was recorded. The liquid flow-rate (Q) ranged from 6.8×10^{-8} to 6.1×10^{-7} m³/s, giving a liquid superficial velocity ranging from 1.4×10^{-4} to 1.2×10^{-3} m/s. The expansion parameters (U_{TE} and n) were obtained for each distributor, using the Richardson and Zaki correlation, from a liquid superficial velocity against bed voidage graph (given by Equation 2) by linear regression in a log-log scale.

3.3.2 Breakthrough curve The same volume of adsorbent, as shown in Section 4.3, was assessed for adsorption performance. Initially, the bed was equilibrated with buffer until five bed volumes had been irrigated through it. Once the bed height was not disturbed the adsorption stage, using frontal mode, was carried out in the expanded mode. In this stage, the optical density of lysozyme solution ($C_o = 1.0$ kg/m³) at the column exit was monitored at 280nm. In the washing step, the protein solution entering into the bed was changed by the initial buffer until the baseline had returned to the initial position. In the elution stage, 1.0 M NaCl was irrigated in packed bed mode with reverse flux. After each run a *clean-in-place* procedure was carried out as described by Chang and Chase (1996).

For each flow-rate, the breakthrough curve was obtained and the operating capacity (Q_{OP}) was estimated using a given distributor. The liquid flow-rate (Q) used in the breakthrough curve ranged from 2.0×10^{-7} to 4.1×10^{-7} m³/s. The results are shown as the operating capacity (Q_{OP}) against the volume of lysozyme solution applied.

4. RESULTS AND DISCUSSION

4.1 Adsorbent size distribution

Figure 1 shows the accumulated and retained size distribution for the adsorbent used.

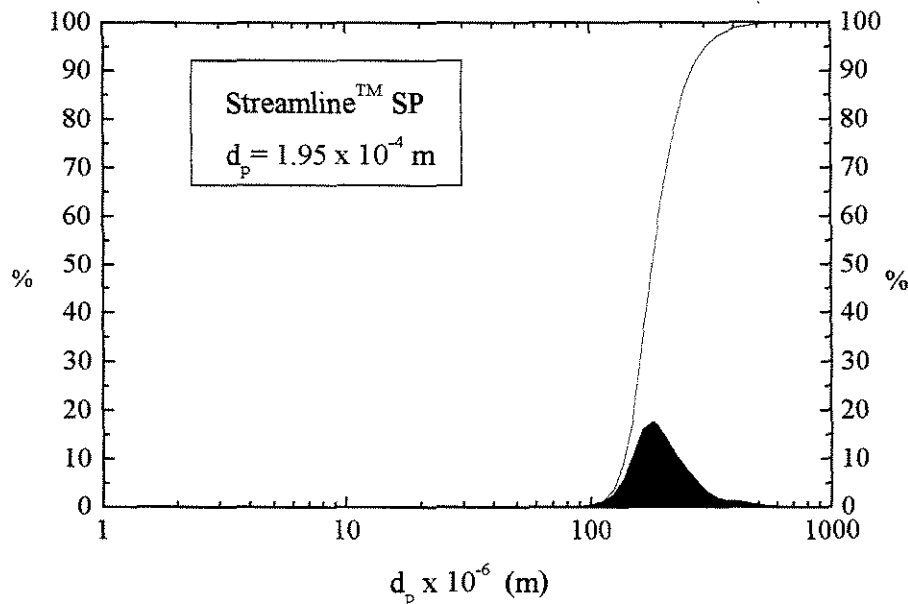


Figure 1 - StreamlineTM SP adsorbent size distribution

It can be seen in Figure 1 that the adsorbent presents a log-normal distribution with average diameter of 1.95×10^{-4} m. From the adsorbent size distribution, it can be seen that both conditions of Wen and Yu (1966) and Al-Dibouni and Garside (1979) for (d_B/d_S) ratio are satisfied. Hence, the presence of this adsorbent in the bed leads to the classification (segregation) phenomenon.

4.2 Expansion analysis

Figures 2 and 3 show the height expansion and bed voidage as a function of the fluid linear velocity. In terms of expansion data, after data regression using the Richardson and Zaki correlation, there was a good agreement between both distributors as shown in Table 2. In this table, the most important expansion parameters are shown. It can be seen that the settling velocity obtained experimentally (U_{TE}) is close to the settling velocity of an isolated particle (U_T) as calculate by the Stokes equation, shown in the Equation 1. In this case, both

distributors have showed standard deviations smaller than 10%. It is important to emphasise that the results for the Richardson and Zaki parameter (n) are in agreement with those shown by De Luca et al. (1994).

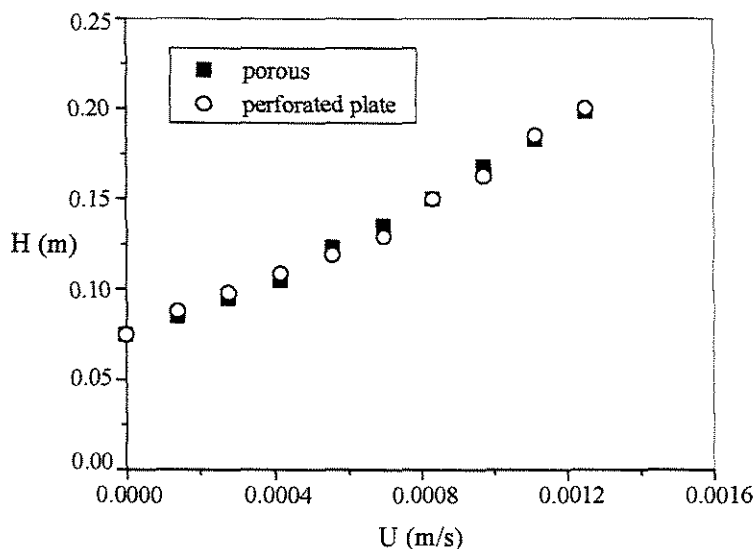


Figure 2 - Bed height expansion

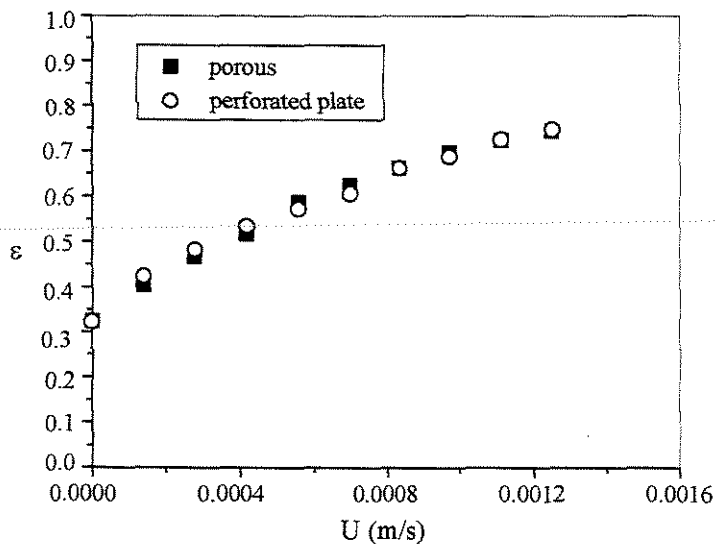


Figure 3 - Bed voidage behaviour

Table 2 Expansion parameters

Type	U_{TE} (m/s)	U_T (Eq.1)(m/s)	Re_p	n
Porous	3.4×10^{-3}	3.8×10^{-3}	0.7	3.4
Perforated plate	3.9×10^{-3}	3.8×10^{-3}	0.8	3.7

4.3 Breakthrough analysis

The breakthrough curves using both distributors, for the highest and the lowest liquid superficial flow-rates investigated, are represented in Figure 4.

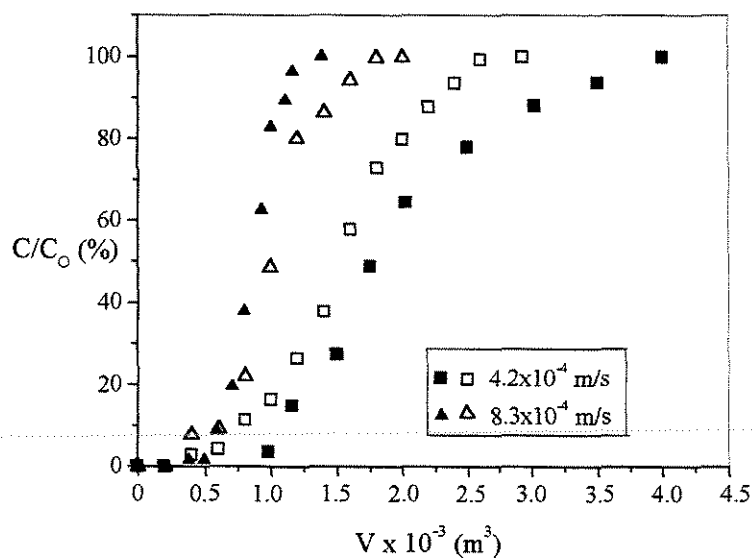


Figure 4 - Breakthrough curves (black symbols used for the perforated distributor)

In this figure the influence of the distributor design on the adsorption performance is easily observed. It can be seen that, for both distributors, a lower liquid superficial velocity made the adsorbents more efficient. Since adsorption

processes using ionic exchanger are limited by diffusion, these results were expected. However, an increase in fluid superficial velocity using the porous distributor does not change the adsorbent operating capacity sensibly, as shown in Table 3 and Figure 4. In general, the perforated plate distributor showed better results than the porous distributor, in terms of the adsorbent operating capacity (Q_{OP}). A possible reason for this fact might be the back-mixing presence in the bed when the porous distributor was used. Though it had shown similar expansion, in general, poorer adsorption performance was obtained.

Table 3 Adsorbent operating capacity (Q_{OP}) (protein mass (kg)/ m³ adsorbent)

U (m/s)	Porous Distributor	Perforated Plate Distributor
4.2×10^{-4}	33.5	52.0
5.5×10^{-4}	27.1	38.2
6.9×10^{-4}	23.0	34.2
8.3×10^{-4}	27.3	23.8

5. CONCLUSIONS

The distributor effect on expanded bed adsorption was investigated. StreamlineTM SP adsorbent has a size distribution wide enough to lead to bed classification (segregation). For both distributors assessed, the bed expansion was well adjusted to the Richardson and Zaki correlation. The expansion parameters were a function of the distributor design.

The breakthrough analysis showed that for the perforated plate distributor, a higher adsorbent operating capacity was obtained than for the porous distributor, suggesting the importance of distributor design on expanded bed adsorption.

Nomenclature

A_{COL}	column cross-sectional area	m^2
C	solution concentration at column exit	kg/m^3
C_o	initial solution concentration	kg/m^3
d_B	larger adsorbent particle diameter	m
d_S	smaller adsorbent particle diameter	m
d_P	adsorbent particle diameter	m
d_{or}	orifice diameter	m
F	open area ratio	
g	gravitational constant	m/s^2
H	bed height	m
H_{exp}	expanded bed height	m
m_p	adsorbent mass	kg
n	Richardson and Zaki parameter	
N_{or}	orifice number	
Q	liquid flow-rate	m^3
Q_{OP}	adsorbent operating capacity beads	kg/m^3 adsorbent
Re_P	particle Reynolds number ($\rho_L d_P U_T / \mu$)	
U_L	linear velocity (L / A_{COL})	m/s
U_{mf}	minimum fluidisation velocity	m/s

U_T	isolated adsorbent bead settling velocity $\left(\frac{d_p^2 (\rho_S - \rho_L) g}{18 \mu} \right)$	m/s
U_{TE}	experimental adsorbent settling velocity	m/s
V_{BED}	resin bed volume including voids	m^3
V	volume of protein solution	m^3
V_L	bed volume	m^3

Greek Symbols

ε	bed voidage	
μ	liquid viscosity	kg/m s
ρ_L	liquid density	kg/m ³
ρ_p	adsorbent density	kg/m ³
ϕ	open area ratio	

Acknowledgements

The authors are grateful to FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) for financial support.

References

Al-Dibouni M. R. and Garside J., *Trans. Inst. Chem. Engs.* **57** (1979), 94-103.

-
- Chang Y. K. and Chase H. A., *Biotechnology and Bioengineering* **49** (1996), 512-526.
- De Luca L., Hellenbroich D., Titchener-Hooker N. J. and Chase H. A., *Bioseparation* **4** (1994), 311-318.
- Geldart D., *Powder Technology* **42** (1985), 67-78.
- Karau A., Benken C., Thömmes J. and Kula M.-R., *Biotechnology and Bioengineering* **55** (1996), 54-64.
- Richardson J. F. and Zaki W. N., *Trans. Inst. Chem. Engs.* **32** (1954), 35-53.
- Skidmore G. L., Horstman B. J. and Chase H. A., *Journal of Chromatography* **498** (1990), 113-128.
- Thömmes J., *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology* **58** (1997), 185-230.
- Wen C. Y. and Yu H., *Chemical Engineering Progress Symposium Series* **62** (1966), 100-111.
-

ERRATA

Página 42: No primeiro parágrafo na quinta linha leia-se **particulates** ao invés de particulate.

Página 42: No primeiro parágrafo na sétima linha leia-se **As a cell** ao invés de As cells.

Página 43: No primeiro parágrafo na quarta linha leia-se **adsorbent** ao invés de adsorbents.

Página 43: No terceiro parágrafo na sexta linha leia-se **particle** ao invés de particles.

Página 44: No segundo parágrafo na sétima linha leia-se **parameter** ao invés de parameters.

Página 44: No quarto parágrafo na segunda linha leia-se **adsorbent** ao invés de adsorbents .

Página 45: No primeiro parágrafo na segunda linha leia-se **of** ao invés de from.

Página 45: Na Tabela 1 o símbolo ϕ é igual a fração de área livre (F) cuja definição está apresentada no capítulo 1.

Página 47: Na abcissa da Figura 1 leia-se **$d_p \times 10^6$ (m)** ao invés $d_p \times 10^{-6}$ (m).

Página 49: Na abcissa da Figura 4 leia-se **$V \times 10^3$ (m³)** ao invés de $V \times 10^{-3}$ (m³).

Página 50: Na sexta linha leia-se **occurrence** ao invés de presence.

**CAPÍTULO 3 – INTEGRATED PROCESS FOR THE
PURIFICATION OF AN INTRACELLULAR ENZYME**

**Título provisório: INTEGRATED PROCESS FOR THE
PURIFICATION OF AN INTRACELLULAR ENZYME**

**JANHANSHAH, M.¹; SUN, Y.²; SANTOS, E. S.³; FRANCO, T.T.³;
LYDDYATT, A.^{1*}**

¹ – **Biochemical Recovery Group; University of Birmingham (UK)**

² – **Tianjin University; China**

³ – **Chemical Engineering School, State University of Campinas; Brazil**

*** To whom correspondence should be addressed**

This work was developed at the Biochemical Recovery Group (BRG) at the
University of Birmingham/UK.

Key-words: expanded bed adsorption; integrated process; G3PDH

ABSTRACT

This paper deals with the use of an integrated system using EBA. A pellicular adsorbent and two commercial adsorbents, Streamline and Macrosorb, were used to adsorb the G3PDH enzyme from baker's yeast. Hence, it was necessary to immobilise the Cibracon Blue 3FG-A dye in the adsorbents. Adsorption kinetics as well as hydrodynamics experiments showed that the Pellicular adsorbent provided better performances overall. The highest quantities of the G3PDH (1,273 U/ml of adsorbent) as well as a highest theoretical plate number ($N=55.5$) were obtained for the Pellicular adsorbent. When this adsorbent was used the effect of mass transfer seemed to be reduced. Moreover, the adsorption process, using a 20% (w/v) milled feedstock, reached the equilibrium in about 40 minutes. Integrated process showed that, for the Pellicular adsorbent, it was possible to purify G3PDH. In this case, a 3.5-fold purification factor and 63.3% yield were obtained. These overall performances make the Pellicular adsorbent a quite good alternative for the downstream processing.

1- INTRODUCTION

Expanded bed adsorption (EBA) has been used for recovery and purification of biomolecules (Dasari et al., 1993; Chase (1994); De Luca et al., 1994; Hansson et al., 1994; Batt et al., 1995; Thommes et al., 1995; Hjorth et al., 1995; Finette et al., 1996; Griffith et al., 1997; Santos et al., 2000). Chang and Chase (1996); Johansson et al., 1996; Frej (1996); Pessoa et al., 1996; Karau et al., 1997). Furthermore the use of an integrated process makes the process more efficient, once it has the potential to minimise product degradation and increase overall yield (Hamilton et al., 2000; Jonasson et al., 2000; Schugerl (2000)). Then, this paper deals with the use of an integrated process for recovery and purification of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH), from baker's yeast exploiting the capacity of this enzyme to bind to Cibracon Blue 3 FG-A (Dean and Watson (1979); Kopperlschlager and Johansson (1982); Chase and Draeger (1992)). A study of the hydrodynamics was carried out as well.

2 - EXPERIMENTAL

2.1 - Materials

Reagents and Chemicals

Bicine, NAD^+ , sodium arsenate and substrate D-G3P were purchased from Sigma Chemical Co. (Poole, UK). All other chemicals were of analytical grade.

Enzyme and microorganism

Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (G3PDH), an intracellular enzyme that shows a key function in the glycolytic conversion of glucose to pyruvic acid which represents an important pathway of carbohydrate metabolism in most organism, was obtained from *Saccharomyces cerevisiae*.

Adsorbents

Pellicular: This adsorbent was manufactured at the laboratory of the Biochemical Recovery Group (BRG) at University of Birmingham (UK). It is spherical and pellicular. It has an average diameter of 260.0 μm and specific mass of 1.8 g/l.

StreamlineTM: A non-derivatised StreamlineTM adsorbent was purchased from Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). It is spherical and porous with a quartz core. It has an average diameter of 240.0 μm and specific mass of 1.2 g/l.

Macrosorb K4AX: It is an adsorbent based on Kiesulguhr material purchased from Whatman Co. (Kent, UK). It is non-spherical and porous with an average diameter of 360.0 μm and specific mass of 1.4 g/l.

2.2 - Procedures

Preparing of stock solutions

Bicine buffer: Bicine [N,N-bis (2-hydroethyl) glycine] was dissolved in deionised water containing 1.0 M sodium acetate and 1.0 mM EDTA to a concentration of 0.05M. The pH was adjusted to 8.5 with 1M NaOH and the solution was stored at 4 °C.

NAD⁺: NAD⁺ was dissolved in deionised water to form a 10.0 mM solution and the pH was adjusted to pH 4.0. Aliquots of the solution were stored at 0 °C.

Sodium arsenate: Sodium arsenate (Na_2HAsO_4) was dissolved in deionised water to a concentration of 0.5 M. The pH was then adjusted to pH 8.5 with HCl. The solution was stored at 4 °C.

Substrate D-G3P: A mixture of DL-Glyceraldehyde 3 – phosphate (DL-G3P) was obtained by the supplier. The concentration of D-G3P enantiomeric form was determined enzymatically by oxidation in Bicine buffer containing 1.0 mM NAD⁺, 25.0 mM sodium arsenate sufficient pure G3PDH (Sigma Chemical Co., Poole, UK) to completely oxidise the D-enantiomer in 3 minutes. The substrate solution

was then diluted with deionised water to yield a 20.0 mM solution of D-G3P. The substrate solution was divided into aliquots (2.0 ml/aliquots) and stored at -20°C .

Adsorbent cross-linking

Adsorbent cross-linking was carried out with epichlorohydrin. First, 10.0 ml of dried adsorbent was poured into a flask with 10.0 ml of a 1.0 M NaOH solution containing 0.4 ml of epichlorohydrin. Next, the flask was incubated for 5 hours at room temperature. Further a washing step was carried out with deionised water. The system was then autoclaved at 121°C for 45 minutes.

Immobilisation of Cibracon Blue 3 FG-A

The three adsorbents were derivatised with the monochlorotriazine dye, Cibracon Blue 3 FG-A. First, 100.0 ml of each adsorbent was suspended into 100.0 ml of deionised water then 3.0g of Cibracon Blue 3 FG-A was added and gently mixed for 15 minutes to dissolve the dye powder fully. Next, 30.0 g of NaCl was added and mixed for a further 30 minutes. At this stage 120.0 ml of 1.0 M sodium carbonate was poured into the mixture and the agitation continued for 5 minutes. The mixture was transferred to a round bottom flask (semi-submerged in a bath at 65°C) which was subsequently attached to a rotary mixing unit and rotated for mixing during 24 hours. Further a filtration step using a $125.0\ \mu\text{m}$ metal mesh was carried out in order to separate the adsorbent particles from the spent reactants. Several steps of washing with cold and hot water, respectively, were carried out to remove the unbound dye. Next, to remove completely the weakly bound dye it was used a cycle of protein adsorption and subsequent chaotropic elution. In this case, the adsorbents were poured into a chromatography column and 100.0 ml of a 1.0 mg/ml of BSA solution in 50.0 mM Tris/HCl (pH 7.5) was loaded to this column. Further, a elution step was carried out using 100.0 ml of a 3.0 M potassium thiocyanate (KSCN) solution in 50.0 mM Tris/HCl (pH 7.5) to elute the weakly bound dye and protein. The adsorbents were finally equilibrated in 50.0 mM Tris/HCl (pH 7.5) containing 0.02% (w/v) sodium azide and stored at 4°C .

