

Projeto de Pesquisa para Bolsa de Iniciação Científica (IC)

Título: Purificação Parcial de Hidrolases Recombinantes

Instituição: Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais

Laboratório Nacional: Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE)

Pesquisadora orientadora: Dra. Sindelia Freitas Azzoni

Resumo

Neste trabalho, a purificação parcial das enzimas será realizada utilizando-se técnicas conhecidas como sendo de baixo custo e de fácil escalonamento, com destaque para a precipitação sequencial com etanol. Além dos benefícios que traria no desenvolvimento de processos de produção de enzimas para a sacarificação de bagaço, o aluno de graduação finalizaria o projeto com conhecimentos práticos em técnicas de isolamento primário e intermediário de bioprodutos (*downstream processing*), que é uma área carente de profissionais no Brasil.

Introdução e estado da arte

A hidrólise enzimática de material lignocelulósico é o resultado de uma ação cooperativa de diversas glicosil hidrolases. Destacam-se as endo- β -1,4-glucanases (EG, E.C. 3.2.1.4), celobiohidrolases ou exoglucanases (CBH, E.C. 3.2.1.91) e β -glicosidases (E.C.3.2.1.21) que atuam sobre a fração celulósica e um conjunto de hemicelulases, tais como xilanases, b-xilosidases, glucuronidases, acetilesterases, galactomananases e glicomananases, que atuam sobre a fração hemicelulósica.³ Muitos esforços no sentido de se aumentar a eficiência da hidrólise enzimática têm sido voltados para a obtenção de preparados enzimáticos de proporções adequadas das diferentes enzimas envolvidas e de alta concentração para que se

tenha, assim, um efeito sinérgico máximo do complexo enzimático, além de mínima diluição da mistura de hidrólise e facilidade no armazenamento e transporte destes biocatalizadores (Queiroz et al., 2001).

No tocante à produção de etanol 2G, estudos na literatura têm antecipado que a produção do coquetel enzimático “on site”, ou seja, em uma planta anexa a planta de etanol 2G, pode ser a melhor opção para a viabilização desta tecnologia, uma vez que a biomassa lignocelulósica pode ser usada como principal fonte de carbono (Barta et al., 2010; Piovesan et al., 2013). Consequentemente, a recuperação primária visando concentrar o coquetel enzimático, torna-se uma etapa necessária para a obtenção de um coquetel com concentração protéica aceitável para a aplicação na reação de hidrólise, principalmente considerando os esforços no desenvolvimento de reações com alta carga de sólidos com vistas a tornar o reator de hidrólise mais produtivo.

A precipitação é considerada uma operação unitária simples largamente utilizada para concentrar biomoléculas em soluções aquosas, principalmente proteínas (Queiroz et al., 2001). Especificamente, a precipitação com etanol oferece a vantagem de ser de baixos custos de capital e operacional. Ela apresenta a possibilidade de se poder reciclar este agente precipitante por destilação simples após a separação da fase líquida da fase precipitado, reduzindo, assim, o impacto ambiental dos afluentes. Além disto, considerando o cenário de produção de celulasas “on site”, a recuperação primária utilizando etanol como agente de precipitação apresenta-se como uma técnica fortemente recomendável a ser otimizada e aplicada.

Com base nos resultados obtidos anteriormente por este grupo de pesquisa (Borhoquez et al., 2015), pode-se concluir que a adição de 90% de etanol ao fermentado de *T. harzianum* a 5°C leva a precipitação instantânea e completa das proteínas, garantindo a recuperação

completa da atividade xilanásica e 77% da atividade celulásica presentes no fermentado. Assim, o etanol se mostrou um agente concentrador de bom potencial para a indústria de etanol 2G, principalmente se associarmos sua característica de produto da própria biorrefinaria, de ser um produto facilmente reciclável por destilação e possibilitar uma ótima recuperação de xilanase com recuperação substancial de celulases.

Entretanto, nestes estudos notou-se perda de recuperação de algumas atividades enzimáticas por desnaturação causada pela alta concentração de etanol, sendo interessante a abordagem de precipitação com etanol em modo sequencial.

