

# Influência do caldo enzimático na determinação do diagrama de fases no sistema bifásico aquoso

Siqueira, Eliana Maria Gonçalves Rodrigues de

## Resumo

Enzimas são comuns a todas as células vivas, atuando como catalisadores biológicos. A maioria é obtida a partir de microrganismos devido à grande variedade, simplicidade nutricional e produção em larga escala. Entretanto, o estudo de técnicas visando à redução dos custos de separação torna-se necessário à medida que se deseja obter produtos competitivos. O sistema de duas fases aquosas, principalmente o sistema com PEG (Polietileno Glicol) e sal, tem sido amplamente utilizado nos processos de biosseparação, uma vez que apresentam menor custo e alta capacidade de separação, devido sua seletividade e solubilidade. Este trabalho teve como objetivo verificar a influência da massa molar do PEG e do pH, sobre a constituição das curvas binodais utilizando o caldo enzimático. A metodologia aplicada foi o método de titulação de Bamberger et al. (1985) e Vernou et al. (1990). Através dos resultados pode-se concluir que, em relação a massa molar do PEG, quanto maior o seu valor menor será o valor da concentração necessária para se conseguir a formação das fases, já em relação ao pH, não houve um efeito significativo em relação aos valores estudados.

**Palavras-chave:** enzima, sistema de duas fases aquosas, polietileno glicol.

## Abstract

Enzymes are common to all living cells, acting as biological catalysts. Most are obtained from microorganisms due to the great variety, nutritional simplicity and large-scale production. However, the study of techniques to reduce separation costs becomes necessary as competitive products are desired. The two-phase aqueous system, especially the PEG (Polyethylene Glycol) system and salt, has been widely used in the bioequipment processes, since they have a lower cost and high separation capacity, due their selectivity and solubility. This work aimed to verify the influence of the molar mass of the PEG and the pH, on the constitution of the binodal curves using the enzymatic broth. The methodology applied was the titration method of Bamberger et al. (1985) and Vernou et al. (1990). From the results it can be concluded that, in relation to the molar mass of the PEG, the higher its value the lower the value of the concentration necessary to achieve the formation of the phases, already in relation to the pH, there was not a significant effect in relation to the studied values.

**Keywords:** enzyme, two-phase aqueous system, polyethylene glycol.

## Resumen

Enzimas son comunes a todas las células vivas, actuando como catalizadores biológicos. La mayoría se obtiene a partir de microorganismos debido a la gran variedad, simplicidad nutricional y producción a gran escala. Sin embargo, el estudio de técnicas para la reducción de los costos de separación se hace necesario a medida que se desea obtener productos competitivos. El sistema bifásico acuoso, principalmente el sistema con PEG (Polietileno Glicol) y sal, ha sido ampliamente utilizado en los procesos de

bioseparación, ya que presentan menor costo y alta capacidad de separación, debido su selectividad y solubilidad. Este trabajo tuvo como objetivo verificar la influencia de la masa molar del PEG y del pH. sobre la constitución de las curvas binales utilizando el caldo enzimático. La metodología aplicada fue el método de titulación de Bamberger et al. (1985) y Vernou et al. (1990). A través de los resultados se puede concluir que, en relación con la masa molar del PEG, cuanto mayor sea su valor menor será el valor de la concentración necesaria para conseguir la formación de las fases, ya en relación al pH, no hubo un efecto significativo en relación a los valores estudiados.

**Palabras clave:** enzima, sistema bifásico acuosas, polietileno glicol.

## **INTRODUÇÃO**

Cada vez mais, se torna necessário, o desenvolvimento de método que visem à recuperação de enzimas através de técnica simples e de baixo custo, uma vez que se deseja obter produtos competitivos e viáveis comercialmente, sendo que um dos principais problemas para o processo de obtenção de enzimas é o alto preço da produção.