Estimation of the dye concentration

At this stage 0.5 ml of the each settled adsorbent particles was suspended in 25.0 ml of 6.0 M HCl. The mixture was incubated in water bath at 95 °C and shaken for 30 minutes. The hydrolysed solution was diluted into a flask of 500.0 ml. The absorbance of the samples were recorded against a blank generated from the non-derivatised matrix treated in the same manner. The dye concentration was estimated from a standard curve generated from free dye.

Estimation of the agarose content

For the estimation of the agarose content 2.0 ml of each settled adsorbent particles dried and weighed were put in a burner at 900 °C for 30 minutes. Next, the particles were weighed again, and assuming that all organic material present in the adsorbent was agarose it was possible to estimate the content of agarose.

Cell disruption

Saccharomyces cerevisiae required for each experiment was thawed overnight in 50.0 mM Tris/HCl buffer (50% w/v) containing 1.0 mM EDTA, pH 7.5, at 4 °C. This 50% suspension was milled using a Dyno mill KDL-II. If necessary the homogenate obtained was diluted.

Kinetics assay

For the kinetics assay 5.0 ml of a milled feedstock (20% w/v) was poured into a Erlenmyer containing 2.0 ml of each adsorbent. Hence, these Erlenmyers were shaken at 25 °C for 1 hour. Next, supernatant samples were drawn along the time during 1 hour in order to assay both total protein and G3PDH activity. A mass balance was carried out to determine the G3PDH uptake onto each adsorbent.

Isotherms

Isotherms were obtained for the three adsorbents using dilution from original 50% (w/v) milled feedstock. In this case, 25%; 15%; 10%; 5%; 2.5% and 1.5%

(w/v) solutions (9.0 ml) were poured into an Erlenmyer containing 1.0 ml of adsorbent and shaken for 5 hours. After equilibrium, a mass balance was carried out to determine the G3PDH uptake onto each adsorbent.

Bed expansion

These experiments were carried out using a 1.0 cm (i.d.) glass column with a bed of glass beads (2.0 cm in height) working like a distributor. Tris/HCl buffer (50.0 mM, pH 7.5) was irrigated to the column containing a 21.0 cm settled bed height of the adsorbent at linear velocity ranging from 50.0 cm/h to 600.0 cm/h. The bed expansion is shown as the ratio between the expanded height and the settled bed height (H_{EXP}/H_0).

Residence time distribution

Residence Time Distribution (RTD) experiments for the three adsorbents were carried out using a 1.0 cm (i.d.) glass column with a bed of glass beads (2.0 cm in height) working like a distributor. A 21.0 cm settled bed height was used in these experiments. RTD assays were carried out in order to determine the axial liquid dispersion coefficient at 280.0 cm/h. In this case, 1.0% (v/v) acetone in Tris/HCl (50 mM, pH 7.5) at 25° C was used as a tracer in a negative-step input UV signal in order to obtain the number of theoretical plates (N), as described in EBA handbook (1998). The procedure for RTD determination is described below.

The buffer (50 mM Tris/HCl, pH 6.9) was pumped upwards through the bed at a chosen velocity until bed expansion had stopped. Then the piston was moved down to about 1.0 cm above the expanded bed surface. When the signal from the UV monitor was stable, the solution was changed to buffer-acetone (1.0% v/v), i.e. the positive-step input signal. The solution was then changed to buffer when the UV signal was stable at maximum absorbance (100%), i.e. the negative-step input signal. The change was marked on the chart recorder paper and the UV signal was allowed to stabilise at the baseline level (0%). The number of theoretical plates (N) was calculated from the negative-step input signal as:

$$N = t^2/\sigma^2 \quad (1)$$

where t is the mean residence time, i.e. the distance from the “mark” on the chart recorder paper to 50% of the maximum absorbance, and σ is the standard deviation, i.e. half the distance between the points for 15.85% and 84.15% of the maximum absorbance. The relation between the axial liquid dispersion coefficient (D_L) and N is:

$$D_L = (U \cdot H_{EXP}) / (2 \cdot \varepsilon \cdot N) \quad (2)$$

where U is the superficial velocity, H_{EXP} is the expanded bed height, and ε is the bed voidage in expanded mode, calculated as $\varepsilon = 1 - ((1 - \varepsilon_0) \cdot (H_0 / H_{EXP}))$. In the packed bed the bed voidage (ε_0) is approximately 0.4. H_0 is the packed bed height.

Integrated process

These experiments were carried out using a 4.5 cm (i.d.) glass column and 1.0 m in height with a bed of glass beads of 2.0 cm in height working like a distributor. A 20% (w/v) milled feedstock (1.0 L) that had just left the bead mill was submitted to a bed of 21.0 cm in settled height, previously equilibrated, at 280.0 cm/h linear velocity. The washing step was carried out using a 700.0 ml of equilibrium buffer solution. Elution was carried out with 0.5 M NaCl in Tris/HCl buffer (50 mM, pH 7.5) in an isocratic mode. In this case both the Pellicular and Macrosorb K4AX adsorbents were used. Figure 1 illustrates the integrated process.

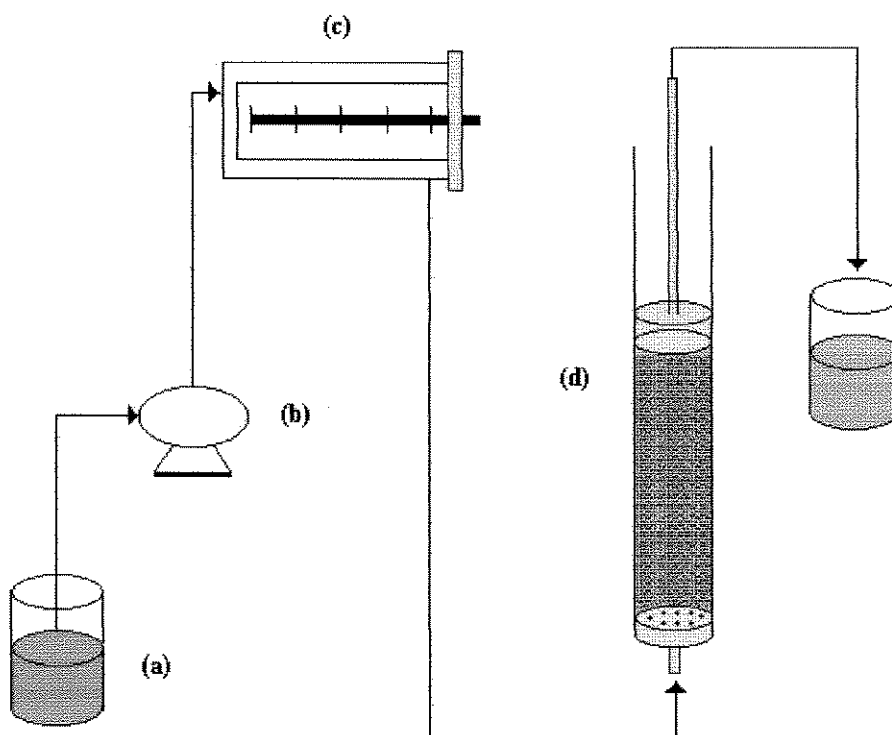


Figure 1 – Integrated process: (a) yeast feedstock (b) pump (c) bead mill (d) expanded bed

2.3 - Assays

G3PDH enzyme activity

An assay mixture containing 10.0 μl of the enzyme solution, 100.0 μl of the NAD^+ , 50.0 μl of the sodium arsenate and 790.0 μl of the bicine buffer was incubated at 25 $^{\circ}\text{C}$ for 3 minutes and the reaction was initiated by the addition of 50.0 μl of the D-G3P solution [20]. The mixture was immediately poured into a quartz cuvette and the conversion of NAD^+ to NADH was monitored by a spectrophotometer (340 nm) connected on-line with a computer.

The unit of enzyme activity was defined as the number of μmoles of NADH produced per minute at 25 $^{\circ}\text{C}$, pH 8.5 in 1.0 ml of solution (U/ml). The specific activity was defined as the number of μmoles of NADH produced per minute at 25 $^{\circ}\text{C}$, pH 8.5 per mg of total protein (U/mg).

Determination of protein

The determination of protein was carried out using the Bradford (1976) method using Bovine Serum Albumin (BSA) as the standard protein.

3 - RESULTS AND DISCUSSION

3.1 - Estimation of the dye concentration

Table 1 presents the estimation of the dye concentration obtained for the three adsorbents.

Table 1 – Dye concentration immobilised in the adsorbents

Adsorbent	Cibracon 3 FG-A (mmol/ml)
Pellicular	5.0
Streamline	4.8
Macrosorb	5.0

It can be seen in Table 1 that there was a successful dye immobilisation. In this case, practically the same dye concentration was immobilised in the adsorbents.

3.2 - Estimation of the agarose content

Table 2 shows the agarose content of each adsorbent. It can be seen in Table 2 that the Pellicular adsorbent presented a reduced percentage of agarose (3%). Therefore, as the dye concentration among the three adsorbents is practically the same the highest ligand density is observed for the Pellicular adsorbent. The Streamline adsorbent presented the highest content of agarose, therefore this adsorbent showed the lowest ligand density.

Table 2 – Agarose content in the adsorbents in percentage

Adsorbent	(%)
Pellicular	3.0
Streamline	34.0
Macrosorb	8.0

3.3 - Adsorption kinetics assay

Figure 2 shows the results obtained by the adsorption kinetics experiments.

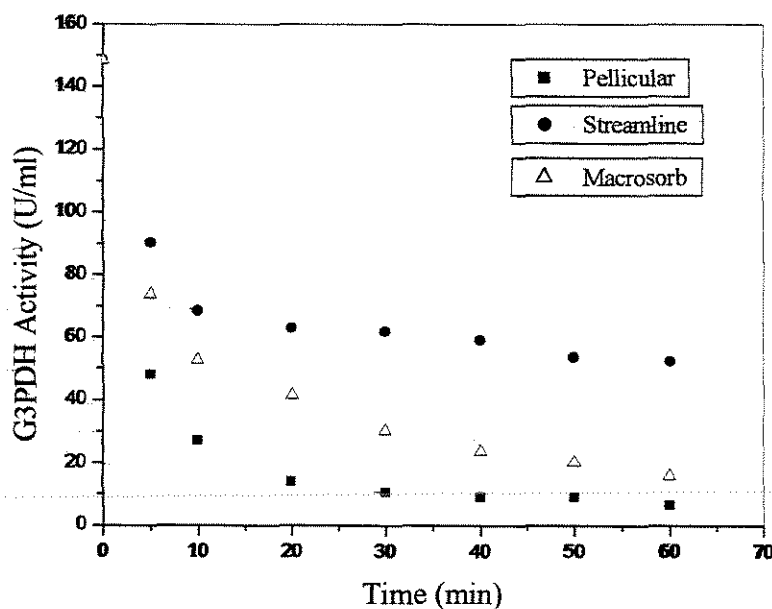


Figure 2 – Kinetics assay for the three adsorbents investigated

It can be seen in Figure 2 that the adsorption of G3PDH onto the Pellicular adsorbent is faster than the Streamline and Macrosorb adsorbents. This can be explained by the difference on structure of the adsorbents as well as by the higher ligand density of the pellicular adsorbent once both Streamline and Macrosorb are porous adsorbents. Hence, effect of resistance to mass transfer happens easily in

the porous adsorbents that in the former. Since the enzyme should move through the pores of the adsorbent (diffusion) to the adsorption site and this process is usually quite slow. It can be seen as well that one hour is enough for all systems to reach the equilibrium. Macrosorb showed higher uptake for the G3PDH enzyme than Streamline.

3.4 - Isotherms

Figure 3 illustrates the isotherms obtained for the three adsorbents.

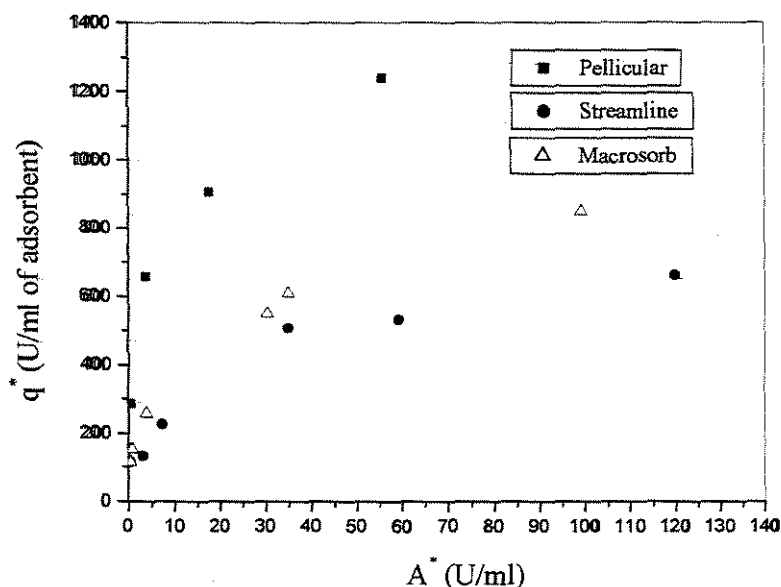


Figure 3 – Isotherms for the three adsorbents investigated

Figure 3 shows that the adsorption of G3PDH onto the Pellicular adsorbent is higher than Streamline and Macrosorb. However, comparing G3PDH adsorption on Streamline and Macrosorb it can be seen that the latter was more efficient. All adsorbents fitted quite well to the Langmuir isotherm. Table 3 shows the parameters of the isotherm obtained for the three adsorbents studied, namely, the maximum adsorption capacity (q_m) and the dissociation constant of the adsorption interaction (K_d). It can be seen in this table that Streamline and Macrosorb adsorbed only 59.0% and 69.0%, respectively, of the total capacity of the

Pellicular adsorbent. Then, the Pellicular adsorbent, with its higher ligand content, seems to be more favourable to adsorb G3PDH.

Table 3 – Isotherm parameters

Adsorbent	q_m	K_d
	(U/ml of adsorbent)	(U/ml)
Pellicular	1,273.0	2.3
Streamline	705.7	12.2
Macrosorb	885.0	9.3

3.5 - Bed expansion

Figure 4 illustrates the expansion degree for the three adsorbents. It can be seen that both the Macrosorb and Pellicular adsorbents showed good results concerned to the expansion degree. This characteristic is quite good, once throughput can be improved, that is, a higher flow-rate can be used to obtain the same bed expansion. Comparing the expansion degree of the Pellicular adsorbent, using the highest flow-rates, with the Macrosorb adsorbent it can be seen that the former showed the lowest expansion degree. On the other hand, the behaviour of Streamline showed that this adsorbent expanded a lot even for lower flow-rates.

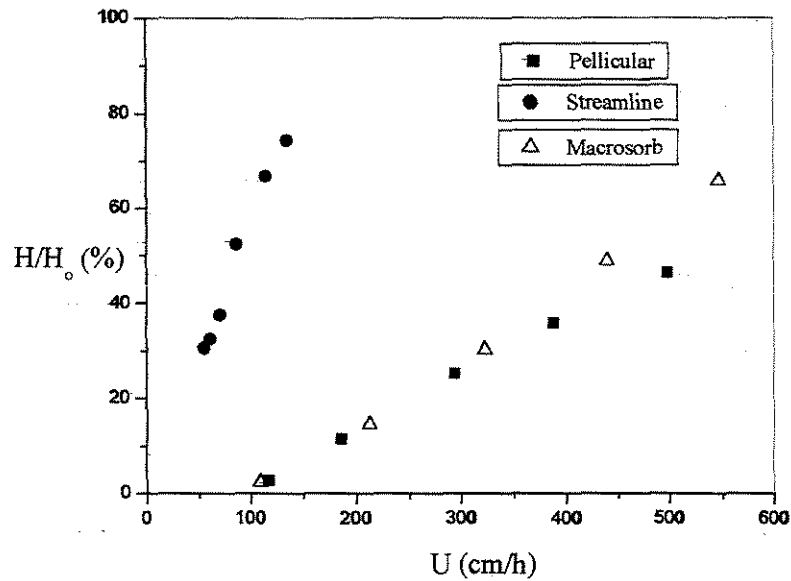


Figure 4 – Expansion degree for the three adsorbents studied

3.6 - Residence time distribution

Table 4 presents the values obtained from the RTD experiments. Pellicular adsorbent showed higher number of theoretical plates than both the Streamline and Macrosorb adsorbent. The higher specific mass of the Pellicular adsorbent seems to be responsible for such behaviour mainly by producing a most stable bed as discussed previously. Hence, a 2-fold difference of N was obtained for this adsorbent when compared to those obtained by the two other adsorbents.

Table 4 – Parameters obtained from the RTD experiments

Adsorbent	D_L (m/s ²)	N
Pellicular	3.8×10^{-6}	55.5
Streamline	6.3×10^{-6}	21.6
Macrosorb	8.9×10^{-6}	23.1

3.7 - Integrated process

Results obtained in integrated process are presented in Table 5. The Pellicular adsorbent again showed better results regarding purification factor and yield than Macrosorb adsorbent. Using the former adsorbent it was possible to obtain a 3.5-fold purification factor and a 63% yield while a 3.0-fold purification factor and a 55.6% yield was obtained to the latter. It is important to highlight that the elution step was carried out using 0.5 M NaCl in Tris/HCl buffer (50 mM, pH 7.5) in an isocratic mode. Integrated process was successful to recover the target enzyme. However, better results could be obtained if a gradient elution was used.

Table 5 – Purification parameters obtained from the integrated process

Adsorbent	Purification Factor	Yield
Pellicular	3.5	63.3
Macrosorb	3.0	55.6

4 - CONCLUSIONS

Adsorption kinetics as well as hydrodynamics experiments for Pellicular and two commercial adsorbents, Streamline and Macrosorb, showed that the former provided better performances overall. The highest amounts of G3PDH (1,273 U/ml of adsorbent) as well as the highest number of theoretical plate (N=55.5) were obtained for the Pellicular adsorbent. All adsorbents fitted well to the Langmuir isotherm. The resistance to mass transfer seemed to be reduced when the Pellicular adsorbent was used. This fact was evidenced by the short time required for the adsorption process to reach the equilibrium (about 40 minutes). The good performance makes the Pellicular adsorbent a good alternative to be used in the downstream processing since throughput can be improved. An integrated process was successful in the recovery as well as in purifying the G3PDH enzyme.

REFERENCES

- AMERSHAM PHARMACIA BIOETCH EBA Handbook: Principles and Methods, Uppsala, ISBN 91-630-5519-8, 1997.
- BATT, B. C.; YABANNAVAR, V. M.; SINGH, V., Expanded Bed Process for Protein Recovery from Whole Mammalian Cell Culture Broth, **Bioseparation**, vol. 5, p. 41-52, 1995.
- BRADFORD, M. M., A rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the principle of Protein-Dye Binding, **Analitic Biochemistry**, vol. 72, p.248-254, 1976.
- CHANG, Y. K.; CHASE, H. A., Development of Operating Conditions for Protein Using Expanded Bed Techniques: The Effect oh the Degree of Bed Expansion on Adsorption Performance, **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 49, p. 512-526, 1996.
- CHASE, H. A., Purification of proteins by adsorption chromatography in expanded beds, **TIBTECH**, vol. 12, p. 296-303, 1994.

- CHASE, H. A.; DRAEGER, N. M., Affinity purification of proteins using expanded beds, **Journal of Chromatography A**, vol. 597, p. 129-145, 1992.
- DASARI, G.; PRINCE, I.; HEARN, M. T. W., High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins, CXXIV. Physical characterisation of fluidized-bed behaviour of chromatographic packing materials, **Journal of Chromatography A**, vol. 631, p. 115-124, 1993
- DE LUCA, L.; HELLENBROICH, D.; TITCHENER-HOOKER, N. J.; CHASE, H. A., A study of the expansion characteristics and transient behaviour of expanded beds of adsorbent particles suitable for bioseparations, **Bioseparation**, vol. 4, p. 311-318, 1994.
- DEAN, P. D. G.; WATSON, D. H., Protein purification using immobilized triazine dyes, **Journal of Chromatography A**, vol. 3, p. 301-319, 1979.
- FINETTE, G. M. S.; MAO, Q-M.; HEARN, M. T. W., Study on the expansion characteristics of fluidised beds with silica-based adsorbents used in protein purification, **Journal of Chromatography A**, vol. 743, p. 57-73, 1996.
- FREJ, A-K. B., Expanded Bed Adsorption for Recovery of Renatured Human Interleukin 8 from *Escherichia Coli* inclusion bodies, **Bioseparation**, vol. 6, 265-271, 1996.
- GRIFFITH, C. M. et al., Fluidization characteristics of and protein adsorption on fluoride-modified porous zirconium oxide particles, **Journal of Chromatography A**, vol. 776, p. 179-195, 1997.
- HAMILTON, G. E., LUECHAU, F., BURTON, S. C., LYDDIATT, A., Development of a mixed mode adsorption process for the direct product sequestration of an extracellular protease from microbial batch cultures, **Journal of Biotechnology** , vol. 79, p. 103-115, 2000.
- HANSSON, M. et al., Single-Step Recovery of a Secreted Recombinant Protein by Expanded Bed Adsorption, **Bio/Technology** , vol. 12, p. 285-288, 1994.

