

Recuperação de enzimas celulolíticas por sistema de duas fases aquosas

Rodrigues, Eliana Maria Gonçalves

Resumo

Enzimas são proteínas que catalisam com grande eficiência as reações biológicas, são biocatalisadores que têm como principal função degradar as macromoléculas presentes no meio ambiente. No entanto, quando obtidas por processos fermentativos encontram-se bastante diluídas no meio de cultivo, sendo, a sua separação e purificação um fator crítico. O estudo de técnicas que visem à redução desses custos torna-se necessário à medida que se deseja obter produtos competitivos e viáveis comercialmente. O sistema de duas fases aquosas, principalmente o sistema com PEG e sal, tem sido amplamente utilizado nos processos de biosseparação, em virtude do seu baixo custo, baixa ocorrência de desnaturação e fácil ampliação de escala. Este trabalho teve como objetivo verificar a influência das variáveis pH, concentração de PEG 6000 e concentração de NaCl sobre a recuperação da celulase pelo sistema de duas fases. A metodologia aplicada foi a produção das enzimas celulolíticas pela fermentação em meio sólido, utilizando como substrato bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo; a atividade enzimática foi determinada em papel de filtro, pelo método proposto por Ghose (1987) adaptado e os resultados foram analisados estatisticamente através do Programa Action Stat. Os resultados das análises demonstraram um modelo linear, com um rendimento máximo em atividade enzimática estimado de 68%, nos valores de pH 7,5 e concentração de NaCl 10%.

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

Abstract

Enzymes are proteins that catalyze biological reactions with great efficiency, they are biocatalysts whose main function is to degrade macromolecules in the environment. However, when obtained by fermentation processes they are quite diluted in the culture medium, and their separation and purification is a critical factor. The study of techniques aimed at reducing these costs becomes necessary as one wants to obtain competitive and commercially viable products. The aqueous two-phase system, mainly the PEG and salt system, has been widely used in bioseparation processes due to its low cost, low denaturation and easy scaling. The objective of this work was to verify the influence of pH, PEG 6000 concentration and NaCl concentration on cellulase recovery by two - phase system. The applied methodology was the production of cellulolytic enzymes by fermentation in solid medium, using sugarcane bagasse and wheat bran as substrate; Enzyme activity was determined on filter paper by the method proposed by Ghose (1987) adapted and the results were statistically analyzed using the Action Stat Program. The results of the analyzes demonstrated a linear model, with an estimated maximum enzyme activity yield of 68% at pH 7.5 and 10% NaCl concentration.

Key words: enzyme, two-phase aqueous system, polyethylene glycol.

Resumen

Las enzimas son proteínas que catalizan reacciones biológicas con gran eficacia, son biocatalizadores cuya función principal es degradar las macromoléculas en el medio ambiente. Sin embargo, cuando se obtienen mediante procesos de fermentación, están bastante diluidos en el medio de cultivo, y su separación y purificación es un factor crítico. El estudio de técnicas destinadas a reducir estos costos se hace necesario a medida que uno desea obtener productos competitivos y comercialmente viables. El sistema acuoso de dos fases, principalmente el PEG 6000 y el sistema de sal, se ha utilizado ampliamente en procesos de

bioseparación debido a su bajo costo, baja desnaturalización y fácil ampliación. El objetivo de este trabajo fue verificar la influencia del pH, la concentración de PEG y la concentración de NaCl en la recuperación de celulosa mediante un sistema de dos fases. La metodología aplicada fue la producción de enzimas celulolíticas por fermentación en medio sólido, utilizando bagazo de caña de azúcar y salvado de trigo como sustrato; La actividad enzimática se determinó en papel de filtro mediante el método propuesto por Ghose (1987) adaptado y los resultados se analizaron estadísticamente utilizando el Programa de estadísticas de acción. Los resultados de los análisis demostraron un modelo lineal, con un rendimiento máximo estimado de actividad enzimática del 68% a pH 7,5 y una concentración de NaCl al 10%.

Palabras clave: enzima, sistema de dos fases acuosas, polietileno glicol.

INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas aumenta a especificidade e eficiência de processos industriais, reduzem os gastos, melhoram as características sensoriais nas indústrias alimentícias e elevam o valor nutricional, além da transformação do caldo da cana-de-açúcar em vinho para a produção de bioetanol, são naturais, não tóxicas e específicas. Sua produção é um mercado promissor, crescendo a cada ano, porém, o número de indústrias que utilizam enzimas é superior às que produzem, demonstrando carência de competidores (ALBANO, 2012).

Uma das alternativas para a redução do custo na produção das enzimas está no emprego de subprodutos agroindustriais para o cultivo de microrganismos em estado sólido, pois contém uma grande quantidade de compostos como celulose e hemicelulose, não necessitando de grande complementação nutricional para o crescimento do microrganismo (SILVA, 2014).

O isolamento de enzimas produzidas por microrganismos consiste em uma tarefa desafiante, pois os aspectos técnicos e econômicos podem representar até 90% dos custos totais de produção. A purificação de uma proteína em um meio fermentado pode envolver a combinação de várias técnicas que separam as proteínas de acordo com seu tamanho, carga, hidrofobicidade ou habilidade de se ligar a outros compostos (GOLUNSKI et al., 2011).

Desenvolver processos de purificação simples é um grande problema, pois devem ser seguros e baratos, além de atingir altos graus de purificação e seletividade. A extração utilizando o sistema de duas fases aquosas, empregando polímeros e sais, proporciona um ambiente favorável à separação de enzimas devido à presença de água em ambas as fases do processo, fator importante na manutenção de um meio adequado e não agressivo para a purificação de materiais biológicos (COIMBRA e TEIXEIRA, 2009). 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).

O sistema de duas fases aquosas tem sido uma alternativa eficiente na recuperação de diversas biomoléculas. Ho et al. (2017) utilizaram um sistema PEG/citrato na purificação parcial da carboximetilcelulase e obtiveram rendimento de aproximadamente 89% com um fator de purificação de 4,8. Já Souza et al. (2016) estudaram a recuperação e purificação das celulases produzidas por *Trichoderma reesei* LCB 48 na fermentação semissólida da biomassa da palma

forrageira, utilizando PEG 4000 e citrato de sódio e conseguiram resultados promissores como uma etapa inicial de um processo de recuperação e purificação das celulases. Fischer et al. (2015), utilizaram o sistema de duas fases aquosas com PEG de massa molar entre 2000-6000 g/mol e citrato de sódio na purificação do complexo enzimático celulolítico e obtiveram os melhores resultados com o PEG 2000 em concentração de 22% e pH 7,0, observaram também que a purificação não ocorreu de forma homogênea para todas enzimas do complexo e que, entre as enzimas β -glicosidase, endoglucanase e exoglucanase, a endoglucanase apresentou maior fator de purificação (FP=2).

Sendo assim, no presente trabalho, foram realizados ensaios com o intuito de se verificar a influência das variáveis pH, concentração de PEG 6000 e concentração de NaCl sobre a 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 celulases

Os ensaios foram conduzidos em 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 50mM pH 4,8 e 2% de solução nutriente (3,5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 g/L KH_2PO_4 , 0,5g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/L CaCl_2) 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 100rpm 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 colocada uma 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 à 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.

Delineamento Experimental da Recuperação de Celulase por um Sistema de Duas Fases Aquosas

As variáveis estudadas foram: pH (A), concentração de PEG 6000 (B) e concentração de NaCl (C).