Desta forma, para obter um “pool” enzimático com alta eficiência e com baixo custo é essencial o desenvolvimento de técnicas de separação não cromatográficas, a fim de se obter frações com maior grau de pureza sem, contudo, onerar o processo. No entanto, enzimas obtidas por processos fermentativos geralmente encontram-se bastante diluídas no meio de cultivo, sendo, a sua separação e purificação um fator crítico em biotecnologia, principalmente pelos altos custos operacionais. Desenvolver processos de purificação simples é um grande desafio, pois devem ser seguros e baratos, além de atingir altos graus de purificação e seletividade (FERREIRA *et al.*, 2014), visto que sistemas de duas fases aquosas podem ser formados quando dois polímeros são dissolvidos juntos acima de certas concentrações.

Segundo o mesmo autor, o processo de separação depende de muitos fatores, como o tipo de polímero utilizado, sua massa molar, a composição iônica e características da substância a ser extraída.

A mais importante característica deste tipo de sistema é que ambas as fases são aquosas (de 85 a 99% de água), permitindo a separação de biomoléculas de diversas origens, em um ambiente que não desnaturam (PESSOA e KILIKIAN, 2005; FREIRE *et al.*, 2012). O método de extração líquido-líquido por duas fases aquosas, apresenta importantes características que consiste em baixo custo e toxicidade, menor valor de tensão interfacial, e alto conteúdo de água que permite um ambiente favorável em que solutos podem ser separados e purificados (ASENJO e ANDREWS, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2013; RENGIFO *et al.*, 2015).

O sistema de duas fases aquosas pode ser facilmente ampliado sem causar mudanças significativas na natureza ou eficiência do processo. Além disso, quando comparada com outras técnicas de recuperação, apresenta diversas vantagens, tais como: operação rápida e contínua, altos rendimentos, fácil ampliação de escala, baixo custo dos materiais, reciclagem dos polímeros, minimização da desnaturação de proteínas e facilidade de separar materiais particulados (SILVA e FRANCO, 2000).

Para utilizar o S DFA (Sistema de Duas Fases Aquosas) é necessário o conhecimento do comportamento das fases no sistema, através dos diagramas de fases para os componentes, nos quais as composições dos constituintes para a separação das fases são determinadas.

Sendo assim, no presente trabalho foram realizados ensaios com o objetivo de se verificar as condições operacionais que podem influenciar na recuperação de enzimas celulolíticas, a partir da técnica de duas fases aquosas, tendo em vista sua simplicidade de execução, baixa ocorrência de desnaturação e a ampla aplicação deste método no fracionamento de proteínas.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Produção de celulas**

Os ensaios foram conduzidos em frasco de *Erlenmeyer*, mantendo 50% de proporção entre o bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo. Para o preparo do meio foi adicionado ao substrato tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8 e 2% de solução nutriente e 0,1% *Tween*. Em seguida foi feita a esterilização em autoclave a 121°C por 20 minutos. Posteriormente, a inoculação do fungo *Trichoderma reesi* e a incubação a 30°C por 72 horas e agitação de 100 rpm em incubadora de agitação orbital (“shaker”).

### **Determinação da atividade enzimática total em papel de filtro**

A atividade foi determinada pelo método de Ghose (1987) adaptado. Foi colocado 1 tira de papel no tubo de ensaio. Adicionou-se 1 mL de tampão citrato de sódio pH 4,8. Os tubos foram deixados em banho-maria a temperatura de 50°C por alguns minutos, adiciona-se 0,5mL do caldo enzimático em cada tubo, e estes foram deixados no banho-maria por 60 minutos, sendo agitados em intervalos de 10 minutos. Foram realizados ensaios em branco substituindo o caldo enzimático por tampão citrato de sódio pH 4,8. Após o término do tempo de inoculação, procedeu-se a determinação do AR e calculou-se a atividade enzimática.

### **Determinação de proteína total**

A proteína total foi determinada pelo método de Biureto (GORNALL et al., 1949). Foi colocado 1 mL da amostra no tubo de ensaio. Adicionou-se 5 mL do reagente de Biureto. Os tubos foram agitados e deixados em repouso por 10 minutos. Foi realizado ensaio em branco, substituindo a amostra por água destilada. Em seguida foi feita a leitura em espectrofotômetro

em 540nm. A curva padrão foi construída usando BSA (Albumina de Soro Bovino) como proteína padrão.