- HJORTH, R.; KÄMPE, S.; CARLSSON, M., Analysis of some operating parameters of novel adsorbents for recovery of proteins in expanded beds, **Bioseparation**, vol. 5, p. 217-223, 1995.
- JOHANSSON, H. J.; JÄGERSTEN, C.; SHILOACH, J., Large scale recovery and purification of periplasmic recombinant protein from E. coli using expanded bed adsorption chromatography followed by new ion exchange media, **Journal of Biotechnology**, vol. 48, p. 9-14, 1996.
- JONASSON, P.; NYGREN, P-A.; JORNVALL, H.; JOHANSSON, B-L; WAHREN, J.; UHLÉN, M.; STAHL, S., Integrated bioprocess for production of human proinsulin C-peptide via heat release of an intracellular heptameric fusion protein, **Journal of Biotechnology**, vol. 76, p. 215-226, 2000.
- KARAU, A.; BENKEN, C.; THÖMMES, J.; KULA, M-R., The Influence of Particle Size Distribution and Operating Conditions on the Adsorption Performance in Fluidized, **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 55, p. 54-64, 1997.
- KOPPERSCHLAGER, G.; JOHANSSON, G., Affinity partitioning with polymer bound Cibacron Blue F3G-A for rapid, large-scale purification of phosphofructokinase from baker's yeasts, **Analytic Biochemistry**, vol. 124, n° 1, p. 117-124, 1982.
- PESSOA Jr., A.; HARTMANN, R.; VITOLO, M.; HUSTEDT, H., Recovery of extracellular inulinase by expanded bed adsorption, **Journal of Biotechnology**, vol. 51, p. 89-95, 1996.
- SANTOS, E. S; GUIRARDELLO, R.; FRANCO T. T., In: Ion Exchange at the Millennium (proceedings of IEX 2000), ed. by J. A. Greig, SCI press, London, 408p., 2000.
- SCHUGERL, K., Integrated processing of biotechnology products, **Biotechnology Advances**, vol. 18, p.581-599, 2000.

THÖMMES, J.; HALFAR, M.; LENZ, S.; KULA, M-R., *Purification of Monoclonal Antibodies from Whole Hybridoma Fermentation Broth by Fluidized Bed Adsorption*, **Biotechnology and Bioengineering** , vol. 45, p. 205-211, 1995.

**Capítulo 4 - EFFECT OF THE SETTLED BED HEIGHT ON
EXPANDED BED ADSORPTION**

**EFFECT OF THE SETTLED BED HEIGHT ON EXPANDED
BED ADSORPTION**

E. S. SANTOS; R. GUIARDELLO & T. T. FRANCO*

School of Chemical Engineering – State University of Campinas (UNICAMP)

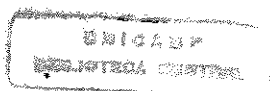
Campus Zeferino Vaz – Barão Geraldo

Mail Box: 6066 – Campinas – SP – Brazil

E-mail: franco@feq.unicamp.br

* To whom correspondence should be addressed

Artigo aceito para publicação no periódico Bioseparation.



Keywords: settled bed height, bovine serum albumin (BSA), dynamic binding capacity, expanded bed adsorption, lysozyme

ABSTRACT

This paper describes the settled bed height effect on the expanded bed adsorption. Two commercial adsorbents commonly used in downstream processing (Streamline SPTM and Streamline DEAETM) showing a log-normal distribution as well as capacity to produce the segregation phenomenon were used to adsorb lysozyme and bovine serum albumin (BSA), respectively. A bed expansion study showed that expansion behavior approached to a linear trend when 0.075 m (7.5 cm) settled bed height was used rather than 0.050 m (5.0 cm) settled bed height.

Rational operation of the dynamic binding capacity was obtained with 0.075 m settled bed height. For the lysozyme-StreamlineTM SP and BSA-StreamlineTM DEAE systems the highest values were 60% and 25%, respectively. For lysozyme, the increase in the velocity led to higher values of efficiency factor as long as 0.075 m height was used. For the BSA system this fact was not observed and less expressive results were obtained due to mass transfer effect.

1. - INTRODUCTION

Expanded bed adsorption technique (EBA) has appeared as a powerful tool for the biotechnology industry mainly because it can be used in processes in which feedstock containing particulate, e.g., fermentation broth and cell homogenates are processed. Since clarification steps can be omitted the number of unit operations are reduced. Finally, there is generally a reduction on the processing time as well as in the overall process costs.

Even though there are some papers in the literature dealing with application of expanded bed adsorption using fermentation broth (Thömmes et al., 1995) and cell homogenate (Chang and Chase, 1996a) it is interesting to study the expanded bed adsorption fundamentals. For example, we remind here that attention should be paid to the influence of the distributor design on the bed expansion (Santos et al., 2000) as well as the particle attrition of adsorbents used for expanded bed adsorption. In the present work the effect of settled bed height, using expanded bed, upon binding dynamic efficiency has been studied. Emphasis is given mainly on the fundamentals of expanded bed adsorption.

1.2 - Classification (Segregation)

The adsorption of protein in an expanded bed is carried out by adsorbents with a size/density distribution. The advantage of using a bed with particles of different size and/or density is that it generates the classification (segregation) phenomenon. That is, the smaller/lighter particles tend to remain in the top region, while the larger/heavier ones tend to stay at the bottom of the bed, in the region of the distributor. This fact reduces the particles mobility into the bed thereby improving the adsorption performance.

Wen and Yu (1966) have reported that the condition for the existence of classification (segregation) phenomenon is that the ratio between larger and smaller particles (d_L/d_S) in the bed must be above 1.3. However, Al-Dibouni and

Garside (1979) have suggested an approach in which d_L/d_S must be larger than 2.2 for that classification to exist.

1.3 - B parameter

In order to investigate the effect of settled bed on expanded bed adsorption it was used an efficiency factor (B) like suggested by Thömmes (1999). This dimensionless factor allows to quantify the dynamic binding capacity, that is, to investigate the rational use of the resin. B is defined as the ratio of breakthrough binding capacity at 10% (Q_{brt}) and equilibrium dynamic binding capacity (Q_{eq}), as depicted in Equation 1:

$$B (\%) = \frac{\frac{C_o V_{C/C_o=0.1} - \int_{V_o}^{V_{C/C_o=0.1}} C dV}{V_{ads}}}{\frac{C_o V_{C/C_o=1} - \int_{V_o}^{V_{C/C_o=1}} C dV}{V_{ads}}} \times 100 \quad (1)$$

C_o is the initial protein concentration, $V_{C/C_o=0.1}$ and $V_{C/C_o=1}$ are the irrigated solution volume in which the outlet protein concentration is 10% of inlet and equal of initial protein concentration, respectively. V_{ads} is the used adsorbent bed volume and integral terms are masses not adsorbed.

2. - MATERIAL AND METHODS

2.1 - Model protein

Bovine serum albumin (BSA) fraction V was adsorbed on Streamline™ DEAE. It was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), catalog number A-6919. It has a relative molecular mass of 67,000 Daltons and an isoelectric point at pH 4.9, as cited by Chang and Chase (1996b).

Lysozyme (EC 3.2.1.17) from chicken egg white was used as second model protein for the adsorption on Streamline™ SP. The enzyme was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), catalog number L-6876. It has a relative molecular mass of 14,500 Daltons and an isoelectric point at pH 11, as cited by Skidmore et al. (1990).

2.2 - Adsorbents

Streamline™ SP and Streamline™ DEAE, a strong cation exchanger and a weak anion exchanger adsorbent, respectively, were purchased from Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). Both adsorbents are composed of a crystalline quartz core covered by 6% cross-linked agarose. Streamline™ SP particles are spherical with a particle density (ρ_p) of 1,180 kg.m⁻³ and a particle size of 194.5 x 10⁻⁶ m (194.5 μ m). Streamline™ DEAE particles are spherical as well, with a particle density (ρ_p) of 1,190 kg.m⁻³ and a particle size of 199.7 x 10⁻⁶ m (199.7 μ m), as shown by size distribution assays.

2.3 - Adsorbent size distribution

Size distribution assays to both Streamline™ SP and Streamline™ DEAE were carried out by light scattering using a Malvern Mastersizer/E at Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT, São Paulo, Brazil).

2.4 - Experimental setup

A custom acrylic made column (0.025 m in inner diameter, 0.25 m in height) was especially designed for this work. It was fitted with an adjustable piston in order to minimize headspace over the fluidized bed. A perforated distributor was put at the bottom of the column (see Fig. 1). It consisted of a stainless steel perforated plate with five holes ($N_{or} = 5.0$) of 1.0 mm in diameter ($d_{or} = 0.001$ m) giving 0.8% of open area ratio ($F = 0.8\%$). A 60 μ m mesh was put below the perforated plate distributor and on inner piston's surface in order to avoid loss of adsorbent by elutriation or by backflow. The column was coupled to a Gradifac™ system in order to obtain the breakthrough curves.

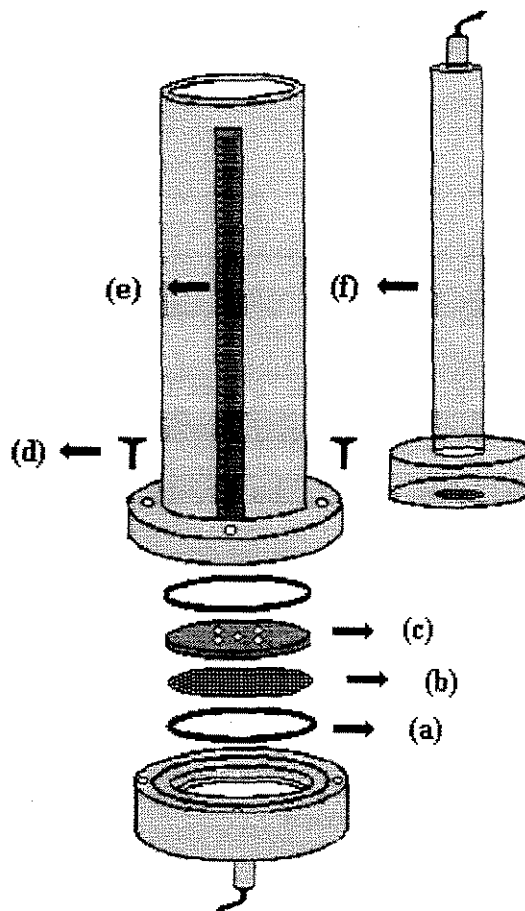


Figure 1 - Column used in the experiments. (a) rubber gasket (b) screen (c) perforated distributor (d) screw (e) ruler (f) piston

2.5 - Bed expansion measurements

The effect of settled bed height upon the degree of bed expansion was investigated. Beds were irrigated using buffer Tris/HCl (50 mM, pH 7.5). Two settled bed heights were used in the experiments, namely 0.050 m (5.0 cm) and 0.075 m (7.5 cm) corresponding to settled bed volumes of $24.5 \times 10^{-6} \text{ m}^3$ (24.5 ml) and $36.8 \times 10^{-6} \text{ m}^3$ (36.8 ml), respectively. Nine superficial velocities ranging from $1.39 \times 10^{-4} \text{ m/s}$ (50 cm.h^{-1}) through $1.25 \times 10^{-3} \text{ m/s}$ (450 cm.h^{-1}) were investigated. Bed expansion measurements were performed initially expanding the bed at 1.5 times the flow-rate to be tested at room temperature ($25 \text{ }^\circ\text{C}$). After 10 minutes the

flow-rate was lowered to desired value. The height of the expanded bed was recorded when no further change in bed height could be observed. Bed expansion results are presented in terms of the bed expansion degree (H/H_0).

2.6 - Breakthrough curve

Adsorption performance was investigated from breakthrough curves using four linear velocities $4.2 \times 10^{-4} \text{ m.s}^{-1}$ (150 cm.h^{-1}), $5.5 \times 10^{-4} \text{ m.s}^{-1}$ (200 cm.h^{-1}), $6.9 \times 10^{-4} \text{ m.s}^{-1}$ (250 cm.h^{-1}) and $8.3 \times 10^{-4} \text{ m.s}^{-1}$ (300 cm.h^{-1}). Initially, five bed columns of equilibrium buffer were used to equilibrate the bed. Once a stable expansion had been reached, the adsorption stage was carried out in the expanded mode, using frontal mode (see Fig. 2). During the loading step the optical density of protein solution ($C_0 = 1.0 \text{ kg.m}^{-3}$) at column exit was monitored at 280nm until saturation ($C/C_0 = 1.0$). Next the initial buffer changed the protein solution entering into the bed until the baseline had returned to the initial position (washing step). Hence, elution was performed using 1.0 M NaCl in buffer Tris/HCl (50 mM, pH 7.5) at $1.7 \times 10^{-4} \text{ m.s}^{-1}$ (60 cm.h^{-1}) under reversed flow in packed bed mode (Fig. 4.2). From the breakthrough curves both the dynamic binding capacity at 10% and the adsorbent equilibrium capacity were calculated.

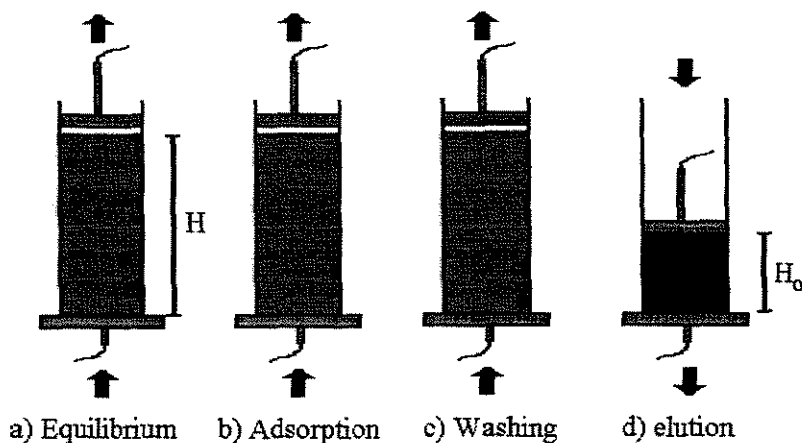


Figure 2 - Bed operating mode. The three initial steps were carried out using the bed on expanded mode (at linear velocity of the experiment) using Tris/HCl buffer (50 mM, pH 7.5) while elution step was carried out on reversed packed bed mode using 1.0 M NaCl in Tris/HCl buffer (50 mM, pH 7.5) at $1.7 \times 10^{-4} \text{ m.s}^{-1}$ (60 cm.h^{-1})

3. - RESULTS AND DISCUSSION

3.1 - Adsorbent size distribution

Figure 3 and 4 show the accumulated (full line) and retained (dark) size distribution for the two adsorbents used. It can be seen that both adsorbents present a log-normal distribution with average diameter in the range of $2.00 \times 10^{-4} \text{ m}$ (200 μm). From the adsorbent size distribution, it can be seen that both conditions of Wen and Yu (1966) and Al-Dibouni and Garside (1979) for (d_L/d_S) ratio are satisfied either to StreamlineTM SP and StreamlineTM DEAE, i.e. there are particles present in the bed as smaller as $100.0 \times 10^{-6} \text{ m}$ (100 μm) and as larger as $600.0 \times 10^{-6} \text{ m}$ (600 μm). Hence, the presence of these adsorbents in the bed lead to the classification (segregation) phenomenon.

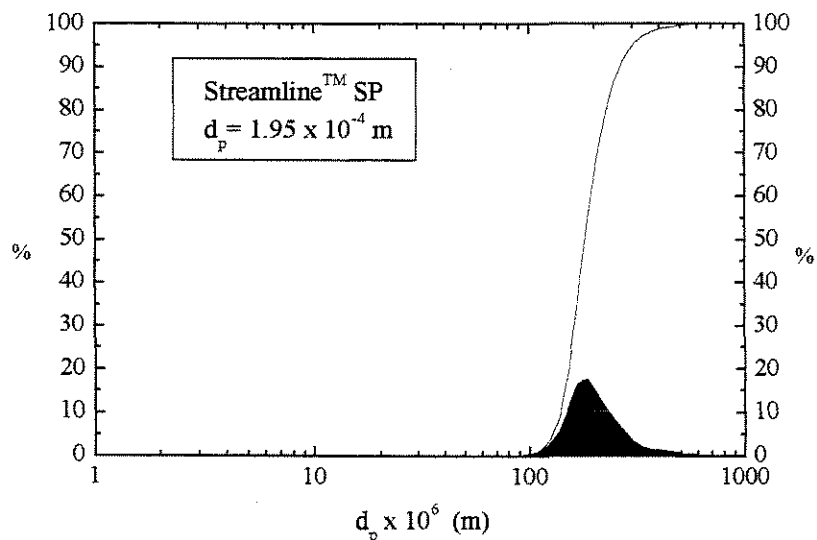


Figure 3 - Size distribution of the Streamline™ SP. Accumulated (full line) and retained (dark) size distribution for the two adsorbents used

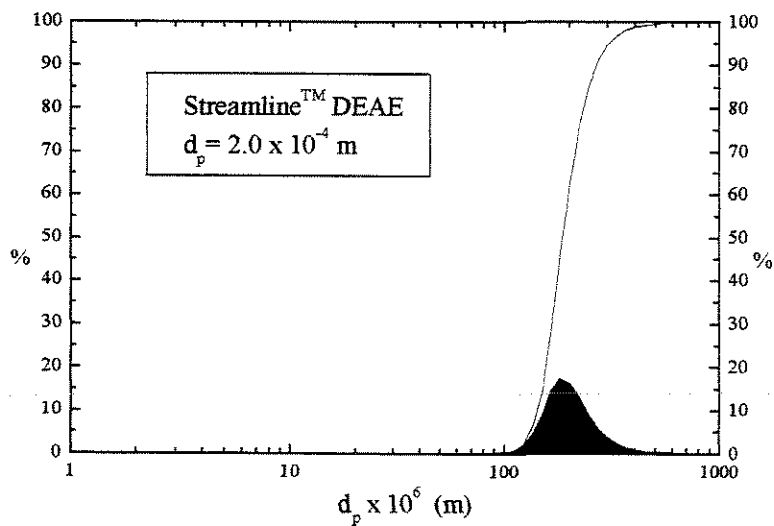


Figure 4 - Size distribution of the Streamline™ DEAE. Accumulated (full line) and retained (dark) size distribution for the two adsorbents used

3.2 - Bed expansion

Figure 5 depicts the expansion degree obtained using the anionic adsorbent (Streamline™ DEAE) for both settled bed height (0.050 m and 0.075 m). It can be

seen that there is a difference in the expansion shape for both situations. At first one, 0.050 m settled bed height has led to the lowest bed expansion degrees. It is important to observe the linear tendency of the bed expansion degree showed when 0.075 m settled bed height was used. In the Figure 5 can be seen a slightly slope changing in the bed expansion for the linear velocity between $5.5 \times 10^{-4} \text{ m.s}^{-1}$ (200 cm.h^{-1}) and $8.3 \times 10^{-4} \text{ m.s}^{-1}$ (300 cm.h^{-1}) equivalent to bed porosity (ϵ) between 0.63 and 0.7, respectively. The settled bed height reduction, leads to a higher mixing on both liquid phase and solid phase. The distributor presence itself might alter the expansion behavior mainly using lower settled bed heights. Experiments to StreamlineTM SP showed the same behavior (data not shown).

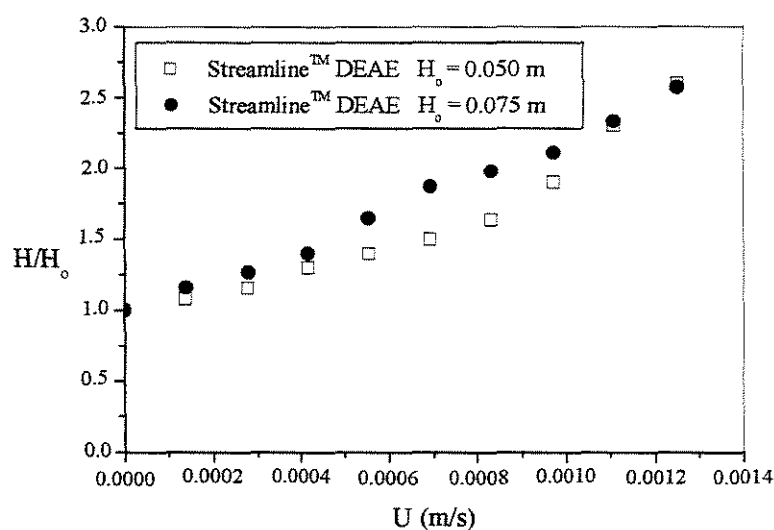


Figure 5 - Bed expansion degree using nine different linear velocities for both 0.050 m and 0.075 m settled bed height, respectively. Experiments were carried out using Tris/HCl buffer (50 mM, pH 7.5) at 25 °C

3.3 - Breakthrough curves

Figures 6 and 7 exhibit the breakthrough curves obtained for lysozyme on StreamlineTM SP using both 0.050 m and 0.075 m settled bed height, respectively. Breakthrough curves of the BSA on StreamlineTM DEAE not shown.

Breakthrough curves for both settled bed heights exhibited a disturbance at the beginning of the adsorption process. This effect is even more pronounced using higher flow velocities with 0.050 m settled bed height. A considerable particle mixing could be observed by visual inspection in both cases. Residence time distribution (RTD) experiments showed higher mixing fluid for 0.050 m settled bed height than for 0.075 m settled bed height. Higher flow velocities resulted, in general, in a decrease in dynamic binding capacity. However, this effect was again more pronounced for 5.0 cm settled bed height. A possible explanation for this behavior is that, a stable bed is performed for 0.075 m settled bed height than for 0.050 m one.