O delineamento experimental para verificação das variáveis sobre a recuperação da celulase por um sistema de duas fases aquosas foi realizado segundo um esquema fatorial completo do tipo 2³. A matriz do planejamento projeto fatorial e os níveis dos fatores utilizados são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1: Matriz do planejamento fatorial completo 2³

| Ensaio | A | B | C |
|--------|----|----|----|
| 1 | -1 | -1 | -1 |
| 2 | +1 | -1 | -1 |
| 3 | -1 | +1 | -1 |
| 4 | +1 | +1 | -1 |
| 5 | -1 | -1 | +1 |
| 6 | +1 | -1 | +1 |
| 7 | -1 | +1 | +1 |
| 8 | +1 | +1 | +1 |

A = pH (-1 = 6,5; 1 = 7,5); B = Concentração de PEG 6000 (%) (-1 = 26; 1 = 30); C = Concentração de NaCl (%) (-1 = 0; 1 = 10)

Análise Estatística

Os dados experimentais foram analisados estatisticamente, de acordo com planejamentos predeterminados, para verificar o nível dos efeitos dos fatores em estudo.

A análise estatística dos resultados foi realizada através do Programa Action Stat, onde foram feitas estimativas dos efeitos das variáveis e suas interações, considerando um nível de significância de 95%. Os resultados foram expressos em tabelas de estimativa de efeitos, teste t de “Student” e ainda em tabelas de análise de variância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Visando a otimização da recuperação da celulase, por meio de um sistema de duas fases aquosas utilizando polietilenoglicol (PEG) 6000 e tampão fosfato de potássio, foi realizado um planejamento experimental, através do estudo das variáveis: pH, porcentagem de PEG 6000 e porcentagem de NaCl e suas interações. As condições experimentais de cada ensaio, juntamente com os resultados de rendimento em atividade são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Esquema da matriz utilizada no planejamento fatorial completo 2³

| Ensaio | A | B | C | Rendimento em AR (%) |
|--------|----|----|----|----------------------|
| 1 | -1 | -1 | -1 | 0 |
| 2 | +1 | -1 | -1 | 40 |
| 3 | -1 | +1 | -1 | 0 |
| 4 | +1 | +1 | -1 | 54 |
| 5 | -1 | -1 | +1 | 38 |
| 6 | +1 | -1 | +1 | 66 |
| 7 | -1 | +1 | +1 | 41 |
| 8 | +1 | +1 | +1 | 57 |

A = pH (-1 = 6,5; 1 = 7,5); B = Concentração de PEG 6000 (%) (-1 = 26; 1 = 30); C = Concentração de NaCl (%) (-1 = 0; 1 = 10)

Ao comparar os ensaios 1 e 8 (Tabela 2), onde temos todas as variáveis no menor e maior nível, respectivamente, pode se observar que houve um aumento do rendimento da atividade em torno de 60% quando se trabalhou no maior nível das variáveis. Já ao comparar os ensaios 1 e 3 (Tabela 2), onde temos os menores valores em rendimento em atividade, a única variável que se alterou foi a concentração de PEG 6000, entretanto comparando os ensaios 1 e 6, onde tivemos o menor e maior valor de rendimento em atividade, respectivamente, observa-se que as variáveis pH e concentração de NaCl, passaram dos menores para o maior nível. Estes resultados indicam que as variáveis pH e concentração de NaCl podem ser significativas. Todavia, se mantém inalterado o valor da concentração de PEG 6000, o que pode indicar que a variável não seja significativa. Estas observações podem ser comprovadas pela análise estatística dos resultados, apresentadas na Tabela 3. Os resultados comprovam as observações anteriores, ou seja, as variáveis pH e concentração de NaCl apresentam realmente efeitos significativos. O mesmo não acontece com a concentração de PEG 6000.

Tabela 3: Efeitos estimados, valores do teste t de “Student” obtidos no planejamento fatorial completo 2³

| Efeitos e interações | Estimativas | T | P |
|----------------------|-------------|-------|-------|
| Média | 37,00 | - | - |
| A | 17,25 | 4,60* | 0,03* |
| B | 1,00 | 0,27 | 0,81 |
| C | 13,50 | 3,60* | 0,05* |
| AB | 0,25 | 0,07 | 0,95 |
| AC | -6,25 | 1,67 | 0,22 |
| BC | -2,5 | 0,67 | 0,56 |
| ABC | -3,25 | 0,87 | 0,47 |

A = pH; B = Concentração PEG 6000 (%); C = Concentração de NaCl (%); *Significativos ($t_{4,0,95} = 2,77$)

As variáveis significativas, pH e concentração de NaCl apresentam sinais positivos, o que indica que, para haver aumento do rendimento em atividade, será preciso aumentar os valores destas variáveis. Estas observações podem ser comprovadas através da Tabela 4.