### **Determinação das Curvas binodais**

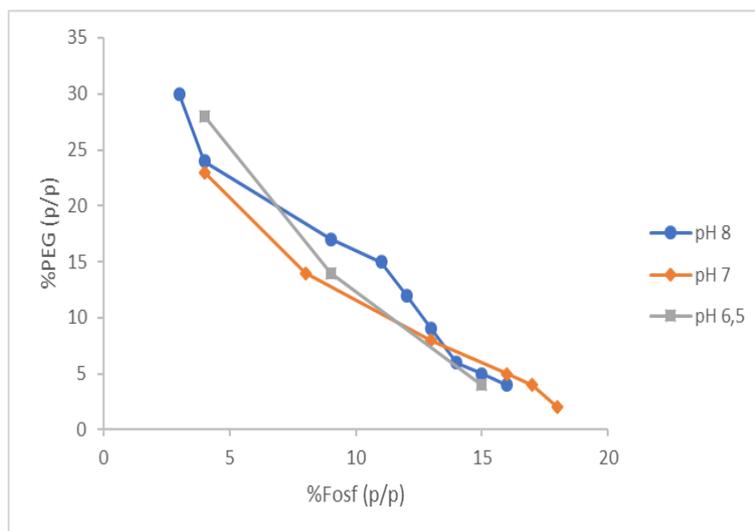
As curvas binodais foram determinadas através do método de titulação (BAMBERGER *et al.*, 1985; VERNAU *et al.*, 1990). Colocou-se um tubo de ensaio sobre uma balança analítica e adicionou-se uma massa conhecida de PEG (aproximadamente 0,5g) e em seguida foi feito a adição gota a gota de tampão fosfato de potássio. O sistema foi agitado manualmente, e o aparecimento da turbidez indicou a passagem do sistema para a região de duas fases. Anotou-se a massa de fosfato adicionada. Em seguida, adicionou-se o caldo enzimático até que a solução se tornasse transparente novamente, indicando o retorno do sistema para a região monofásica. Tornou-se a adicionar solução de fosfato gota a gota sob agitação até atingir a turbidez novamente, esse foi o segundo ponto da curva binodal. Repetiu-se o processo para obter os demais pontos da curva. Com a massa de fosfato e PEG adicionados no tubo e a massa total, foi calculado a composição do sistema e determinado os pontos da curva binodal.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O estudo do diagrama de fases tem como objetivo conhecer o comportamento da enzima no sistema de duas fases aquosas. Lembrando que, a curva binodal demarca a região em que o sistema deixa de ser monofásico e passa a ser bifásico. Composições localizadas na região abaixo da curva formam sistemas com uma fase, enquanto que na região acima, formam sistemas com duas fases.

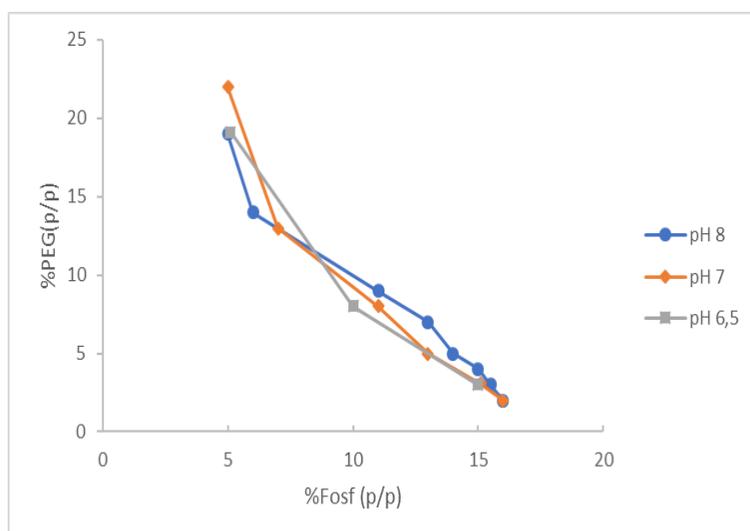
Nas Figuras 1 e 2, estão representados os diagramas de fases referentes aos PEGs com diferentes massas moleculares e valores de pHs utilizando o caldo enzimático. Verifica-se que com a diminuição do pH ocorreu um pequeno deslocamento das curvas binodais para a esquerda. Com estes resultados pode-se perceber, que a influência do pH não apresentou um comportamento esperado, que era o deslocamento mais significativo das curvas, o mesmo resultado foi constatado por Ferreira *et al.* (2009). O mesmo foi observado com os experimentos utilizando água.