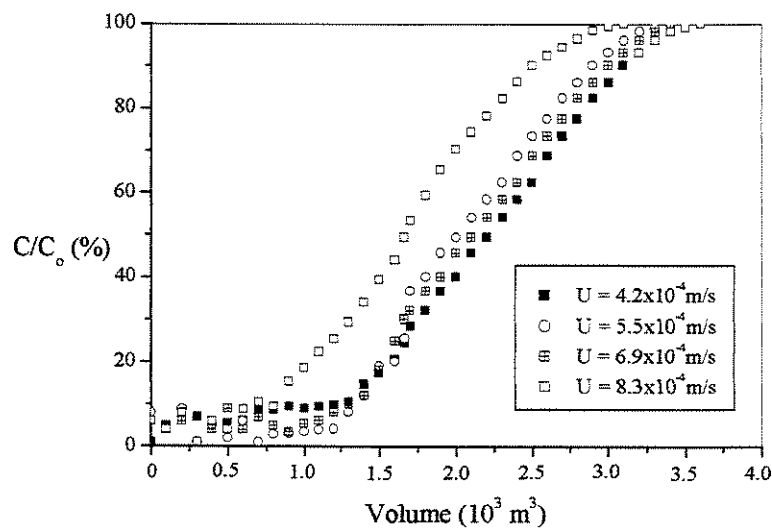


Figure 6 - Breakthrough curves of lysozyme onto Streamline™ SP for four different linear velocities using a 0.050 cm settled bed height (24.5 ml). Experiments were carried out using 1.0 kg.m⁻³ protein concentration in Tris/HCl buffer (50 mM, pH 7.5) at 25 °C. In all experiments the optical density at column exit was monitored at 280nm until saturation ($C/C_0 = 1.0$). Both loading and washing steps were carried out at linear velocity chosen for the experiment. Elution step was carried out using 1.0 M NaCl in Tris/HCl buffer (50 mM, pH 7.5) at $1.7 \times 10^{-4} \text{ m.s}^{-1}$ (60 cm.h^{-1})

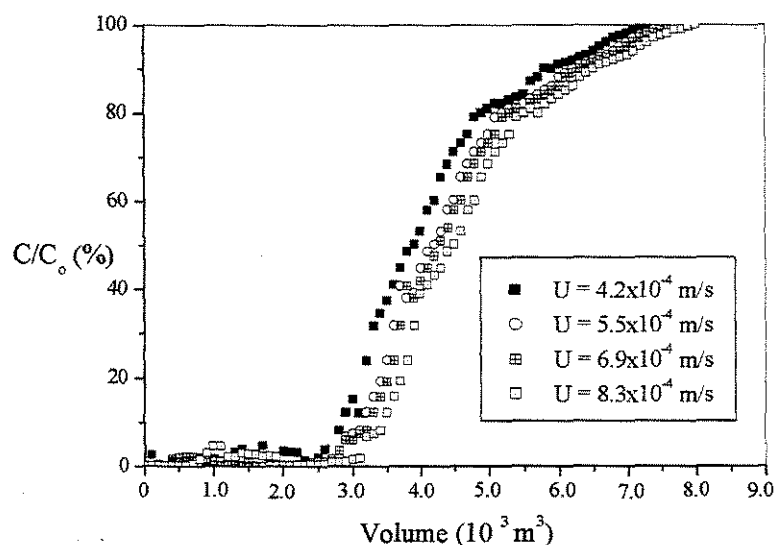


Figure 7 - Breakthrough curves of lysozyme onto StreamlineTM SP for four different linear velocities using a 0.075 m settled bed height (36.8 ml). Experiments were carried out using 1.0 kg.m^{-3} protein concentration in Tris/HCl buffer (50 mM, pH 7.5) at 25 °C. In all experiments the optical density at column exit was monitored at 280nm until saturation ($C/C_0 = 1.0$). Both loading and washing steps were carried out at linear velocity chosen for the experiment. Elution step was carried out using 1.0 M NaCl in Tris/HCl buffer (50 mM, pH 7.5) at $1.7 \times 10^{-4} \text{ m.s}^{-1}$ (60 cm.h^{-1})

3.4 - Analysis of B Parameter

Figures 8 and 9 show the obtained results for the B parameter for both model proteins. It is important to point out that the equilibrium value used for the calculation of B parameter is that of individual experiments. In these figures, the influence of the settled bed height on the B parameter based on the previous breakthrough curves is depicted.

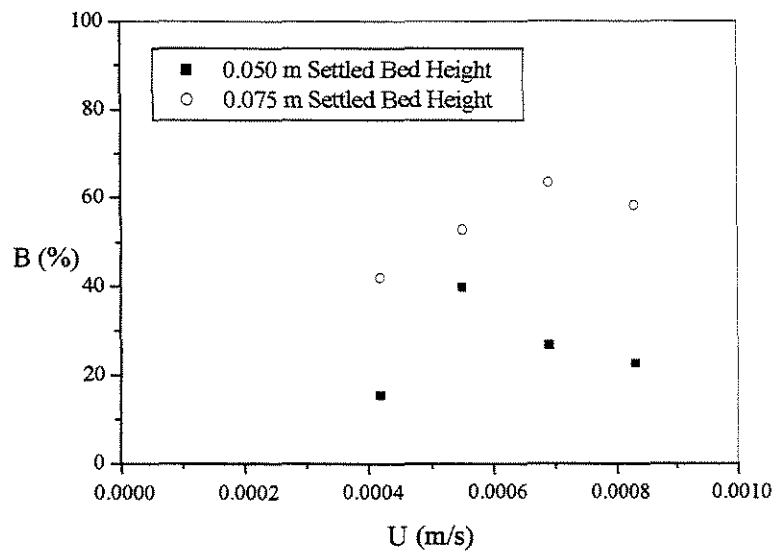


Figure 8 - Analysis of B parameter for lysozyme to Streamline™ SP

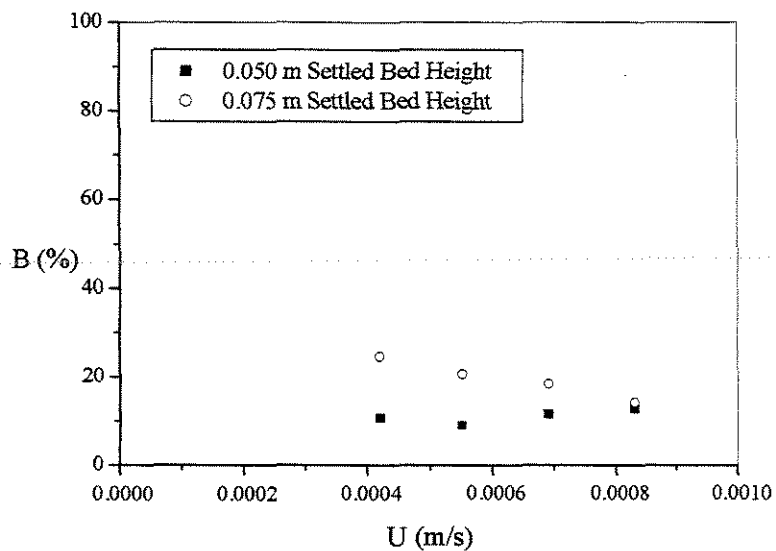


Figure 9 - Analysis of B parameter for BSA to Streamline™ DEAE

It can be seen that a more efficient use of the dynamic binding capacity of the adsorbent at 10% were obtained for 0.075 m settled bed height. For instance, considering the lysozyme-Streamline™ SP system a B value as high as 60% was obtained when a 0.075 m settled bed height was used. In this case, $6.9 \times 10^{-4} \text{ m.s}^{-1}$ (250 cm.h^{-1}) linear velocity was need to reach such condition. Overall, for the four velocities investigated for this system 54.3% average value of B was found that is higher than 25.9% found to 0.050 m settled bed height. In later, the highest B value (40%) was obtained for the $5.5 \times 10^{-4} \text{ m.s}^{-1}$ (200 cm.h^{-1}) linear velocity. Thömmes (1999) presents a B value of 72.5% for a lisozyme-Streamline™ SP XL system ($C_0 = 1.0 \text{ kg.m}^{-3}$) using a 0.095 m settled bed height, 0.020 m inner diameter column, with experiment carried out on packed mode with Glycine/HCl buffer (50 mM, pH 9.5) at 300 cm.h^{-1} . Comparing the 58.9 % of B value of our study, obtained for 7.5 cm settled bed height at 300 cm.h^{-1} linear velocity, with the result obtained by Thömmes (1999) it can bee seen a reasonable agreement whether one considers that a different buffer as well as a different adsorbent, a higher settled bed height and a lower diameter column was used. In our case, for the BSA-Streamline™ DEAE system, a maximum B value of about 25% was obtained using the lower superficial liquid velocity (150 cm.h^{-1}) with 0.075 m settled bed height. Average values of B were higher for 0.075 m settled bed height (19.8% average B value) as compared with 11.1% average value of B obtained for 0.050 m settled bed height. It is important to point out that a clear reduction on B values were obtained increasing the linear velocity when 0.075 m settled bed height was used. This behavior was no observed for the 0.050 m settled bed height system. Karau et al. (1997) have used a BSA-Streamline™ DEAE system ($C_0 = 1.0 \text{ kg.m}^{-3}$) with 0.140 m settled bed height, 0.020 m inner diameter column, with experiment carried out on expanded mode with phosphate potassium buffer (10 mM, pH 7.5) at 300 cm.h^{-1} using the same linear velocity range used in our work (from 150 to 300 cm.h^{-1}). These authors found B value higher than 43 % when the lower velocity (150 cm.h^{-1}) was investigated. This value is significantly higher than 22% obtained in our study. However, for the higher velocity (300 cm.h^{-1}) a not significant difference can be observed. In such case, the authors present 22% to B value against about 15% of our study. It is important point out that a different distributor as well as a different buffer system was used in both studies. It can be

seen that for 0.050 m settled bed height there is no significant change in the B values with flow velocity.

By comparing both systems, it can be observed that mass transfer appears to be more restricted for the BSA-Streamline™ DEAE system than for the lysozyme-Streamline™ SP one. Considering that the molar mass of lysozyme is 4.6 fold lower than the one of BSA, at pH studied its charge density is higher than that of BSA (Andrews et al., 1994). Therefore electrostatic interactions between the cationic adsorbent (Streamline™ SP) and lysozyme are stronger than for anionic adsorbent (Streamline™ DEAE) and BSA. Similar results, namely, a decrease in the breakthrough capacity with increasing flowrates as a function of the protein molecular size have been obtained by Hjorth et al (1995).

4. - CONCLUSIONS

Particle size distribution assays have shown that Streamline™ SP and Streamline™ DEAE have a size distribution wide enough to lead to bed classification (segregation) fulfilling either Wen and Yu and Al-Dibouni and Garside conditions.

An investigation on the adsorption performance in expanded bed, using two different settled bed height was performed. A 0.050 m settled bed height resulted in a non-linear bed expansion behavior whereas for a 0.075 m settled bed height a linear response was obtained.

The 0.075 m settled bed height was more favorable to obtain a more efficient use of the dynamic binding capacity at 10% breakthrough, even though particle mixing could be observed. The highest B values were 60% (at 250 cm.h⁻¹) and 25% (at 150 cm.h⁻¹) obtained to lysozyme-Streamline™ SP system and BSA-Streamline™ DEAE system, respectively, using 0.075 m settled bed height. For lysozyme, the increase in the velocity showed higher B values when 0.075 m settled bed height was used. For the BSA system, this fact was not observed. In

addition, mass transfer appeared to be limited due to its lower charge density, leading to lower B values.

Acknowledgements

Authors would like to thank FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, São Paulo, Brazil) and CNPq (Brazil) for financial support.

Nomenclature

B	efficiency parameter	
C	protein concentration at column exit	kg.m ⁻³
C ₀	initial protein concentration	kg.m ⁻³
d _p	adsorbent particle diameter	m
d _L	larger adsorbent particle diameter	m
d _s	smaller adsorbent particle diameter	m
d _{or}	orifice diameter	m
F	open area ratio	
H	expanded bed height	m
H ₀	settled bed height	m
N _{or}	orifice number	
Q _{bt}	breakthrough binding capacity at 10%	kg.m ⁻³
Q _{eq}	equilibrium dynamic binding capacity	kg.m ⁻³
V	volume of protein solution applied to the column	m ³

V_{ads}	adsorbent volume	m^3
$V_{C/C_0=0.1}$	volume of outlet protein concentration need to equal to 10% of initial protein concentration	m^3
$V_{C/C_0=1}$	volume of outlet protein concentration need to equal to initial protein concentration	m^3

Greek symbols

ε bed porosity

ρ_p adsorbent density $kg.m^{-3}$

References

- Al-Dibouni MR & Garside J (1979) Particle Mixing and Classification in Liquid Fluidised Beds. **Transaction of Institute of Chemical Engineering** 57: 94-103
- Andrews AT, Noble I, Keeratipibul S & Asenjo JA (1994) Physicochemical Properties of the Matrix Proteins of Three Important Culture Vehicles. **Biotechnology and Bioengineering** 44: 29-37
- Chang Y K & Chase HA (1996a) Ion Exchange Purification of G6PDH From Unclarified Yeast Cell Homogenates Using Expanded Bed Adsorption. **Biotechnology and Bioengineering** 49: 204-216
- Chang Y K & Chase HA (1996b) Development of Operating Conditions for Protein Using Expanded Bed Techniques: The Effect of the Degree of Bed Expansion on Adsorption Performance. **Biotechnology and Bioengineering** 49: 512-526

- Hjorth R, Kampe S & Carlsson M (1995) Analysis of some operating parameters of novel adsorbents for recovery of proteins in expanded beds. **Bioseparation** 5: 217-223
- Karau A, Benken C, Thömmes J & Kula M-R (1997) The Influence of Particle Size Distribution and Operating Conditions on the Adsorption Performance in Fluidized Beds. **Biotechnology and Bioengineering** 55: 54-64
- Richardson JF & Zaki WN (1954) Sedimentation and Fluidisation Part I. **Trans. Inst. Chem. Engs.** 32: 35-53
- Santos ES, Guirardello R & Franco TT (2000) In: **Ion Exchange at the Millenium (proceedings of IEX 2000)**, ed. by J. A. Greig, SCI press, London, 408p.
- Skidmore GL, Horstman BJ & Chase HA (1990) Modelling Single-Component Protein Adsorption to the Cation Exchanger S Sepharose® FF. **Journal of Chromatography A** 498: 113-128
- Thömmes J, Halfar M, Lenz S & Kula M-R (1995) Purification of Monoclonal Antibodies from Whole Hybridoma Fermentation Broth by Fluidized Bed Adsorption. **Biotechnology and Bioengineering** 45: 205-211
- Thömmes J (1997) Fluidized Bed Adsorption as a Primary Recovery Step in Protein Purification. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology** 58: 185-230
- Thömmes J (1999) Investigations on Protein Adsorption to Agarose-Dextran Composite Media. **Biotechnology and Bioengineering** 62:3, 358-362
- Wen CY & Yu YH (1966) Mechanics of fluidization. **Chemical Engineering Progress Symposium Series** 62, 100-111

**Capítulo 5 – PREPARATIVE CHROMATOGRAPHY OF
XYLANASE USING EXPANDED BED ADSORPTION (EBA)**

**PREPARATIVE CHROMATOGRAPHY OF XYLANASE
USING EXPANDED BED ADSORPTION (EBA)**

EVERALDO SILVINO DOS SANTOS, REGINALDO GUIRARDELLO and
TELMA TEIXEIRA FRANCO*

Biochemical Engineering Laboratory, School of Chemical Engineering

State University of Campinas (UNICAMP)

P.O. Box 6066, Campinas SP – 13081-970 Brazil

fax: (55)-(19)-3788-3965

phone: (55)-(19)- 3788-3966

e-mail: franco@feq.unicamp.br

* To whom correspondence should be addressed

Artigo aceito para publicação no periódico Journal of Chromatography A.

Keywords: xylanase; kraft pulp bleaching; expanded bed adsorption (EBA); downstream processing; preparative chromatography

ABSTRACT

EBA was used to purify a marketable xylanase often used in the kraft pulp bleaching process. Experiments in packed and expanded beds were carried out mainly to study the adsorption of xylanase onto a cationic adsorbent (Streamline SP™) in the presence of cells. In order to study the presence of cells, a *Bacillus pumilus* mass (5% wet weight) was mixed with the enzyme extract and submitted to an EBA system. One xylanase was purified to homogeneity in the packed bed. However, the 5% (wet weight) cell content hampered purification.

1. - INTRODUCTION

Xylanases are enzymes able to hydrolyse xylan, an abundant biopolymer mainly composed of heteropolysaccharides, which can be found in plant tissues as a major component of the cell wall. A variety of applications in the bioconversion and food industries have been suggested for xylanases, and one of their major potential applications is in the pulp and paper industry. In this case, commercial xylanases have been used in the bleaching process under alkaline conditions showing great potential by reducing the quantity of polluting organic chlorine compounds required. Xylanase prebleaching technology is now in use at several mills around the world; the main motivating factors for this technology are the economic and environmental advantages that xylanase offers to the bleach plant (Bajpai, 1999). The optimum enzyme for this process should be active at high temperatures and under alkaline pH conditions, hence it could be introduced at different stages of the bleaching process without requiring changes in pH or temperature (Shoham et al., 1992; Bim and Franco, 2000; Munck, 1993).

On the other hand, the characteristics of biotechnological systems make purification the most expensive part of biomaterials process production. Spalding (1991) has commented that values as high as 50% of overall costs in the biotechnology industries are related to downstream processing. Thus, the development of new and economically advantageous purification methods is a challenging area. Purification of target proteins requires their separation from the media or from the raw extract used for the maintenance of the biomolecules. Expanded Bed Adsorption (EBA) (Chase, 1994; Frej et al., 1994; Chang et al., 1998; Raymond et al., 1998; Hamilton et al., 2000) is a quite good alternative to be used in initial steps of downstream processing since it allows that particulate containing feedstock to be submitted directly to the column without need for a prior clarification step (centrifugation or filtration). Hence, it generally leads to a reduction in processing time, preventing harmful molecules like proteases, nucleic acids, etc., can interact with the target biomolecule, thereby reducing its biological

function. Moreover, EBA offers an overall cost reduction, since there is no need for clarification equipment.

Even though EBA is playing an important role in downstream processing, some questions are presently arising, such as for instance, what is the effect of cells on EBA performance? Is there a cell content limit for using EBA without hampering in any way bed hydrodynamics?

The aim of this work was to purify a xylanase from a commercial extract (Pulzyme™ HC, Novonordisk) used in the kraft pulp bleaching process using EBA as well as to study the effect of cells on this purification process.

2. - EXPERIMENTAL

2.1 Materials

2.1.1 Pulpzyme™ HC and reagents

Pulpzyme™ HC was a kind gift from Novonordisk (Brazil). All other chemicals were purchased from Sinthy (São Paulo, Brazil) and were of analytical grade.

2.1.2 Microorganism

In order to simulate the presence of cells, a mass of *Bacillus pumilus* (5% wet weight) previously isolated in our laboratory was mixed with the Pulpzyme™ HC extract and submitted to a EBA system. The wild strain was maintained on slants containing xylan from corn.

2.1.3 Adsorbent

Streamline™ SP, a strong cation exchanger, was purchased from Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden. Streamline™ SP particles are spherical with a particle density of 1180 kg.m⁻³ and a particle size of 194.5 µm, composed of a crystalline quartz core covered by 6% cross-linked agarose.

2.2 Equipment

An acrylic custom made column (2.5 cm in inner diameter, 25.0 cm in height) was fitted with an adjustable piston in order to minimise headspace over the fluidised bed. A perforated distributor was put at the bottom of the column. It was made of stainless steel with five orifices 1.0 mm in diameter giving a 0.8% open area ratio. A 60 µm mesh was used both below the perforated plate distributor and on the inner piston surface in order to avoid loss of adsorbent by backflow or by elutriation, respectively. A ruler was put on the column wall in order to help the bed height record. Figure 1 illustrates a diagram of the column used in this work. The column was coupled to a Gradifac™ system (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). This system consists basically of a mixer, a

UV monitor, a chart record and a controller as well as a peristaltic pump (P-50) that allows flow rates from $0.1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ to $50.0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ to be obtained.

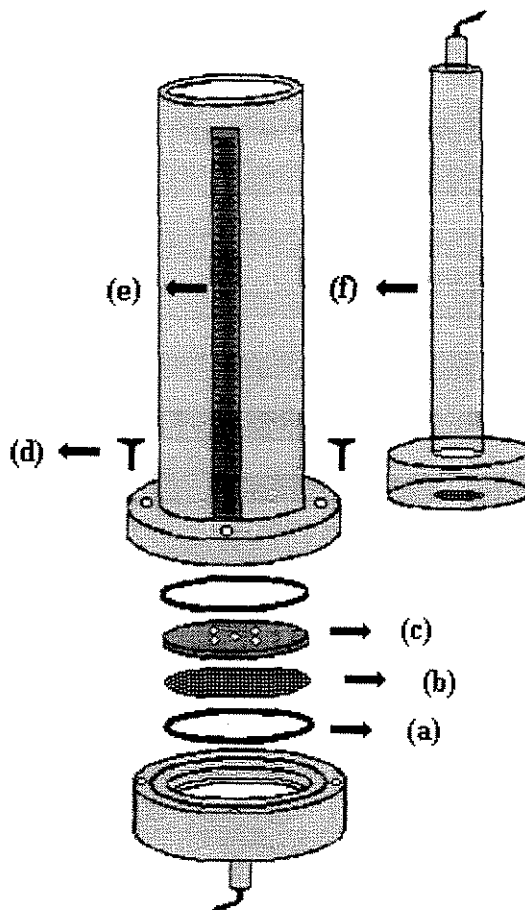


Figure 1 - Drawing of the column used in this work: (a) rubber gasket (b) screen ($60\mu\text{m}$) (c) distributor (perforated plate) (d) screw (e) ruler (f) piston

2.3 Procedures

2.3.1 Residence time distribution (RTD)

RTD experiments for the bed expanded without cells were carried out in order to determine the axial liquid dispersion coefficient for the range of flow rates used in this work. In our case, 0.5% (v/v) acetone in Tris/HCl (50 mM, pH 6.9) at 25°C was used as a tracer in a negative-step input UV signal in order to obtain the

number of theoretical plates (N), as described in the EBA Handbook [11]. The procedure for RTD determination is described below.