Tabela 4: Análise da variância para o estudo da recuperação de celulase por sistema de duas fases aquosas, no planejamento fatorial completo 2³

| Efeitos | QM | F | P |
|---------|--------|-------|--------|
| A | 2380,5 | 21,27 | 0,009* |
| B | 8 | 0,07 | 0,802 |
| C | 1458 | 13,03 | 0,022* |

$R^2 = 0,90$; A = pH; B = Concentração de PEG 6000 (%); C = Concentração de NaCl (%); QM = Média Quadrática;

*Significativos ao nível de 95% de confiança

Como os resultados das análises demonstraram que o modelo se ajusta a um linear, então podemos representar o processo de recuperação de celulase por um sistema de duas fases aquosas, considerando os termos que realmente influenciam no rendimento em atividade, pela Equação 1:

$$Y = 37 + 17,25A + 13,5C \quad (1)$$

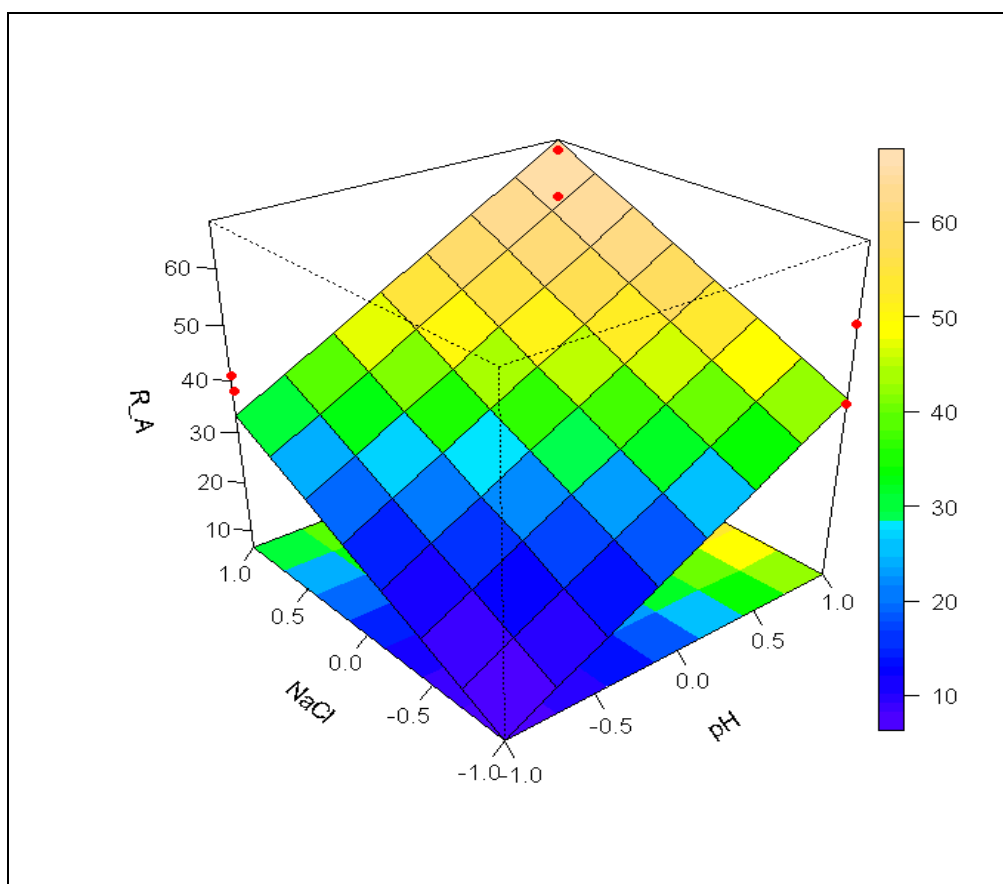
Sendo que Y representa o rendimento em atividade, A o pH e C a concentração de NaCl.