Figura 1: Diagrama de fases do sistema de duas fases aquosas PEG 4000/Fosfato de potássio/Enzima em diferentes valores de pH.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 2: Diagrama de fases do sistema de duas fases aquosas PEG 6000/Fosfato de potássio/Enzima em diferentes valores de pH.

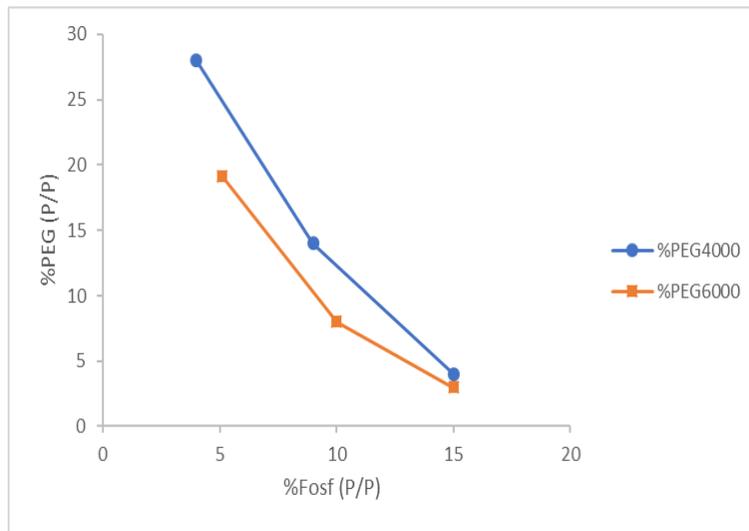


Fonte: Dados da pesquisa.

Em relação à massa molar do PEG, Figuras 3, 4 e 5, observa-se que houve um deslocamento para a esquerda da curva binodal em função do aumento da massa molecular, sendo menor a concentração necessária para a formação de fases. Com estes resultados, é possível afirmar que a quantidade de PEG necessária para formar as duas fases torna-se menor

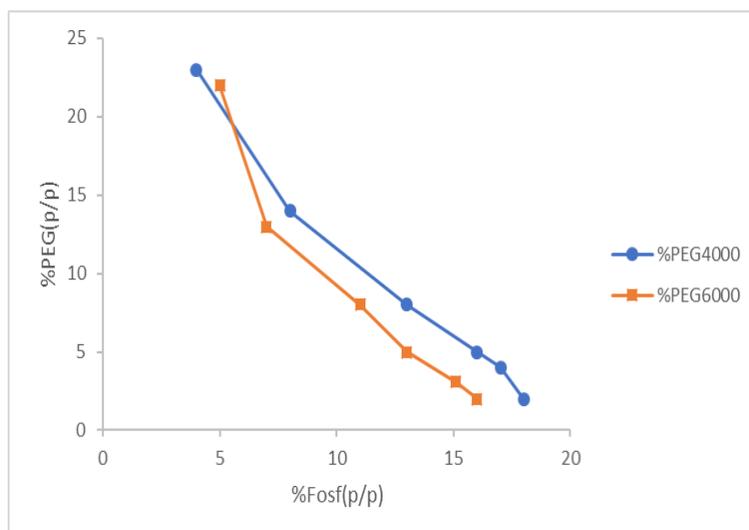
com o aumento da massa molar do PEG, de 4000 para 6000, até um ponto onde não é mais possível formar as duas fases, já que as soluções de PEG e fosfato necessitam de uma quantidade de água mínima para se solubilizarem.