The buffer (50 mM Tris/HCl, pH 6.9) was pumped upwards through the bed at a chosen velocity until bed expansion had stopped. Then the piston was moved down to about 1.0 cm above the expanded bed surface. When the signal from the UV monitor was stable, the solution was changed to buffer-acetone (0.5% v/v), i.e. the positive-step input signal. The solution was then changed to buffer when the UV signal was stable at maximum absorbance (100%), i.e. the negative-step input signal. The change was marked on the chart recorder paper and the UV signal was allowed to stabilise at the baseline level (0%). The number of theoretical plates (N) was calculated from the negative-step input signal as:

$$N = t^2/\sigma^2 \quad (1)$$

where t is the mean residence time, i.e. the distance from the “mark” on the chart recorder paper to 50% of the maximum absorbance, and σ is the standard deviation, i.e. half the distance between the points for 15.85% and 84.15% of the maximum absorbance. The relation between the axial liquid dispersion coefficient (D_L) and N is:

$$D_L = (U \cdot H_{EXP}) / (2 \cdot \varepsilon \cdot N) \quad (2)$$

where U is the superficial velocity, H_{EXP} is the expanded bed height, and ε is the bed voidage in expanded mode, calculated as $\varepsilon = 1 - ((1 - \varepsilon_0) \cdot (H_0 / H_{EXP}))$. In the packed bed the bed voidage (ε_0) is approximately 0.4. H_0 is the packed bed height.

2.3.2 Preparation of cells containing extract

B. pumillus was grown in Erlenmeyer flasks containing xylan medium according to Duarte et al. (1999). Inoculated flasks were shaken continuously at 200 rpm and 40° C for 24 hours. After centrifugation supernatant was discarded and the whole cells were weighed and shaken overnight with Tris/HCl buffer (50 mM, pH 6.9) followed by addition of the PulpzymeTM HC extract.

2.3.3 Packed bed experiment

In this experiment the column contained a packed bed 5.0 cm in height, i.e. a column volume (CV) of 25.0 ml of Streamline™ SP. The column was equilibrated with 5 CV of Tris/HCl (50 mM, pH 6.9). Both the loading (20.1 mg.ml⁻¹ total protein and 94,726 U.ml⁻¹ total activity) and the washing steps were carried out at 4.9 ml.min⁻¹ (60 cm.h⁻¹) using 1.8 CV and 3.0 CV, respectively. Linear gradient elution was carried out using 2.6 CV at 2.5 ml.min⁻¹ (30 cm.h⁻¹) with Tris/HCl (50 mM, pH 6.9) as buffer A and 1.0 M NaCl in Tris/HCl (50 mM, pH 6.9) as buffer B.

2.3.4 Expanded bed experiments with and without cells

In these experiments the column contained a packed bed 5.0 cm in height ($H_0 = 5.0$ cm; 25.0 ml) of Streamline™ SP. Both the loading (70.4 mg.ml⁻¹ total protein and 111,796 U.ml⁻¹ for the experiment without cells; 19.6 mg.ml⁻¹ total protein and 192,738 U.ml⁻¹ for the experiment with cells) and the washing steps were carried out at 8.2 ml.min⁻¹ (100 cm.h⁻¹) using 1.8 CV and 3.0 CV, respectively. Linear gradient elution was carried out using 2.6 CV at 4.9 ml.min⁻¹ (60 cm.h⁻¹) with Tris/HCl (50 mM, pH 6.9) as buffer A and 1.0 M NaCl in Tris/HCl (50 mM, pH 6.9) as buffer B. In both cases, a degree of expansion (H_{EXP}/H_0) of 1.3 was observed.

2.4 Assays

2.4.1 Assay of xylanase activity

Xylanase activity was assayed according to Bailey et al. (1992) with 1% Birchwood xylan solution in glycine-NaOH buffer (100 mM, pH 10.0) at 55°C. The amount of reducing sugars was determined according to Miller (1959). One unit of xylanase activity was defined as 1 μmol of xylose produced per minute under the given conditions.

2.4.2 Determination of protein

Determination of total protein was carried out according to the Sedmak and Grossberg (1977) modified method, which is based on the drop in absorbance at 595 nm compared to the maximum dye absorbance recorded (465 nm) due to protein-dye binding. Using the modified method, one hundred microlitres of the sample (or any value up to 1500 μ l) was added to 1400 μ l (or any value depending on sample volume) of water and 1500 μ l of Coomassie blue solution in a cuvette. Then, the contents of the cuvette were mixed well and the A_{595}/A_{465} ratio was recorded using a spectrophotometer (UV/VIS 911A, GBC Scientific Equipment, Victoria, Australia). A A_{595}/A_{465} protein curve had previously been obtained for several protein contents using Bovine Serum Albumin (BSA) as the standard protein.

2.4.3 Purification factor and yield

Purification factor (PF) is defined as the mass (specific activity) of xylanase pooled in the elution step divided by the mass (specific activity) of xylanase in the feedstock, i.e. Purification Factor = (specific activity of xylanase)_{ELUTION}/(specific activity of xylanase)_{FEEDSTOCK}.

Yield (%) is defined as the concentration of xylanase pooled in the elution step divided by the concentration of the xylanase in the feedstock, i.e. Yield = (activity of xylanase)_{ELUTION}/(activity of xylanase)_{FEEDSTOCK}.

2.4.4 Electrophoresis

SDS electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out in 15% homogeneous gel (Laemmli, 1970). The molecular mass (M_r) markers were phosphorilase b (94,000), BSA (67,000), ovalbumin (43,000), carbonic anhydrase (30,000), soybean trypsin inhibitor (20,000) and α -lactalbumin (14,400), available as a standard kit (Amershan-Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

3. - RESULTS AND DISCUSSION

3.1 - Packed bed experiment

The experiment in packed bed mode was carried out in order to study the behaviour of PulpzymeTM HC adsorption onto StreamlineTM SP under *plug-flow* conditions. Figure 2 shows that two peaks showed xylanasic activity (probably, iso-enzymes) when a linear salt gradient was used. The first one was eluted with about 0.18 M NaCl and the second one was eluted with 0.85 M NaCl, indicating that the latter rather than the former interacted more strongly with the adsorbent. However, only the first peak was purified to homogeneity, as can be observed by SDS-page (Figure 3). In fact, 6.6 mg of total protein and 930,013 U of xylanasic activity were present in the tubes that showed the purified enzyme (peak 1) with a purification factor of 30 and a 21.8% yield (Table 1). 129.4 mg of total protein and 2,834,684 U of xylanasic activity with a purification factor of 4.7 and a 66.5% yield were found for peak 2.

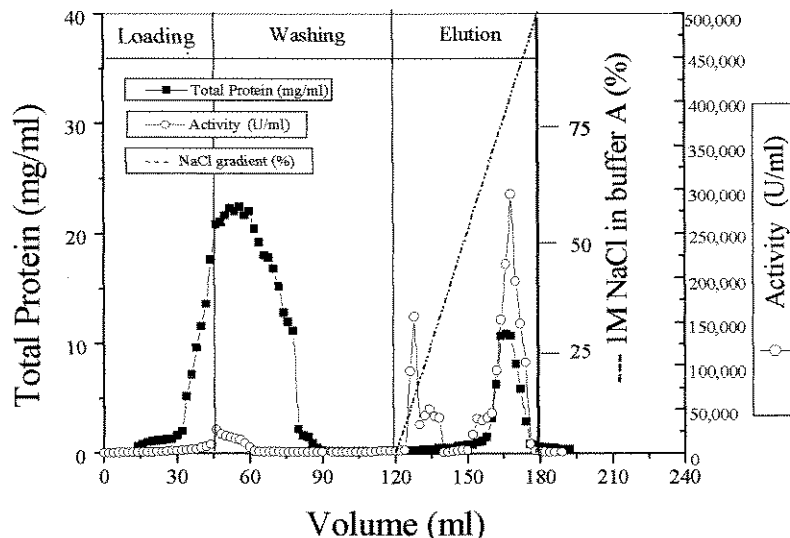


Figure 2 - Xylanase purification using packed bed. Dotted line shows the salt linear gradient as the percentage of the 1M NaCl in Tris/HCl (50 mM, pH 6.9) (buffer B)

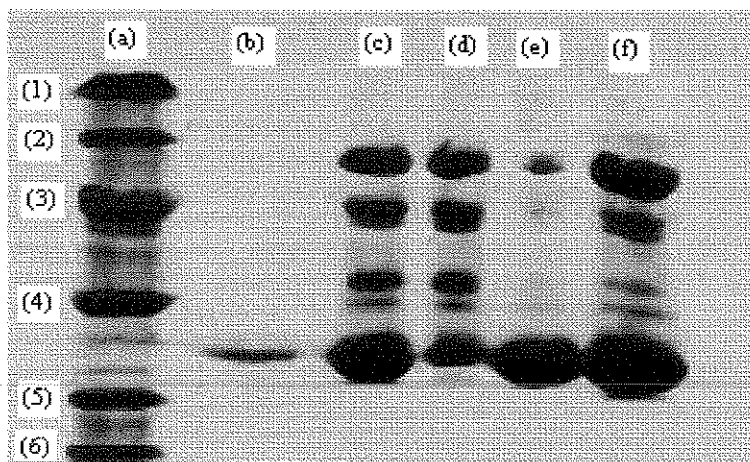


Figure 3 - SDS page stained with Coomassie blue. (a) markers, (b) purified xylanase (peak 1), (c) total elution, (d) total washing, (e) total loading, (f) feedstock. (1) phosphorilase b (94,000), (2) BSA (67,000), (3) ovalbumin (43,000), (4) carbonic anhydrase (30,000), (5) soybean trypsin inhibitor (20,000) and (6) α -lactalbumin (14,400)

Table 1 - Purification in packed bed

Step	Volume (ml)	Protein (mg)	Activity (U)	Sp. Activ. (U/mg)	Purification Factor	Yield (%)
Feedstock	45	906	4,262,428	4,705	1.0	100
Loading	45	171	109,755	641	---	---
Washing	75	591	388,872	658	---	---
Peak 1	16.4	6.6	930,013	140,911	29.9	21.8
Peak 2	29.1	129.4	2,834,684	21,906	4.7	66.5

3.2 - Expanded bed experiments with and without cells

The previous experiment, using a packed bed in a *plug-flow* mode, was successful in purifying a xylanase from a commercial extract. However, one knows that the hydrodynamics in the EBA is mainly influenced by the axial liquid dispersion coefficient (Chang and Chase, 1996; Chang and Chase, 1996; Batt et al., 1995; Goto et al., 1995) as well as the column distributor (Santos et al., 2000). This means that previous knowledge of the residence time distribution (RTD) is sufficient to know whether a *plug flow* or a *back-mixing* mode is present in the bed. Figure 4 illustrates the typical axial liquid dispersion coefficient values for our system (using Tris/HCl (50 mM, pH 6.9) as fluidising liquid), including the flow rate used in this work. It can be seen that for the 100 cm.h^{-1} (8.2 ml.min^{-1}) linear velocity used there is a low axial liquid dispersion coefficient ($5.3 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), i.e. there is no significant deviation from *plug flow*. On the other hand, there are few papers dealing with the effect of cells on purification in EBA. Fernández-Lahore et al. (1999) have studied the effect of cells on the hydrodynamics of EBA. It has been shown that a 5% (wet weight) cell content is enough to alter the hydrodynamics of an expanded bed as well as that an anionic exchanger rather than a cationic one can interact strongly with cells due to its surface charges

(negative charges are present on the cell surface). Based on this fact, we have chosen to study the effect of a 5% (wet weight) cell content on the purification of Pulpzyme™ HC.

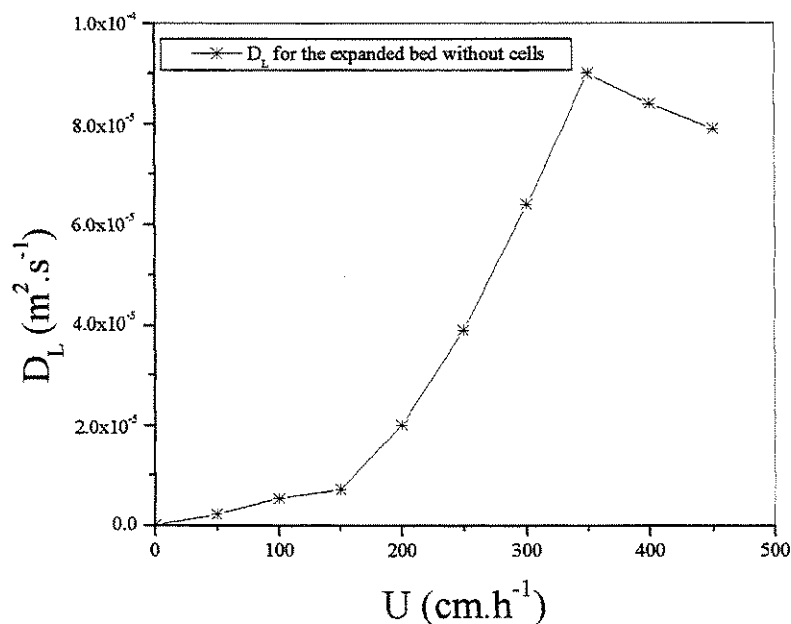


Figure 4 - Axial liquid dispersion coefficient for different linear velocity

Chromatograms for the experiments without and with cells are shown in Figures 5 and 6, respectively. For the expanded bed without cells 76.2 mg of total protein and 1,667,440 U of xylanasic activity were found, giving a 13.8-fold purification factor and a 21.8% yield for peak 1. Peak 2 showed 232.8 mg of total protein and 1,193,318 U of xylanasic activity with a 3.2-fold purification factor and a 23.7% yield (Table 2).

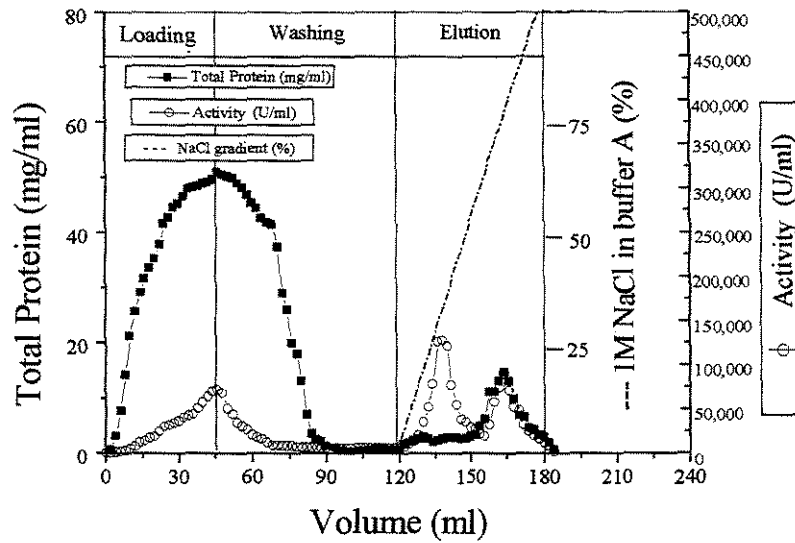


Figure 5 - Xylanase purification using expanded bed without cells. Dotted line shows the salt linear gradient as the percentage of the 1M NaCl in Tris/HCl (50 mM, pH 6.9) (Buffer B)

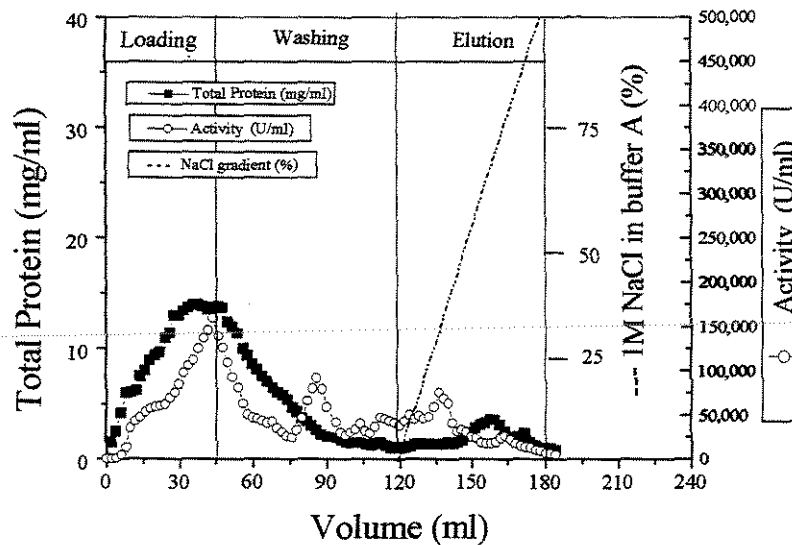


Figure 6 - Xylanase purification using expanded bed with cells. Dotted line shows the salt linear gradient as the percentage of the 1M NaCl in Tris/HCl (50 mM, pH 6.9) (buffer B)

Table 2 - Purification in expanded bed without cells

Step	Volume (ml)	Protein (mg)	Activity (U)	Sp. Activ. (U/mg)	Purification Factor	Yield (%)
Feedstock	45	3,169	5,030,838	1,587	1.0	100
Loading	45	1,458	1,137,845	780	---	---
Washing	75	1,402	1,032,235	736	---	---
Peak 1	29.0	76.2	1,667,440	21,882	13.8	33.1
Peak 2	29.1	232.8	1,193,318	5,126	3.2	23.7

The effect of the presence of cells in the bed can be observed in Figure 6. It can be seen that, in fact, the presence of cells itself is enough to change the chromatogram completely. Even though a cationic adsorbent was used in this experiment, a non-uniform performance was obtained. This fact becomes most evident when salt is applied to the column. This may be the reason why it is quite difficult to obtain with confidence a DTR curve using a salt (eg. NaCl, KCl) as tracer [11], mainly for a high cell content. In this case, other properties like fluorescence are helpful. We would like to highlight that as a *plug flow* mode exists under the conditions of the experiment, only the presence of cells justifies the difference between both experiments. When a 5% (wet weight) cell content was present in the bed there was a decrease in both purification factor and the yield (Table 3) with some xylanase activity leaving the column in the washing step (peak 1). Xylanase activity of the second enzyme (peak 2) was widely distributed in the elution. In this case, just a 1.7-fold purification factor and a 21.8% yield were obtained for this peak.

Table 3 - Purification in expanded bed with cells

Step	Volume (ml)	Protein (mg)	Activity (U)	Sp. Activ. (U/mg)	Purification Factor	Yield (%)
Feedstock	45	883	8,673,210	9,822	1.0	100
Loading	45	414	2,928,180	7,073	---	---
Washing	75	354	3,853,150	10,885	1.1	---
Peak 1	24.2	50.7	1,148,180	22,646	2.3	13.2
(in washing)						
Peak 2	65	115	1,891,880	16,451	1.7	21.8

4. - CONCLUSIONS

We have studied the effect of cells on the purification of a commercial xylanase applied to kraft pulp bleaching. At least one iso-xylanase was purified to homogeneity in the packed bed. In this case, it was possible to obtain a 30-fold purification factor as well as a 21.8% yield for peak 1 and a 4.7-fold purification factor as well as a 66.5% yield for peak 2. For the experiment in the expanded bed without cells, a 13.8-fold purification factor and a 21.8% yield were obtained for peak 1. A 3.2-fold purification factor and a 23.7% yield were obtained for peak 2. On the other hand, a 5% cell content (wet weight) was enough to alter the bed hydrodynamics even though a cationic adsorbent had been used. In this case, peak 1 was eluted in the washing step (a 2.3-fold purification factor and a 13.2% yield) and peak 2 was widely distributed during the elution step, in this case a 1.7-fold purification factor and a 21.8% yield were obtained.

Acknowledgements

The authors would like to thank Novonordisk (Brazil), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, São Paulo, Brazil) and CNPq (Brazil).

References

- [1] P. Bajpai, *Biotech. Progress* 15:2 (1999) 147-157.
- [2] Y. Shoham, Z. Schwartz, A. Khasin, O. Gat, Z. Zosim, E. Rosemberg, *Biodegradation* 3 (1992) 207-218.
- [3] M. A. Bim, T.T. Franco, *Journal of Chromatography B*, 743 (2000) 349-356.
- [4] N. Munck, *Pulpzyme HC: 6 Stage ECF Bleaching* Novo Nordisk, 1993.
- [5] B. J. Spalding, *Bio/Technology*, 9 (1991), 229-233.
- [6] H. A. Chase, *TIBTECH*, 12 (1994) 296-303.
- [7] A-K. B. Frej, R. Hjorth, Å. Hammarström, *Biotechnology and Bioengineering*, 44 (1994), 922-929.
- [8] Y-K. Chang, Y-H. Chen, C-H. Chien, *Enzyme and Microbial Technology*, 23 (1998), 204-210.
- [9] F. Raymond, D. Rolland, M. Gauthier, M. Jolivet, *Journal of Chromatography B*, 706 (1998), 113-121.
- [10] G. E. Hamilton, F. Luechau, S. C. Burton, A. Lyddiatt, *Journal of Biotechnology*, 79 (2000), 103-115.
- [11] *Expanded Bed Adsorption – Principles and Methods*, Amersham Pharmacia Biotech Handbook, 160p., 1997.