A metodologia da superfície de resposta foi utilizada para otimizar as condições da recuperação da celulase por um sistema de duas fases aquosas, fornecendo um modelo matemático adequado para a resposta em rendimento em atividade (BARROS NETO et al., 2010).

A partir deste modelo, obtiveram-se melhores resultados de recuperação em atividade quando se utilizou os valores de 7,5 para o pH e 10% para a concentração de NaCl. Nessas condições o rendimento máximo estimado pelo modelo foi de 68%.

A superfície de resposta do modelo e as linhas de contorno estão apresentadas na Figura 1.

Figura 1: Superfície de resposta descrita pelo modelo da Equação 1, que representa a recuperação da celulase por um sistema de duas fases aquosas



CONCLUSÃO

Através do estudo da metodologia da superfície de resposta, foi possível otimizar as condições de recuperação da enzima celulase utilizando um sistema de duas fases aquosas, obtendo um modelo matemático linear adequado para a resposta de rendimento em atividade, onde as variáveis significativas foram pH e concentração de NaCl. A partir deste modelo, o rendimento máximo obtido foi de 68% quando utilizou-se os valores de 7,5 para o pH e 10% para a concentração de NaCl.

REFERÊNCIAS

ALBANO, M. *Comparação da produção de celulases e xilanases por fungos filamentosos em fermentação submersa e estado sólido*. 2012. 64 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2012.

BARROS NETO, B.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. *Como fazer experimentos – Aplicações na ciência e indústria*. 4. Edição, Porto Alegre: Bookman, 2010.

COIMBRA, J.S.R.; TEIXEIRA, J. *Engineering Aspects of Milk and dairy Products*. Boca -Raton, CRC Press, 2009.

FISCHER, J.; LOPES, V. S.; SANTOS, E. F. Q.; GUIDINI, C. Z.; RAMADAN, L.; FILHO, U. C.; CARDOSO, V. L.; "PURIFICAÇÃO DE COMPLEXO CELULOLÍTICO DE *Aspergillus niger* USANDO SISTEMA AQUOSO DE DUAS FASES COM PEG-CITRATO", p. 532-539. In: *Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014* [= Blucher Chemical Engineering Proceedings, v.1, n.2]. São Paulo: Blucher, 2015.

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

GOLUNSKI, S.; ASTOLFI, V.; CARNIEL, N.; OLIVEIRA, D.; DILUCCIO, M.; MAZUTTI, M.A.; TREICHEL, H. Ethanol precipitation and inulinases from *Kluyveromyces marxianus*. *Separation and Purification Technology*. V. 78, n. 3, p. 261-265, 2011.

HO, S.L. et al Aqueous biphasis system for the partial purification of *Bacillus subtilis* carboxymethyl cellulase. *Process Biochemistry*, v. 58, n. 1, p. 276-281, 2017.

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.

SILVA, M. J. da. *Produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por Trichoderma reesei rut c-30 em meios com diferentes capacidades de indução*; Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas; Recife; 2014.

SOUSA, C. A. B.; SEGUNDO, V. A. G.; SANTIAGO, A. M.; CONRADO, L. S. et al. Aplicação de SABs formados por PEG e citrato de sódio na purificação de celulases produzidas por *Trichoderma reesei* LCB 48. In: *ANAIIS DO CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA*, 2016, Anais eletrônicos. Campinas, GALOÁ, 2018. Disponível em: <<https://proceedings.science/cobeq/cobeq-2016/papers/aplicacao-de-sabs-formados-por-peg-e-citrato-de-sodio-na-purificacao-de-celulases-produzidas-por-trichoderma-reesei-lcb>> Acesso em: 07 nov. 2019.

1 Eliana Maria Gonçalves RODRIGUES 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 Professor Ensino Superior, Referência III, da Faculdade de Tecnologia de Piracicaba Dep. Roque Trevisan. 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.