**Figura 3: Diagrama de fases do sistema de duas fases aquosas PEG/Fosfato de potássio/Enzima a pH 6,5.**



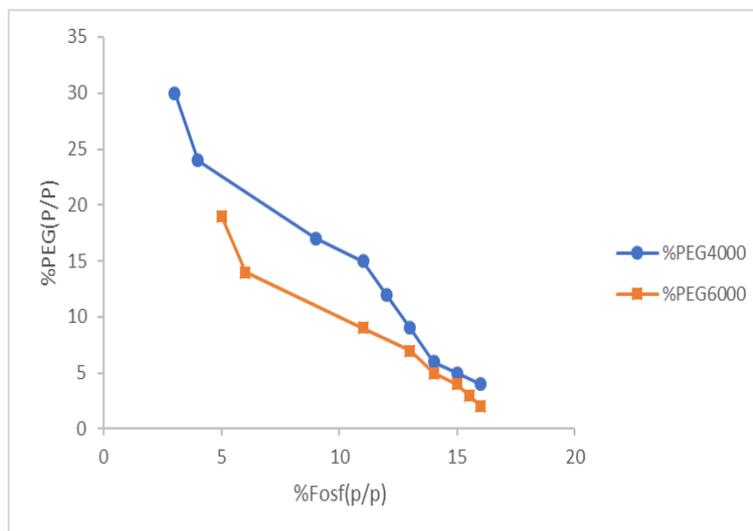
Fonte: Dados da pesquisa.

**Figura 4: Diagrama de fases do sistema de duas fases aquosas PEG/Fosfato de potássio/Enzima a pH 7,0.**



Fonte: Dados da pesquisa.

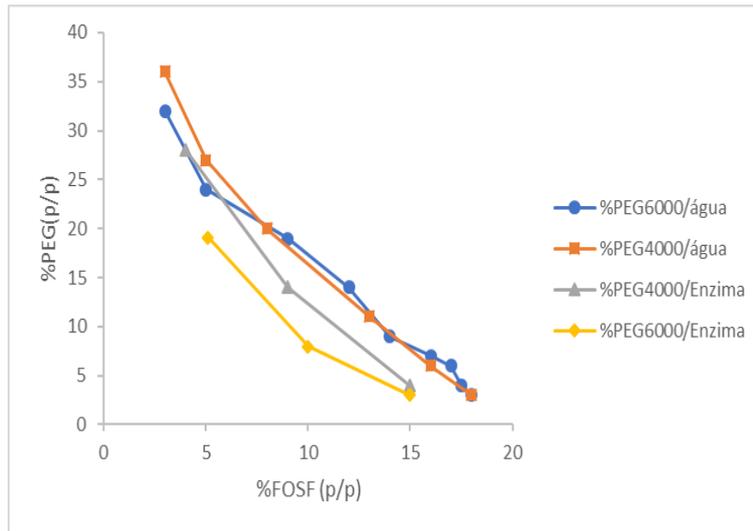
Figura 5: Diagrama de fases do sistema de duas fases aquosas PEG/Fosfato de potássio/Enzima a pH 8,0.



Fonte: Dados da pesquisa.