-
- [12] M. C. T. Duarte, E. P. Portugal, A. N. Ponezi, M. A. Bim, C. V. Tagliari, T. T. Franco, *Bioresource Technology*, 62 (1) (1999), 49-53.
- [13] M. J. Bailey, P. Biely, K. Poutanen, *J. Biotech.* 23 (1992) 257-270.
- [14] G. L. Miller, *Anal. Chem.* 31 (1959) 426-428.
- [15] J. J. Sedmak, S.E. Grossberg, *Anal. Biochem.* 79 (1977) 544-552.
- [16] U. K. Laemmli, *Nature*, 227 (1970) 680-685.
- [17] Y. K. Chang, H. A. Chase, *Biotechnology and Bioengineering*, 49 (1996), 204-216.
- [18] Y. K. Chang, H. A. Chase, *Biotechnology and Bioengineering*, 49 (1996), 512-526.
- [19] B. C. Batt, V.M. Yabannavar, V. Singh, *Bioseparation*, 5 (1995), 41-52.
- [20] M. Goto, T. Imamura, T. Hirose, *Journal of Chromatography A*, 690 (1995), 1-8.
- [21] E. S. Santos, R. Guirardello, T. T. Franco, in: *Ion Exchange at the Millenium (proceedings of IEX 2000)*, ed. by J. A. Greig, SCI, London, 408p., 2000.
- [22] H. M. Fernández-Lahore, R. Kleef, M.-R. Kula, J. Thömmes, *Biotechnology and Bioengineering*, 64 (1999), 484-496.

**Capítulo 6 – CHITOSANASE EXTRACTION AND
PURIFICATION BY EXPANDED BED ADSORPTION**

**CHITOSANASE EXTRACTION AND PURIFICATION BY
EXPANDED BED ADSORPTION**

E. S. SANTOS; R. GUIARDELLO; T. T. FRANCO*

Biochemical Engineering Laboratory, School of Chemical Engineering

State University of Campinas (UNICAMP)

P.O.Box 6066, Campinas SP - 13081-970 Brazil

fax: (55)-(19)-3788-3965

phone: (55)-(19)- 3788-3966

e-mail: franco@feq.unicamp.br

* To whom correspondence should be addressed

Artigo que será submetido à periódico internacional.

Keywords: expanded bed adsorption (EBA); *Bacillus cereus*; downstream processing; ion exchange

ABSTRACT

This work deals with the purification of a fermentation broth of chitosanase using expanded bed adsorption (EBA). Initial batch uptake experiments with unclarified and clarified fermentation broth of chitosanase showed that equilibrium was reached in half an hour, with adsorbent capacity of 0.119 U/ml of adsorbent and 0.133 U/ml of adsorbent, respectively. The packed bed purification using clarified chitosanase fermentation broth allowed to obtain a chitosanase peak with a 7.6-fold purification factor and a 67.4% yield. These values were slightly higher than the values found for the expanded bed purification using both clarified and unclarified fermentation broth of chitosanase, respectively. Namely, a 6.9-fold purification factor and a 68.5% yield was obtained for the former and a 6.9-fold purification factor and a 67.9% yield was obtained for the latter. EBA using unclarified fermentation broth of chitosanase was successful to separate the chitosanase from the main contaminants of the broth.

1. - INTRODUCTION

Chitosan is a β -1,4-linked glucosamine polymer which, unlike chitin, contains few, if any, N-acetyl residues (Gooday, 1990; Lee et al. 1996; Ak et al. 1998). It has been currently obtained by deacetylation of chitin, and N-acetylglucosamine polymer extract from shellfish exoskeletons. There is no occurrence in nature of fully deacetylated chitosan (Fink et al., 1991). Chitosanase are enzymes able to hydrolyse chitosan producing chitooligosaccharides (oligomers) even though chitosan chitooligosaccharides can be obtained by acid hydrolysis as well. The former hydrolysis is more specific, able to control and reproducible (Muzarelli, 1993). For treatment of industrial waste water, chemical hydrolysis of chitosan costs more than enzymatic one (Yamasaki et al., 1992). Chitosan and its oligomers have anti-bacterial, anti-fungal and anti-tumour activities being for these reason applied to industrial, medical and agricultural (Shimosaka et al., 1993; Stoyachenko et al., 1994; Abdel-Aziz, 1999).

However, downstream processing costs play an important role in the biotechnology industries. It is known that downstream processing accounts for 50%-80% of overall costs (Spalding 1991, Sadana and Beelaram, 1994). Based on this fact, alternative techniques able to reduce costs in downstream processing are welcome. Expanded Bed Adsorption (EBA) appears such as a quite good alternative since it allows that particulate containing feedstock can be submitted directly to the column without need of prior centrifugation or filtration step (Thömmes et al., 1995; Chang and Chase, 1996 a,b; Hamilton et al., 2000; Santos et al., 2000). In this work we have used EBA in order to purify a chitosanase fermentation broth from *Bacillus cereus*.

2. - MATERIALS AND METHODS

2.1 - Microorganism

An isolated wild strain identified as *Bacillus cereus* was maintained on CDA (Chitosan Detector Agar), as described by Boucher et al. (1992).

2.2 - Enzyme preparation

B. cereus was first pre-incubated in Trypticase Soytone (TSB) medium (Pelletier and Sygush, 1990) for 16 hours at 30° C and 200 rpm. Followed by growth in Erlenmyer flasks containing chitosanase medium (0.31 g.l⁻¹ KH₂PO₄, 0.5 g.l⁻¹ MgSO₄.7H₂O, 1.7 g.l⁻¹ NaH₂PO₄, 0.0005 g.l⁻¹ ZnSO₄.7H₂O, 0.001 g.l⁻¹ MgSO₄.7H₂O, 0.001 g.l⁻¹ FeSO₄, 0.0001 g.l⁻¹ CuSO₄.5H₂O, 40.0 g.l⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 20.0 g.l⁻¹ chitosan (Sigma, St. Louis, MO, USA)). Inoculated flasks were shaken continuously at 200 rpm and 30° C for 20 hours. The fermentation broth containing whole cells was kept in freezer, whether necessary aliquots were thawed, centrifuged and the supernatant utilised.

2.3 - Chitosanase activity assay

Chitosanase activity was assayed by using a 0.2% chitosan solution substrate (w/w) in 50.0 mM of sodium acetate/acetic acid buffer (pH 5.6). The released reducing sugars in 20 min at 54 °C was measured by Somogyi and Nelson method (Spiro, 1966). One unit of chitosanase activity (U) is defined as the amount of enzyme that produces 1 µmol of reducing sugars measured as D-glucosamine equivalent per minute at given assay conditions.

2.4 - Determination of protein

Determination of total protein was carried out according to the Sedmak and Grossberg (1977) modified method, which is based on the drop in absorbance at 595 nm compared to the maximum dye absorbance recorded (465 nm) due to protein-dye binding. Using the modified method, one hundred microlitres of the sample (or any value up to 1500 µl) was added to 1400 µl (or any value depending on sample volume) of water and 1500 µl of Coomassie blue solution in a cuvette.

Then, the contents of the cuvette were mixed well and the A_{595}/A_{465} ratio was recorded using a spectrophotometer (UV/VIS 911A, GBC Scientific Equipment, Victoria, Australia). A A_{595}/A_{465} protein curve had previously been obtained for several protein contents using Bovine Serum Albumin (BSA) as the standard protein.

2.5 - Adsorbent

Streamline™ SP, a strong cation exchanger, was purchased from Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). Streamline™ SP particles are spherical, with a particle density of 1180 kg.m^{-3} and a particle size of $194.5 \text{ }\mu\text{m}$, composed of a crystalline quartz core covered by 6% cross-linked agarose.

2.6 - Experimental Setup

2.6.1 - Batch uptake

The rates of unclarified and clarified chitosanase fermentation broth uptake were measured using Erlenmeyers in a shaker. At the beginning, unclarified chitosanase fermentation broth had its pH equilibrated to pH 6.9 using Tris/HCl (100 mM, pH 6.9). Next unclarified chitosanase fermentation broth was diluted in order to obtain the same conductivity of the equilibrating buffer (about 8.4 mS/cm), then in order to obtain the clarified chitosanase fermentation broth, aliquots were centrifuged using a MR 18.12 Jouan Centrifuge at 10000 rpm for 10 min. At the next step, 1.0 ml of Streamline™ SP, previously equilibrated in Tris/HCl (100 mM, pH 6.9), was poured into the Erlenmeyers containing 18.0 ml of both unclarified and clarified chitosanase broth. Hence, these Erlenmeyers were shaken at 25° C and supernatant samples were drawn along the time in order to assay both protein and activity levels. A mass balance was carried out to determine the chitosanase uptake onto Streamline™ SP.

2.6.2 - Equipment

An acrylic custom made column (2.5 cm in inner diameter, 25.0 cm in height) was fitted with an adjustable piston in order to minimise headspace over the fluidised bed. A perforated distributor was put at the bottom of the column. It was made of stainless steel with five orifices 1.0 mm in diameter giving a 0.8% open area ratio. A 60 μm mesh was used both below the perforated plate distributor and on the inner piston surface in order to avoid loss of adsorbent by backflow or by elutriation, respectively. A ruler was put on the column wall in order to help the bed height record. Figure 1 illustrates a diagram of the column used at this work. The column was coupled to a GradifacTM system (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). This system consists basically of a mixer, a UV monitor, a chart record and a controller as well as a peristaltic pump (P-50), that allows flow rates from 0.1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ to 50.0 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ to be obtained.

2.6.3 - Packed bed experiments

In this experiment the column contained a packed bed of 5.0 cm in height, i.e. a column volume (CV) of 25.0 ml of StreamlineTM SP. The column was equilibrated with 5 CV of Tris/HCl (100 mM, pH 6.9). Both the loading (0.281 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ total protein and 0.048 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ total activity) and the washing steps were carried out at 8.2 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (100 $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$) using 9.0 CV and 2.0 CV, respectively. Linear gradient elution was carried out using 5.0 CV at 4.9 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (60.0 $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$) with Tris/HCl (100.0 mM, pH 6.9) as buffer A and 1.0 M NaCl in Tris/HCl (100.0 mM, pH 6.9) as buffer B.

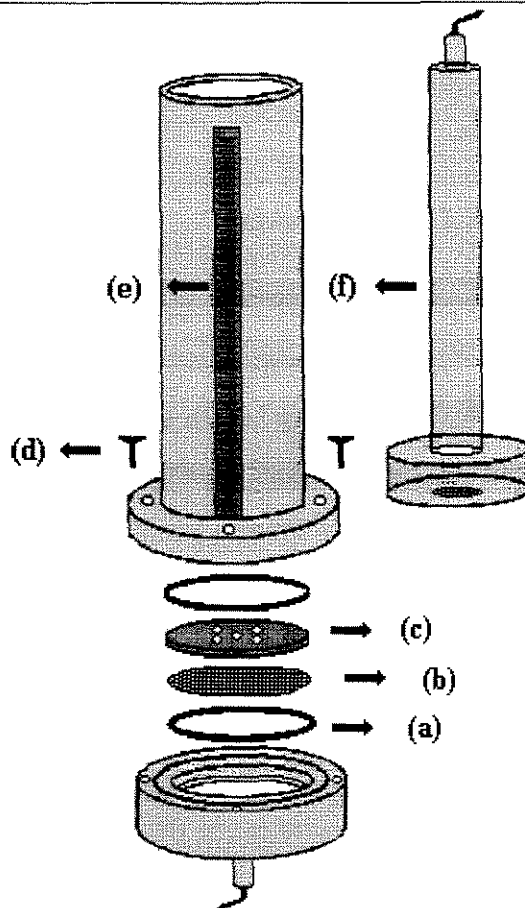


Figure 1 - Drawing of the column used at this work: (a) rubber gasket (b) screen (60 μ m) (c) distributor (perforated plate) (d) screw (e) ruler (f) piston

2.6.4 -Expanded bed experiments with clarified and unclarified chitosanase fermentation broth

In these experiments the column contained a packed bed of 5.0 cm in height ($H_0 = 5.0$ cm, i.e. 25.0 ml) of StreamlineTM SP. Both the loading (0.071 mg.ml⁻¹ total protein and 0.025 U.ml⁻¹ for the experiment without cells and 0.072 mg.ml⁻¹ total protein and 0.022 U.ml⁻¹ for the experiment with cells) and the washing steps were carried out at 8.2 ml.min⁻¹ (100.0 cm.h⁻¹) using 9.0 CV and 2.0 CV, respectively. Linear gradient elution was carried out using 5.0 CV at 4.9 ml.min⁻¹ (60.0 cm.h⁻¹) with Tris/HCl (100.0 mM, pH 6.9) as buffer A and 1.0 M NaCl in Tris/HCl (100 mM, pH 6.9) as buffer B. For the former case, an expansion

degree (H_{EXP}/H_0) of 1.3 was observed while for the latter the expansion degree was 1.4, i.e. the height changed from 5.0 cm (packed bed) to 7.0 cm in the expanded bed mode.

2.6.5 - SDS-PAGE Electrophoresis

SDS electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out in 15% homogeneous gel using Laemmli (1970) buffer system. The molecular mass (M_r) markers were phosphorilase b (94,000), BSA (67,000), ovalbumin (43,000), carbonic anhydrase (30,000), soybean trypsin inhibitor (20,000) and α -lactalbumin (14,400), available as a standard kit (Amershan-Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

3. - RESULTS AND DISCUSSION

3.1 - Batch uptake

Figure 2 shows both unclarified and clarified chitosanase uptake upon StreamlineTM SP. As can be seen in this figure an equilibrium step was reached in half an hour. Chitosanase uptake was slightly reduced when fermentation broth containing cells was used rather than the clarified fermentation broth. At the equilibrium, 0.119 U/ml of adsorbent and 0.133 U/ml of adsorbent were obtained for the unclarified fermentation broth and the clarified fermentation broth, respectively.

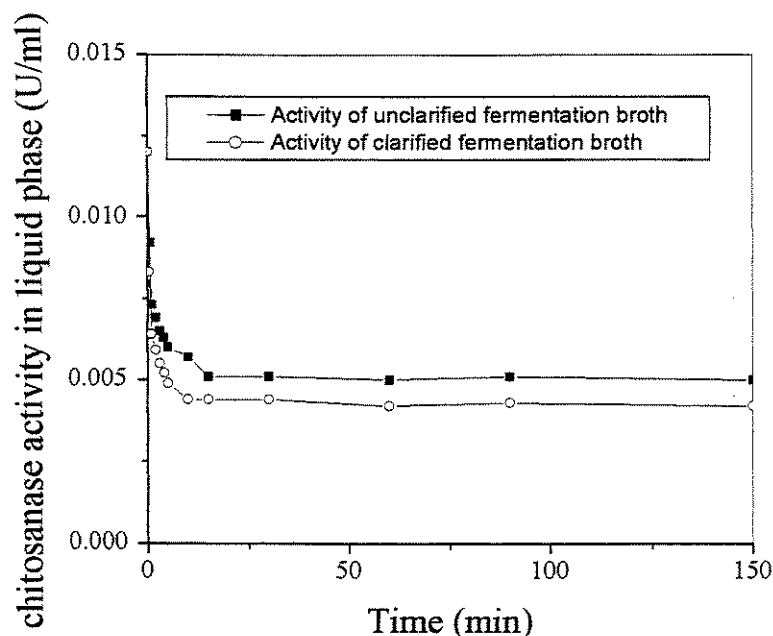


Figure 2 - Unclarified and clarified chitosanase uptake upon Streamline™ SP

3.2 - Packed bed experiments

Experiment was carried out in order to investigate the purification protocol of clarified chitosanase broth onto Streamline™ SP. Figure 3 shows that chitosanase was purified using a linear salt gradient with 5 CV. As shown in Figure 3, a large peak showing chitosanase activity was observed at elution step. This peak eluted with 0.51 M NaCl, i.e. 51% of buffer B (see arrow in Figure 3). Data on chitosanase's isoelectric point (pI) obtained by isoelectric focusing (Piza et al., 1999) showed a value of 8.8. Hence, at the pH 6.9 the enzyme shows a positive charge density, therefore binding strongly to the adsorbent. For this reason was necessary a high salt content to elute the enzyme. Table 1 describes the purification of the clarified chitosanase fermentation broth using a packed bed. As can be seen a 7.6-fold purification factor and a 67.4% yield were obtained for this case. It is important to highlight that the results shown is concerned to all tubes eluted. It can be seen in Table 1 that most protein leaves the column without being adsorbed (5.22 mg at the column exit) at the loading step. However, most of the

chitosanase activity adsorbs upon the adsorbent at this step (8.95 U at the column exit). Comparing the adsorbent capacity in the packed bed (0.293 U.ml⁻¹ of adsorbent (7.31 U eluted using a bed of 25.0 ml (Table 1)) with the value obtained in the batch experiment without cells (0.133 U.ml⁻¹ of adsorbent) it can be seen a 2.2-fold increase in the adsorbent capacity. This result can be explained due to chromatography is a typical multi-stage process while batch uptake is a typical one-step one.

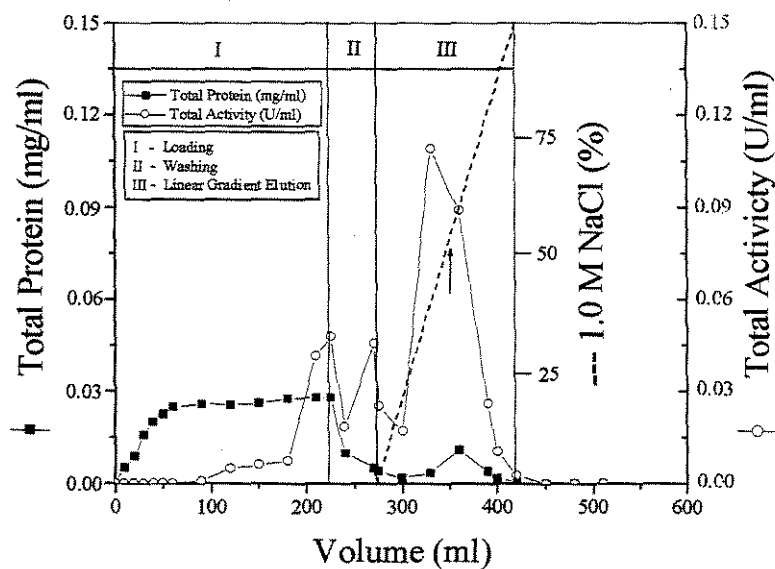


Figure 3 - Purification of clarified chitosanase fermentation broth in packed bed. Dot line represents the salt linear gradient as the percentage of the 1M NaCl solution in Tris/HCl buffer (100 mM, pH 6.9)

Table 1 - Purification of clarified chitosanase fermentation broth in packed bed

Step	Volume (ml)	Protein (mg)	Activity (U)	Sp. Activ. (U/mg)	Purification Factor	Yield (%)
Feedstock	225.0	6.32	10.84	1.71	1.0	100.0
Loading	225.0	5.22	1.89	---	---	---
Washing	50.0	0.54	1.64	---	---	---
Elution	125.0	0.56	7.31	13.05	7.63	67.43

3.3 - Expanded bed experiments with and without cells

Figures 4 and 5 show the clarified and unclarified chitosanase fermentation broth using the bed in the expanded mode. For the clarified chitosanase fermentation broth the peak eluted with 0.59 M NaCl. In this case, a 6.9-fold purification factor with 68.5% yield was obtained (see Table 2). It is important to highlight that the results shown is concerned to all tubes eluted. The adsorbent capacity was only 1.16-fold increased when compared with the batch experiment without cells. For the unclarified chitosanase fermentation broth the peak eluted with 0.57 M NaCl. A 6.87-fold purification factor with 67.93% yield was obtained using such condition (see Table 3). The adsorbent capacity was only 1.15-fold increased when compared with the batch experiment with cells.