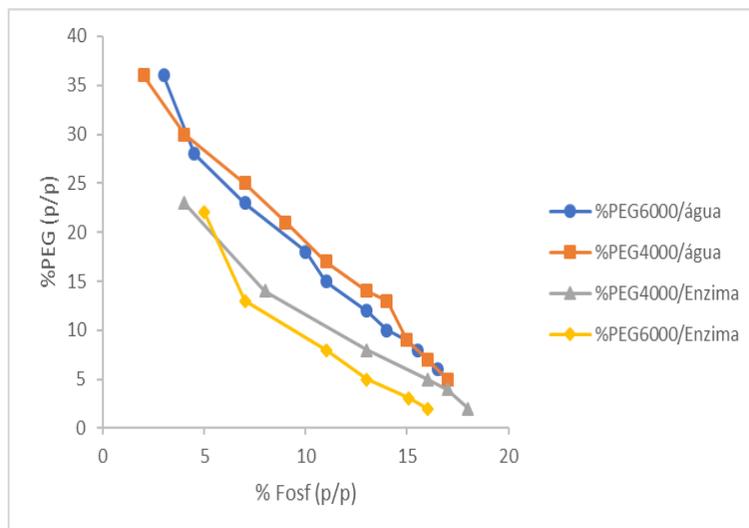
Comparando os resultados utilizando o caldo enzimático em relação ao utilizando a água, Figuras 6, 7 e 8, percebe-se que a curva binodal construída com a enzima deslocou-se para a esquerda. O deslocamento da curva sugere que, os sais ou outros componentes presentes no caldo fermentado, interferem no sistema ampliando assim a região de trabalho em relação ao sistema usando água, conforme descrito por Costa *et al.* (1998).

Figura 6: Diagrama de fases do sistema de duas fases aquosas comparando a utilização da água com a enzima no pH 6,5.



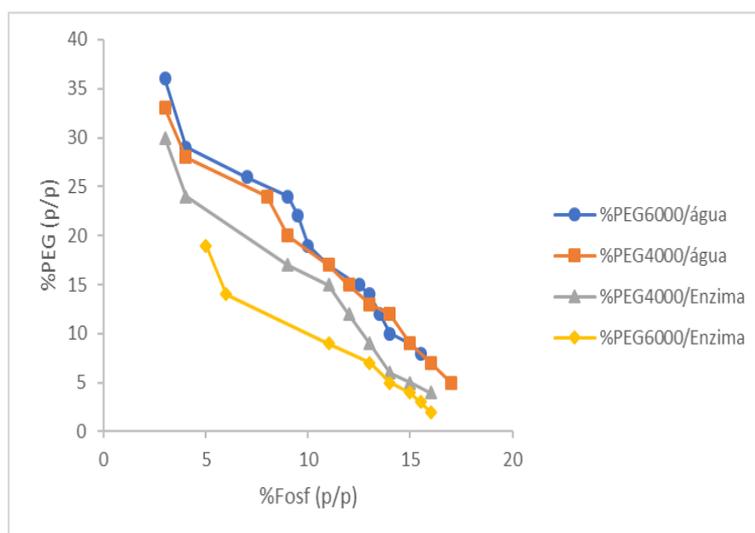
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 7: Diagrama de fases do sistema de duas fases aquosas comparando a utilização da água com a enzima no pH 7,0.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 8: Diagrama de fases do sistema de duas fases aquosas comparando a utilização da água com a enzima no pH 8,0.



Fonte: Dados da pesquisa.

## CONCLUSÃO

Ao comparar os resultados realizados com o caldo enzimático em relação aos realizados com a água, percebeu-se que a curva binodal construída com a enzima deslocou-se para a esquerda. Este deslocamento da curva sugere que, os sais ou outros componentes presentes no caldo fermentado, interferem no sistema ampliando assim a região de trabalho em relação ao sistema usando água. Em relação à massa molar do PEG, observou-se que menores concentrações de soluções são necessárias para a formação de fases com PEG de maior massa molar. Em relação ao pH foi observado que, não houve um deslocamento significativo da binodal em relação aos diferentes valores estudados.

## REFERÊNCIAS

ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: a perspective. *Journal Chromatography*. A, v. 1218, p. 8826–8835, 2011.

BAMBERGER, S., BROOKS, D.E., SHARP, K.A., ALSTINE, J.M.V., WEBBER, T. J. *Preparation of phase systems and measurement of their physicochemical properties*. In: WALTER, H.,

**bioenergia em revista: diálogos, ano 8, n. 1, p.36- 47, jan./jun. 2018.**

Siqueira, Eliana Maria Gonçalves Rodrigues de

*Influência do caldo enzimático na determinação do diagrama de fases no sistema bifásico aquoso*

BROOKS, D.E., FISHER, D. Partitioning in aqueous two-phase systems: theory, methods, uses and applications to biotechnology. Orlando: Academic Press, p. 85-130, 1985.