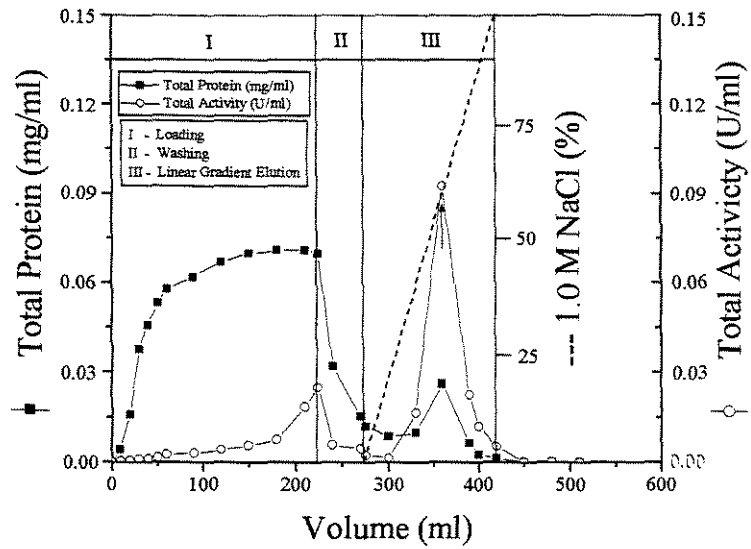


Figure 4 - Purification of clarified chitosanase fermentation broth in expanded bed. Dot line represents the salt linear gradient as the percentage of the 1M NaCl solution in Tris/HCl buffer (100 mM, pH 6.9)

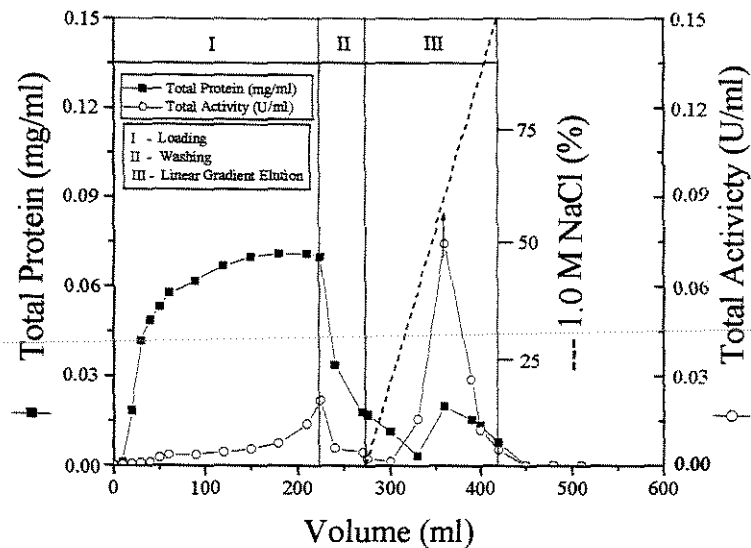


Figure 5 - Purification of unclarified chitosanase fermentation broth in expanded bed. Dot line represents the salt linear gradient as the percentage of the 1M NaCl solution in Tris/HCl buffer (100 mM, pH 6.9)

Table 2 - Purification of clarified chitosanase fermentation broth in expanded bed

Step	Volume	Protein	Activity	Sp. Activ.	Purification	Yield
	(ml)	(mg)	(U)	(U/mg)	Factor	(%)
Feedstock	225.0	16.08	5.62	0.35	1.0	100.0
Loading	225.0	12.94	1.30	---	---	---
Washing	50.0	1.54	0.47	---	---	---
Elution	125.0	1.60	3.85	2.41	6.89	68.50

Table 3 - Purification of unclarified chitosanase fermentation broth in expanded bed

Step	Volume	Protein	Activity	Sp. Activ.	Purification	Yield
	(ml)	(mg)	(U)	(U/mg)	Factor	(%)
Feedstock	225.0	16.20	5.02	0.31	1.0	100.0
Loading	225.0	12.96	1.23	---	---	---
Washing	50.0	1.64	0.38	---	---	---
Elution	125.0	1.60	3.41	2.13	6.87	67.93

Comparing the three cases, it can be seen that reasonable values for both purification factor and yield were obtained overall. Just a slight reduction in yield was obtained when the bed was operated in the expanded bed mode rather than in the packed bed one. SDS-Electrophoresis gel showed that two bands were present in the tube showing the highest activity (see Figure 6), in this case the bed was operated in an expanded mode. This fact suggests three possibilities, namely, the

existence of two chitosanases, the existence of a contaminant protein or the existence of a chitosanase with two sub-units. It can be seen in Figure 6 that a reasonable purification was obtained, in just one step, with the most contaminants separated from the chitosanase.

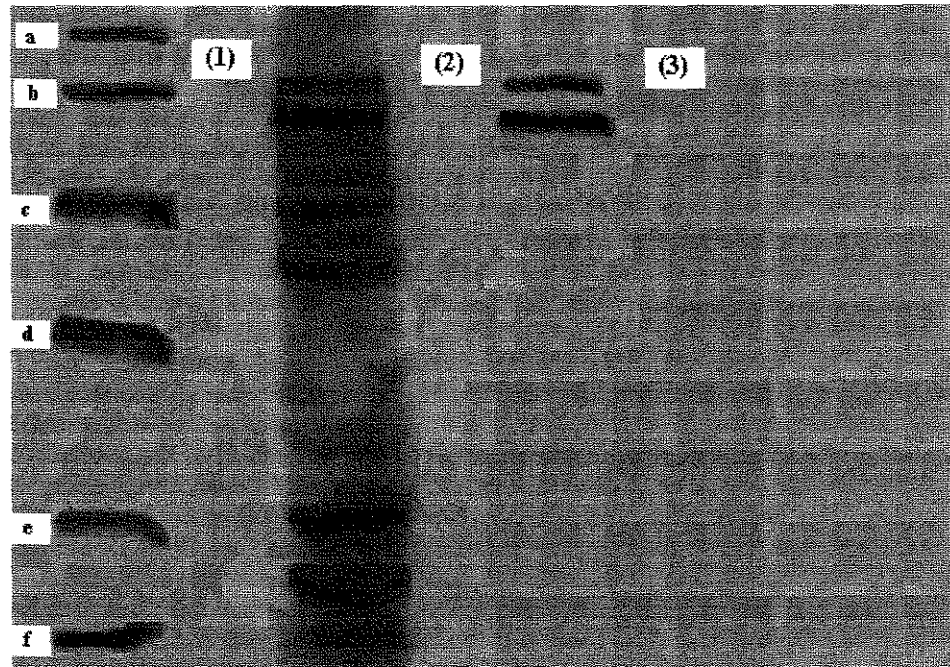


Figure 6 - SDS page stained with Coomassie blue for the peak of chitosanase. (1) markers, (2) feedstock (chitosanase fermentation broth), (3) peak of chitosanase activity. (a) phosphorilase b (94,000), (b) BSA (67,000), (c) ovalbumin (43,000), (d) carbonic anhydrase (30,000), (e) soybean trypsin inhibitor (20,000) and (f) α -lactalbumin (14,400)

4. - CONCLUSIONS

A purification process for a chitosanase fermentation broth using a strong cationic exchanger was showed. Batch uptake experiment showed that equilibrium step was reached in half an hour. A 0.119 U/(ml of adsorbent) and a 0.133 U/(ml of adsorbent) adsorbent capacities were obtained for the unclarified fermentation broth and the clarified fermentation broth, respectively.

Packed bed purification using clarified chitosanase fermentation broth allowed to obtain a chitosanase peak with a 7.63-fold purification factor and a 67.43% yield that eluted with 0.51 M NaCl. Adsorbent capacity was 2.2-fold higher than the adsorbent capacity obtained for the batch uptake using the clarified fermentation broth.

Expanded bed purification using clarified chitosanase fermentation broth showed a 6.9-fold purification factor and a 68.5% yield with the peak eluting at 0.59 M NaCl. Adsorbent capacity was only 1.16-fold increased when compared with the batch experiment without cells. Expanded bed purification using unclarified chitosanase fermentation broth showed a chitosanase peak with a 6.87-fold purification factor and a 67.93% yield. In this situation, the adsorbent capacity was only 1.15-fold increased when compared with the batch experiment with cells. An experiment in expanded mode showed that two bands were present in the peak showing the highest activity. This fact suggests three possibilities, the existence of two chitosanases, the existence of a contaminant protein or the existence of a chitosanase with two sub-units. However, it was possible to separate most of contaminants using just one step.

Acknowledgements

Authors thank FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) and CNPq for financial support.

References

- Abdel-Aziz, S. M. (1999) *Jour. of Basic Microbiol.* 39, n. 2, 79-87
- Ak, O., Bakir, U., Guray, T. (1998) *Biochemical Archives* 14, 221-225
- Boucher, I., Dupuy, A., Vidal, P., Neugebauer, W. A., Brzezinski, R. (1992) *Appl. Microbiol. Biotech.* 38, 188-193

Chang, Y. K., Chase, H. A. (1996a) *Biotech. Bioeng.* 49, 204-216

Chang, Y. K., Chase, H. A. (1996b) *Biotech. Bioeng.* 49, 512-526

Fink, D., Boucher, I., Denis, F., Brzezinski, R. (1991) *Biotechnol. Lett.* 13, n. 12, 845-850

Gooday, G. W. (1990) *Biodegradation* 1, 177-190

Hamilton, G. E., Luechau, F. S., Burton C., Lyddiatt A. (2000) *Jour. of Biotech.* 79, 103-115

Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227, 680-685

Lee, H-W., Choi, J-W., Han, D-P., Park, M-J., Lee, N-W., YI, D-H. (1996) *Jour. of Microbio. Biotech.* 6, n. 1, 19-25

Muzzarelli, R. A. A. (1993) *Carbohydr. Polym.* 20, 7-16

Pelletier, A., Sygusch, J. (1990) *Appl. Environm. Microbiol.* 56, n. 4, 844-848.

Piza, F. A. T, Siloto, A. P., Carvalho, C. V., Franco, T. T. (1999) *Brazil. Jour. of Chem. Eng.* 16, n. 2, 185-192

Sadana, A., Beelaram, A. M. (1994) *Bioseparation* 4, 221-235

Santos, E. S., Guirardello, R., Franco, T. T. (2000) In: *Ion Exchange at the Millenium (proceedings of IEX 2000)*, ed. by Greig, J. A., SCI press, London, 408p.

Sedmak, J. J., Grossberg, S.E. (1977). *Anal. Biochem.* 79, 544-552

Shimosaka, M., Nogawa, M., Ohno, Y., Okazaki, M. (1993). *Biosci. Biotech. Biochem.* 57, n. 2, 231-235

Spalding, B. J. (1991). *Bio/Technol.* 9, 229-233

Spiro, R. G. (1966). In: *Methods in Enzimology VIII (Complex Carbohydrates)*, ed. Neufeld, E. F., Ginsburg, V., Academic Press Inc., New York, 759 p.

Stoyachenko, I. A., Varlamov, V. P., Davankov, V. A. (1994) *Carbohydrate Polymers* 24, 47-54

Thömmes, J., Halfar, M., Lenz, S., Kula, M-R. (1995) *Biotech. Bioeng.* 45, 205-211

Yamasaki, Y., Fukumoto, I., Kumagai, N., Ohta, Y., Nakagawa, T., Kawamukai, M., Matsuda, H. (1992) *Biosci. Biotech. Biochem.* 10, 1546-1551

CONCLUSÕES

O estudo da influência do uso de dois diferentes distribuidores, poroso e do tipo prato perfurado, na adsorção em leito expandido de duas proteínas modelo, lisozima e BSA, usando a resina de troca catiônica Streamline® SP mostrou que:

O adsorvente comercial Streamline® SP têm uma distribuição de tamanho de partícula suficiente para que o leito apresente o fenômeno da segregação.

Para ambos os distribuidores a expansão do leito se ajustou bem à correlação de Richardson e Zaki, porém, os parâmetros da expansão obtidos experimentalmente se aproximaram mais do valor teórico usando o distribuidor do tipo prato perfurado.

Maiores capacidades dinâmicas de operação foram obtidas para o distribuidor do tipo prato perfurado mostrando que o distribuidor é realmente um fator importante na ALE.

O uso de três adsorventes, um pelicular e dois adsorventes porosos (Streamline e Macrosorb) usados para adsorver a enzima intracelular gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, mostrou que o primeiro adsorvente apresenta melhor desempenho com relação à cinética de adsorção e hidrodinâmica. Nesse caso, foi possível adsorver 1.273 U/ml de adsorvente, com uma altura de prato teórico (N) igual a 55,5. Quando comparado com os dois adsorventes porosos (Streamline e Macrosorb) a resistência à transferência de massa parece ser reduzida. Os três adsorventes se ajustaram bem a isoterma de Langmuir. O uso de um processo integrado permitiu recuperar e purificar enzima intracelular gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase em uma única etapa.

O estudo da influência da altura do leito empacotado na adsorção em leito expandido, para o sistema BSA- Streamline® SP e lisozima- Streamline® DEAE mostrou que:

O uso de um leito empacotado com 0,050 m de altura, usando um distribuidor do tipo prato perfurado com fração de área livre de 0,8%, mostrou que o leito apresenta uma expansão não linear, porém, o uso de uma altura de leito empacotado de 0,075 m é suficiente para que uma expansão linear seja obtida. Tal altura de leito é também mais favorável com relação a eficiência da capacidade dinâmica à 10% da curva de ruptura.

Os maiores valores para o parâmetro B foram de 60% (para uma velocidade linear de 250,0 cm/h) e 25% (para uma velocidade linear de 150,0 cm/h) obtidos para os sistemas lisozima- Streamline[®] DEAE e BSA- Streamline[®] SP, respectivamente. Para o sistema lisozima- Streamline[®] DEAE, o aumento da velocidade forneceu maiores valores para B, quando uma altura de leito empacotado de 0,075 m foi usada. Para o sistema BSA- Streamline[®] SP este fato não foi observado, além disso a transferência de massa foi limitada devido a menor densidade de carga da BSA nas condições utilizadas, conduzindo a menores valores de B.

Com relação ao estudo da presença de um alto conteúdo de células no leito, usado um extrato comercial da enzima xilanase, só foi possível purificar uma das duas iso-enzimas presentes no extrato, usando o leito fixo. Nesse caso, foi obtido um fator de purificação de 30,0 com um rendimento de 21,8% para o pico puro e um fator de purificação de 4,7 com um rendimento de 66,5% para o segundo pico. Para o experimento que utilizou o leito expandido sem a presença de células foi possível obter um fator de purificação de 13,8 com uma recuperação de 21,8% para o primeiro pico e um fator de purificação de 3,2 com um rendimento de 23,7% para o segundo pico. Entretanto, quando se operou em leito expandido com uma alimentação contendo de 5% de células (peso úmido) de *Bacillus pumillus* o desempenho de purificação foi comprometido.

Com relação ao uso da ALE para a recuperação e purificação de um caldo de fermentação de *Bacillus cereus* foi observado que:

Em batelada o equilíbrio foi alcançado em meia hora, ambos para o caldo de fermentação com e sem células, com uma pequena redução na capacidade de

adsorção do adsorvente quando se utilizou o caldo de fermentação contendo células.

O processo de purificação em leito fixo, usando um caldo clarificado de fermentação contendo quitosanase, permitiu a obtenção de um pico mostrando atividade quitosanolítica com um fator de purificação de 7,6 e uma recuperação de 67,4%, sendo que o pico eluiu com uma concentração de aproximadamente 0,5 M de Cloreto de Sódio. Foi observado também um aumento da capacidade de adsorção, do adsorvente, de aproximadamente 2 vezes maior que a obtida em batelada.

O processo de purificação em leito expandido usando caldo clarificado de fermentação permitiu a obtenção de um pico apresentando atividade quitosanolítica com uma fator de purificação de 6,9 e uma recuperação de 68,5%, sendo que o pico eluiu com uma concentração de aproximadamente 0,6 M de Cloreto de Sódio. Nesse caso, a capacidade de adsorção do adsorvente foi aproximadamente 1,2 vezes maior que a obtida em batelada.

O processo de purificação em leito expandido usando caldo de fermentação bruto mostrou comportamento similar àquele usando o caldo clarificado. O mesmo permitiu a obtenção de um pico apresentando atividade quitosanolítica com uma fator de purificação de 6,9 e uma recuperação de 67,9%, com a capacidade de adsorção do adsorvente aproximadamente 1,1 vezes maior que a obtida em batelada.

Eletoforese em gel de poliacrilamida de uma amostra retirada do tubo que apresentou a maior atividade quitosanolítica mostrou a existência de duas bandas. Este fato sugere a existência de duas quitosanasas, a presença de uma proteína contaminante ou a existência de uma única quitosanase composta por duas sub-unidades (dímera). Entretanto, foi possível separar a quitosanase da maior parte dos contaminantes em uma única etapa.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Sugere-se os seguintes tópicos para trabalhos futuros:

- Estudar o sistema operando com mais uma coluna acoplada (colunas em série), para aumentar os rendimentos globais da proteína alvo.
- Realizar uma análise econômica para ver quanto pode ser economizado em um processo substituindo a etapa de clarificação pela ALE.
- Modelagem dos dados obtidos nesse trabalho.

ANEXO

EXPANSÃO DE RESINAS USADAS PARA ADSORÇÃO EM LEITO EXPANDIDO

E. S. SANTOS¹; R. GUIRARDELLO²; T. T. FRANCO²

¹ Aluno de pós graduação do DPQ/FEQ/UNICAMP

² Professor do DPQ/FEQ/UNICAMP

Faculdade de Engenharia Química - UNICAMP

Caixa Postal: 6066 - Campinas – SP- CEP: 13081-970

Tel.: (019) 788-3966 Fax : (019) 239-4717

e-mail: franco@feq.unicamp.br

Artigo publicado nos Anais do XXVI Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados (XXVI ENEMP), realizado na cidade de Teresópolis/RJ em 1998.

RESUMO -- Neste trabalho é realizado um estudo do grau de expansão do leito contendo resina de troca iônica, específica para a purificação de proteínas em leito expandido, Streamline® SP e Streamline® DEAE, trocadoras de cátions e ânions, respectivamente. Os resultados mostraram que as resinas apresentam uma distribuição de tamanho de partículas suficiente para produzir um leito classificado (segregado). A expansão do leito, usando água deionizada, tampão tris/HCl (pH =8,0) e acetato/ácido acético (pH = 4,2), ambos 0,050 M, mostrou que as resinas se ajustam bem à equação de Richardson e Zaki, com (U_T) variando de 0,256 a 0,407 cm/s e (n) de 2,3 a 4,2 .

INTRODUÇÃO

Os processos atuais de extração e purificação de proteínas intracelulares envolvem pelo menos uma etapa de filtração ou centrifugação para a remoção do material particulado (McCreath et al., 1995; Thommes et al., 1995; Chang e Chase, 1996; Karau et al., 1997). Técnicas alternativas que permitam eliminar as etapas iniciais de retirada do material têm sido alvo de estudos, principalmente pela necessidade de redução dos custos de purificação de biomoléculas, os quais podem assumir até 80% do custo total da sua produção (Spalding, 1991).

Existem no mercado algumas resinas adsorventes de troca iônica, Streamline® SP e Streamline® DEAE, trocadoras de cátions e ânions, respectivamente, especialmente manufaturadas para serem aplicadas aos leitos expandidos por possuírem uma maior densidade e uma ampla distribuição de tamanhos, possibilitando assim uma expansão mais estável (Karau et al., 1997).

Chang e Chase (1996) enfatizam a importância do conhecimento das características da expansão do leito como etapa inicial de sua operação; deve-se conhecer por exemplo, como a altura do leito expandido varia com a vazão do

líquido e como a expansão é afetada pelas propriedades físicas do líquido aplicado.

No presente trabalho, faz-se uma abordagem da expansão do leito, como etapa inicial de um projeto que utilizará a adsorção em leito expandido (ALE) para a recuperação e purificação de enzimas.

Adsorventes

Os adsorventes utilizados são constituídos por uma matriz macroporosa de agarose, com 6% de ligações cruzadas, incorporando um núcleo de quartzo que lhes conferem uma distribuição de tamanho de partículas e densidade própria para aplicação em leitos expandidos. Streamline® SP possui o grupo sulfapropil ($-O-CH_2CHOHCH_2O-CH_2CH_2CH_2SO_3^-$), que é um forte trocador de cátions. Streamline® DEAE possui um grupo que lhe confere o caráter de um fraco trocador de ânion, o dietilaminoetil ($-O-CH_2CH_2-N^+(C_2H_5)_2H$). Segundo o fabricante, ambos adsorventes possuem uma faixa de tamanho entre 100 - 200 μ m e estabilidade de pH na faixa de 2-11.

Leito Expandido

A principal característica de um leito expandido é a possibilidade de combinar as propriedades hidrodinâmicas de um leito fluidizado com as propriedades cromatográficas de um leito fixo ocasionado pelo fenômeno da classificação (segregação). Os adsorventes utilizados nos processos cromatográficos, na sua grande maioria, não são constituídos por partículas uniformes, porém apresentam uma distribuição de tamanhos de partículas. Então, tais leitos estão sujeitos a classificação (segregação) que ocorre quando as partículas presentes no leito diferem em tamanho ou densidade (Wen e Yu, 1966). Nessa situação, as partículas menores ou menos densas situam-se na parte superior do leito, enquanto as maiores ou mais densas predominam na região inferior. Essa segregação restringe a mobilidade das partículas, de tal forma que em casos extremos, o leito apresenta camadas de partículas que estão estritamente

separadas. Wen e Yu (1966) definem como condição para a existência de um leito classificado que a razão de tamanho seja maior que 1,3 ($d_B/d_S > 1,3$).

Estabilidade: A estabilidade de um leito pode ser verificada de três formas: através da observação visual; medindo o grau de expansão (H/H_0), ou seja, a razão entre a altura do leito expandido e a altura do leito fixo para uma determinada vazão; determinando a distribuição do tempo de residência (DTR) (Amersham Pharmacia Biotech, 1997).

Expansão do leito

A expansão dos leitos fluidizados é caracterizada pela clássica equação de Richardson e Zaki (1954), dada na forma:

$$U = U_T \varepsilon^n \quad (1)$$

A equação (1) relaciona a velocidade superficial do fluido (U) com a velocidade terminal de uma partícula isolada em um fluido infinito (U_T), a porosidade do leito (ε) e um coeficiente (n), conhecido como coeficiente de Richardson e Zaki, sendo (n) função do número de Reynolds da partícula (Re_P). A principal informação que esta equação nos fornece é que a velocidade terminal de uma partícula isolada é reduzida pela presença de outras.

A velocidade terminal de uma partícula isolada (U_T) no regime de Stokes ($Re_P < 0,1$) é dada por:

$$U_T = \frac{g d_P^2 (\rho_P - \rho_L)}{18\mu} \quad (2)$$

sendo Re_P dado por:

$$\text{Re}_p = \frac{d_p \rho U}{\mu} \quad (3)$$

Pode-se determinar a velocidade terminal de uma partícula isolada (U_T) experimentalmente e o coeficiente de Richardson e Zaki (n) para um dado leito, se forem conhecidos os valores da porosidade para uma dada velocidade do fluido. Aplicando o logaritmo nos dois lados da equação (1) obtém-se uma relação linear entre a velocidade superficial do fluido (U) e a porosidade do leito (ε) na forma:

$$\text{Log } U = \text{Log } U_T + n \text{Log } \varepsilon \quad (4)$$

sendo o coeficiente angular igual a (n) e o coeficiente linear igual a logaritmo de U_T .

A porosidade do leito, ou fração de vazios, é dada por:

$$\varepsilon = 1 - \frac{V_s}{V_L} = 1 - \frac{V_s}{A_T H} \quad (5)$$

Na Tabela 1 são apresentados alguns valores da velocidade terminal (U_T) e do coeficiente de Richardson e Zaki (n) para os dois adsorventes Streamline® SP e Streamline® DEAE existentes na literatura.

Tabela 1 – Velocidade terminal (U_T) e (n) para as resinas existentes na literatura

Autor	Resina	d_p (μm)	ρ_p (kg/m^3)	ρ_L (kg/m^3)	Fluido	D_c (m)	FAL (%)	U_T (cm/s)	n
De Luca	DEAE	185,0	1220,0	1000,0	água	0,050	0,13	0,231	3,55
et al. (1994)							0,29	0,240	3,97
							*	0,295	4,9
Chang e Chase (1996)	SP	247,0	1143,0	1004,0	tampão acetato de sódio (100 mM) pH=5,0	0,050	---	0,44	4,71

* - Distribuidor poroso

MATERIAIS E MÉTODOS

Caracterização das Partículas

Diâmetro: A distribuição granulométrica das resinas, Streamline® SP e Streamline® DEAE foi determinada no Instituto de Pesquisa Tecnológicas (IPT/SP) usando a técnica de difração por raios laser utilizando um Malvern Mastersizer/E. As distribuições granulométricas das resinas são apresentadas nos resultados e discussões.

Densidade: As densidades das resinas foram obtidas por picnometria usando água como meio fluido. Os testes foram realizados em triplicata à temperatura ambiente.

Esfericidade: Para as resinas usadas neste trabalho foram utilizadas as informações do fornecedor que afirma se tratar de esferas ($\phi = 1,0$).

Propriedades do fluido

Foram utilizados três fluidos, água deionizada, tampão tris/HCl (pH = 8,0) e acetato de sódio/ácido acético (pH = 4,2) ambos 0,050 M.

Densidade: As densidades dos fluidos foram determinadas à temperatura de 25 °C, pesando-se um volume conhecido da solução, os valores obtidos foram: água deionizada ($\rho_L = 997,0 \pm 2,0 \text{ kg/m}^3$); tampão tris/HCl ($\rho_L = 1015,0 \pm 7,0 \text{ kg/m}^3$); tampão acetato/ácido acético ($\rho_L = 1008,0 \pm 6,0 \text{ kg/m}^3$).

Viscosidade: As viscosidades das soluções foram determinadas através de um viscosímetro tipo Cannon-Fenske (50 X537) à temperatura de 25 °C, os valores obtidos foram: água deionizada ($\mu = 0,9023 \pm 0,0045 \text{ mPa}$); tampão Tris/HCl ($\mu = 0,9355 \pm 0,052 \text{ mPa}$), e para o tampão acetato/ácido acético ($\mu = 0,9977 \pm 0,0105 \text{ mPa}$).

Procedimento experimental

Os experimentos foram realizados em uma coluna cilíndrica de acrílico de seção circular de 0,025 m de diâmetro interno (d.i) e 0,250 m de altura. A coluna possui um pistão que possibilita variar a altura interna do leito. Na base da coluna existe uma placa distribuidora em aço inoxidável do tipo multi-orifício com uma fração de área livre (FAL) de 0,8% que foi usada para expandir o leito. Acima da placa distribuidora e na base do pistão existe uma tela com malha de 400 mesh que evita a saída das partículas pelos orifícios do distribuidor ou devido a elutriação. Uma bomba tipo pistão (P-50) foi utilizada para bombear a solução para o leito, a vazão da bomba era controlada pelo sistema do GradiFrac® (Amersham Pharmacia Biotech).

Na parede da coluna foi anexada um escala para medir a expansão do leito.

A Figura 1 mostra um esquema do arranjo experimental utilizado.

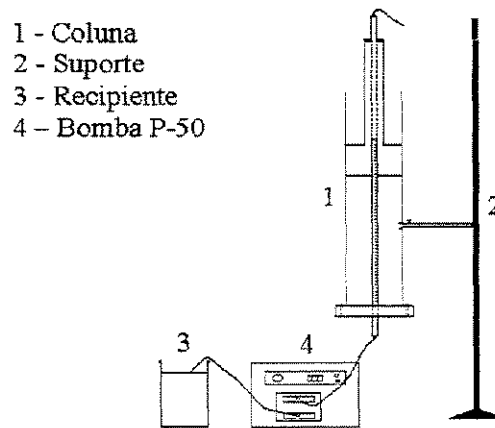


Figura 1 – Arranjo experimental

As vazões utilizadas nos experimentos foram de 3; 6; 9; 12; 15; 18 e 21 ml/min que correspondem às velocidades superficiais de 0,0102; 0,0204; 0,0305; 0,0407; 0,0509; 0,0611 e 0,0713 cm/s, respectivamente.

No início de cada experimento, foram colocadas quantidades conhecidas da resina, previamente embebida com o fluido. Esperava-se que a resina sedimentasse e a altura do leito correspondente era anotada. Em seguida, aumentava-se gradualmente a velocidade até 1,5 vezes a maior velocidade (0,10695 cm/s = 31,5 ml/min), então reduzia-se a velocidade para o valor desejado, esperava-se que o leito atingisse o regime estacionário, em torno de 15 minutos, e fazia-se a leitura do leito expandido. As leituras das alturas, para as outras velocidades, foram obtidas de forma decrescente.

Os experimentos foram realizados em duplicata e um desvio de 5 a 10% foi observado entre as leituras.

RESULTADOS E DISCUSSÕES**Distribuição de Tamanhos**

As distribuições granulométricas acumulativa e retida das resinas Streamline® SP e Streamline® DEAE são apresentadas nas Figuras 2 e 3, respectivamente. Observa-se que a distribuição das mesmas tende para a uma distribuição do tipo normal, com os diâmetros variando na faixa de 100 a 300 μm , podendo formar assim, um leito classificado, segundo o critério de Wen e Yu (1966).

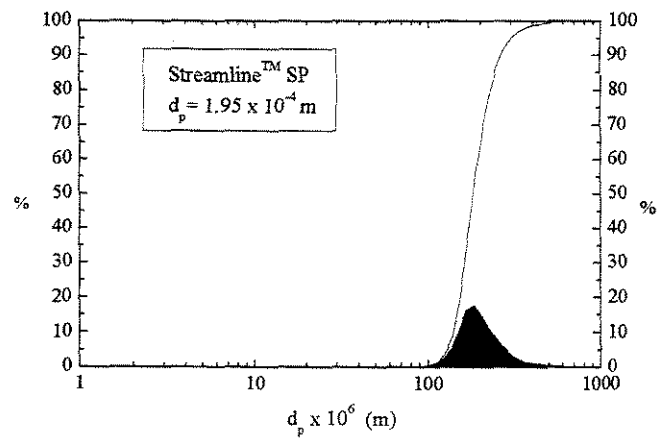


Figura 2 – Distribuição de tamanhos (Streamline® SP)

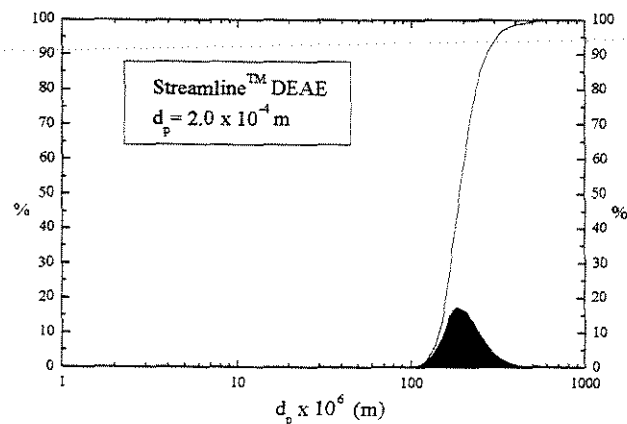


Figura 3 – Distribuição de tamanhos (Streamline® DEAE)

Expansão do leito

Em todos os experimentos realizados os leitos apresentaram, visualmente, uma boa estabilidade sem que nenhum movimento característico de turbilhões fossem observados, embora em alguns deles uma região mais dinâmica próximo ao distribuidor tenha sido notada, isso ocorreu devido ao aumento da velocidade do fluido ao passar pelos orifícios do distribuidor.

Estabilidade: Para os três fluidos utilizados uma grande estabilidade dos leitos foi verificada (Figuras 4, 5 e 6), com o fator de expansão (H/H_0) variando linearmente com a velocidade do fluido, produzindo elevados coeficientes de regressão da reta (R), na ordem de 0,99.

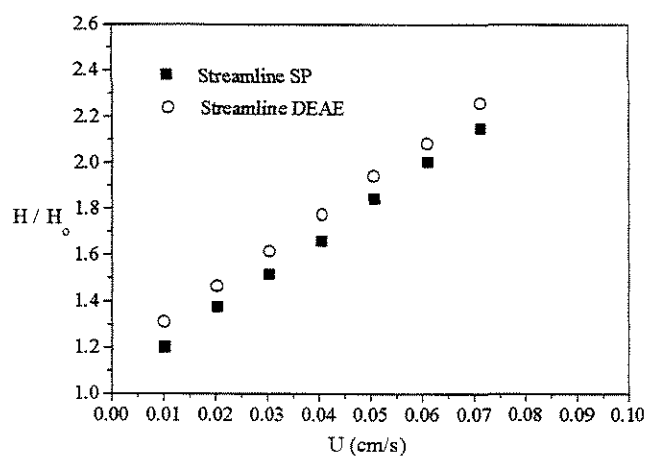


Figura 4 – Água deionizada

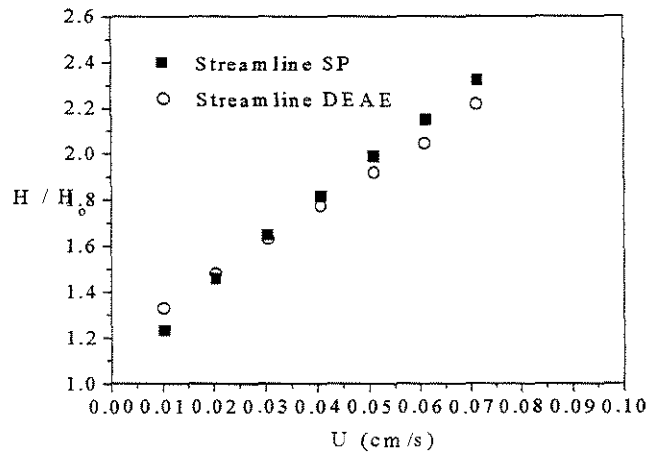


Figura 5 – Tampão Tris/HCl

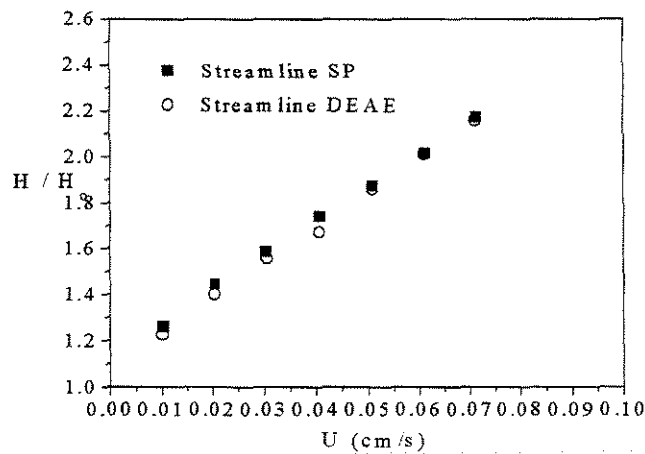


Figura 6 – Tampão acetato/ácido acético

Parâmetros da expansão: Nas Figuras 7, 8 e 9 são mostradas a expansão do leito, obtida na forma de Log de U em função do Log de ϵ . Os valores dos parâmetros, velocidade terminal (U_T) e do coeficiente de Richardson e Zaki (n) são mostrados na Tabela 2, juntamente com os desvios dos valores teóricos calculados a partir da equação (2).

Nestas figuras são observadas a tendência da resina Streamline® SP de expandir mais que a Streamline® DEAE conduzindo à valores maiores do coeficiente de Richardson e Zaki (n)

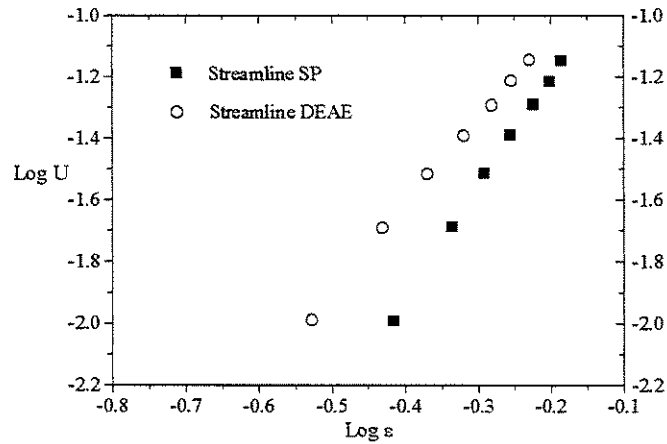


Figura 7 – Expansão em água deionizada

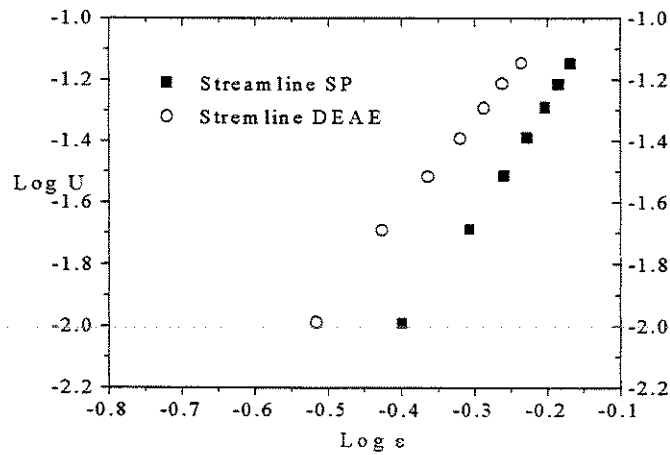


Figura 8 – Expansão em Tris/HCl

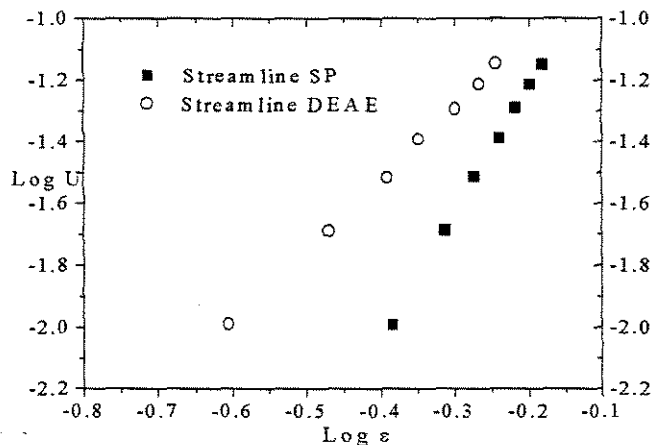


Figura 9 – Expansão Acetato/Ácido acético

Tabela 2 – Parâmetros da Expansão (U_T) e (n)

Resina	d_p (μm)	ρ_p (kg/m^3)	ρ_L (kg/m^3)	μ (mPa)	Fluido	U_T (Teo) (cm/s)	U_T (Exp) (cm/s)	n	Desvio* (%)
			997,0	0,9023	Água	0,309	0,330	3,6	6,80
SP	166,28	1182,0	1015,0	0,9355	Tris/HCl	0,269	0,278	3,6	3,35
			1008,0	0,9977	Acetato	0,263	0,407	4,2	54,75
			997,0	0,9023	Água	0,317	0,316	2,8	-0,31
DEAE	161,7	1198,0	1015,0	0,9355	Tris/HCl	0,279	0,365	3,0	30,82
			1008,0	0,9977	Acetato	0,270	0,256	2,3	5,18

* Desvio relativo: $(U_{EXP} - U_{TEO})/U_{TEO}$

A Tabela 2 mostra que os valores dos coeficientes de Richardson e Zaki (n) para as resinas estudadas apresentam mesma ordem de grandeza que as apresentadas na literatura (Tabela 1), e considerando que nesse trabalho foi utilizado um distribuidor que apresenta características, dada na forma da fração de área livre (FAL), diferentes daqueles distribuidores, assim como diferentes fluidos, as diferenças nos valores calculados de (U_T) e (n) pode ser justificada.

Os valores elevados da velocidade terminal (U_T) obtidas experimentalmente para a resina Streamline® SP – acetato/ácido acético (pH baixo) e Streamline® DEAE – tris/HCl (pH alto) juntamente com os elevados valores de (n) mostram que estes sistemas são ideais para serem aplicados aos leitos fluidizados, principalmente pela elevada expansão. Uma possível explicação para esse comportamento é que por ser um forte trocador de cátions a resina Streamline® SP apresenta maior estabilidade em pH baixo, enquanto que a resina Streamline® DEAE por ser um fraco trocador de ânion é mais estável em pH alto.

CONCLUSÕES

No presente trabalho a expansão de duas resinas utilizadas para a adsorção de proteínas em leito expandido foi investigada. A análise da distribuição granulométrica mostrou que as resinas apresentam uma distribuição de tamanhos de partículas, suficiente para produzir um leito classificado (segregado), sendo portanto ideal para uso em leitos expandidos.

A expansão do leito em três fluidos diferentes mostrou que as resinas Streamline® SP e Streamline® DEAE ajustam-se bem a equação de Richardson e Zaki (1954).

Os valores do coeficiente de Richardson e Zaki (n) e da velocidade terminal da partícula (U_T) apresentaram mesma ordem de grandeza que os valores existentes na literatura.

O pH do fluido utilizado para expansão do leito parece interagir com a distribuição de carga na superfície do adsorvente alterando a característica da expansão.

NOMENCLATURA

A_T	Área transversal da coluna (L^2)
D_C	Diâmetro da coluna (L)
d_B	Diâmetro das partículas maiores (L)
d_P	Diâmetro das partículas (L)
d_S	Diâmetro das partículas menores (L)
FAL	Fração de área livre do distribuidor (-)
H	Altura do leito expandido (L)
H/H_0	Fator de expansão do leito (-)
H_0	Altura do leito fixo (L)
n	Coefficiente de Richardson e Zaki (-)
R	Coefficiente de regressão da reta (-)
Re_P	Reynolds da partícula (-)
U	Velocidade superficial do fluido (LT^{-1})
U_T	Velocidade terminal de uma partícula isolada (LT^{-1})
V_L	Volume do leito (L^3)
V_S	Volume de sólidos (L^3)

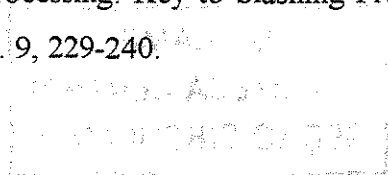
Símbolos gregos

ε	Porosidade do leito (-)
ϕ	Esfericidade das partículas

μ	Viscosidade do fluido ($\text{ML}^{-1}\text{T}^{-1}$)
ρ_L	Densidade do fluido (ML^{-3})
ρ_P	Densidade das partículas (ML^{-3})

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHANG, Y. K.; CHASE, H. A. (1996), “Development of Operating Conditions for Protein Using Expanded Bed Techniques: The Effect on the Degree of Bed Expansion on Adsorption Performance”, *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 49, p. 512-526.
- DE LUCA, L. et al. (1994), “A study of the expansion characteristics and transient behaviour of expanded beds of adsorbent particles suitable for bioseparations”, *Bioseparation*, vol. 4, p. 311-318.
- EBA HANDBOOK: Principles and Methods, Amersham Pharmacia Biotech, ISBN 91-630-5519-8, 160p., 1997.
- KARAU, A. et al. (1997), “The Influence of Particle Size Distribution and Operating Conditions on the Adsorption Performance in Fluidized”, *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 55, p. 54-64.
- McCREATH, G. E. et al. (1995), “Expanded Bed Affinity Chromatography of Dehydrogenases from Baker’s Yeast Using Dye-Ligand Perfluoropolymer Supports”, *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 48, p. 341-354.
- RICHARDSON, J. F.; ZAKI, W. N. (1954), “Sedimentation and Fluidisation: Part I”, *Trans. Inst. Chem. Engs.*, vol. 32, p. 35-53.
- SPALDING, B. J. (1991), “Downstream Processing: Key to Slashing Production Costs 100 Fold”, *Bio/Technology*, vol. 9, 229-240.



THÖMMES, J. et al. (1995), “Hydrodynamics and Performance in Fluidized Bed Adsorption”, *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 48, p. 367-374.

WEN, C. Y.; YU, Y. H. (1966), “Mechanics of fluidization”, *Chemical Engineering Progress Symposium Series*, vol. 62, pg. 100-111.

E. S. Santos agradece à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo/FAPESP pela bolsa concedida.