COSTA, S. A; PESSOA JR, A.; MILAGRES, A.M.F.; ROBERTO, I.C. Xylanase recovery Effect of extraction conditions on the aqueous two-phase system using experimental design. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 70-72, p. 629-639, 1998.

FERREIRA, J. F.; SBRUZZI, D.; BARROS, K. V. G., EHRHARDT, D. D., TAMBOURGI, E. B. Purification of Bromelain Enzyme from Curauá (*Ananas Erectifolius* LB Smith) White Variety, by Aqueous Two-Phase System PEG 4000/Potassium Phosphate. *Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 8, p. 395-399, 2014.

FERREIRA, J.F.; PADILHA, G. da SILVA; TAMBOURGI, E.B. Efeitos da massa molar e do pH sobre o equilíbrio termodinâmico do sistema bifásico aquoso PEG/fosfatos. *Exata*, São Paulo, v. 7, n. 1, p. 49-56, 2009.

FREIRE, M. G.; CLÁUDIO, A. F. M.; ARAÚJO, J. M. M.; COUTINHO, J. A. P.; MARRUCHO, I. M.; CANONGIA LOPES, J. N.; REBELO, L. P. N. Aqueous Biphasic Systems: A boost brought about by using ionic liquids. *Chemical Society Reviews*, v. 41, p. 4966-4995, 2012.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal Biology.Chemistry*, v. 177, p. 751-766, 1949.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, v. 59, p. 257-268, 1987.

PESSOA JR., A.; KILIKIAN, B. V. *Purificação de produtos biotecnológicos*, Barueri: Ed. Manole, 2005.

RENGIFO, A. F. C.; FERREIRA, G. M. D.; FERREIRA, G. M. D.; DA SILVA, M. C. H.; DA SILVA, L. H. M. Phase diagrams, densities and refractive indexes of poly (ethylene oxide) + organic salts + water aqueous two-phase systems: Effect of temperature, anion and molar mass. *Fluid Phase Equilibria*, v. 406, p. 70-76, 2015.

RODRIGUES, G. D.; DE LEMOS, L. R.; DA SILVA, L. H. M.; DA SILVA, M. C. H. Application of hydrophobic extractant in aqueous two-phase systems for selective extraction of cobalt, nickel and cadmium. *Journal Chromatography A*, v. 1279, p. 13–19, 2013.

SILVA, M. E.; FRANCO, T. T. Liquid-liquid extraction of biomolecules in downstream processing, a review paper. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 17, p. 1-17, 2000.

VERNAU, J., KULA, M. R. Extraction of proteins from biological raw material using aqueous polyethylene glycol-citrate phase systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 12, p. 397-404, 1990.

**bioenergia em revista: diálogos, ano 8, n. 1, p.36- 47, jan./jun. 2018.**

Siqueira, Eliana Maria Gonçalves Rodrigues de

*Influência do caldo enzimático na determinação do diagrama de fases no sistema bifásico aquoso*

1 Eliana Maria Gonçalves Rodrigues de Siqueira possui graduação em Engenharia Industrial Química pela Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Mestrado em Biotecnologia Industrial pela Faculdade de Engenharia Química de Lorena na área de Microbiologia Aplicada e Genética de Microrganismos, Doutorado em Engenharia Química na área de Processos Biotecnológicos pela Universidade Estadual de Campinas e Pós-Doutorado pela USP. Atualmente é Professora Associada da Faculdade de Tecnologia de Piracicaba Dep. “Roque Trevisan” – FATEC. Tem experiência na área de Engenharia Química, com ênfase em Purificação de Enzimas, atuando principalmente nos seguintes temas: microrganismos, enzimas, fermentação e extração líquido-líquido.