Desta forma, considerando-se a importância da concentração de coquetéis enzimáticos e o contexto da biorrefinaria da cana de açúcar, o objetivo deste estudo será avaliar a possibilidade de se obter, a partir de fermentados de bactérias produtoras glicosil hidrolases, precipitados com altas recuperações de atividades através de precipitação sequencial com etanol que permitam preparar concentrados enzimáticos com altas atividades para a produção de etanol 2G.

Objetivo

Estudar a recuperação e purificação parcial de glicosil hidrolases a partir de fermentados brutos através de técnicas de precipitação com etanol, em modo sequencial.

Metodologia

1. Produção de enzimas

As enzimas serão produzidas por outros alunos do grupo da pesquisadora e o fermentado bruto será cedido para o desenvolvimento destes estudos de recuperação primária.

2. Ensaio de precipitação

O volume desejado do fermentado foi distribuído em tubos Eppendorf de 2 mL e mantido na temperatura pré-determinada em um banho termostático (banho modelo TE-2000 com precisão de 0,1°C da Tecnal, Brasil). A seguir, etanol absoluto (Sigma-Aldrich, EUA) à temperatura desejada de precipitação foi adicionado gota a gota aos tubos até atingir a concentração final desejada. Após homogeneização por inversão, as soluções permaneceram no banho em estado estático por tempos pré-determinados. A seguir, os precipitados formados foram separados por centrifugação a temperatura da precipitação, 9000 g e por 10 min. Os precipitados foram dissolvidos em tampão citrato de sódio 0,05 mol/L pH 4,8. Todas as precipitações foram realizadas em triplicata.

3. Ensaios de atividades enzimáticas

A determinação da atividade de β -glicosidase foi realizada através da quantificação de *p*-nitrofenol (Sigma-Aldrich, EUA) liberado após hidrólise de *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (Sigma-Aldrich, EUA) nas condições de reação: tampão citrato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 4,8 durante 10 min a 50°C (termociclador Nexus da Eppendorf, Alemanha). O cálculo da unidade de atividade enzimática (UA) foi baseado na quantidade de enzima capaz de catalisar a liberação de 1 μ mol de produto (açúcar redutor) por minuto a 50°C.

As atividades de endoglucanase e xilanase foram determinadas utilizando os substratos utilizados carboximetilcelulose 0,5% (m/v) (Ghose, 1987) e xilana 0,5% (m/v) (Ruller *et al.*, 2006), respectivamente. Para quantificar a concentração de açúcar redutor liberada foi utilizado o teste colorimétrico com ácido 3,5-dinitrosalicílico e curva padrão correspondente a cada protocolo, glicose para endoglucanase e xilose para xilanase.

O ensaio de atividade celulásica sobre papel de filtro (FPase) foi realizado como descrito por Ghose²⁶ com uma redução de escala de volume de trabalho de 10 vezes.

4. Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteína em solução foi determinada através do método baseado no método de Bradford com BSA como proteína padrão. O método foi adaptado a microplacas utilizando o reagente Coomassie Brilliant Blue previamente diluído em proporção 1:4 em água. Medidas de absorção foram feitas no espectrofotômetro Evolution 60S da Thermo Scientific (EUA).

Referências

- Barta, Z., Kovacs, K., Reczey, K., Zacchi, G., Process design and economics of on-site cellulose production on various carbon sources in a softwood-based ethanol plant. *Enzyme Research.*, doi:10.4061/2010/734182 (2010).
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248-54.
- Bohorquez, M.; Freitas, S.; Miranda, E.A. Ethanol precipitation of glycosyl hydrolases produced by *Trichoderma harzianum* P49P11. *Brazilian Journal of Chemical Engineering (Online)*, 2014.
- Ghose, T.K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*. 59: 257–268.
- Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31 (1959) 426–428.
- Piovesan, B. M., Alvarez, T. M., Delabona, P. S., Dillon, A. J. P., Squina, F. M., Pradella, J. G. C., Cellulase on-site production from sugar cane bagasse using *Penicillium echinulatum*. *BioEnergy Research.*, 6, 1052-1062 (2013).
- Queiroz, J. A., Tomaz, C. T., Cabral, J. M. S., Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *J. Biotechnol.*, 87, 143-159 (2001).

Ruller, R., Rosa, J.C., Faça, V.M., Greene, L.J., Ward, R.J. Efficient constitutive expression of *Bacillus subtilis* xylanase A in *Escherichia coli* DH5alpha under the control of the *Bacillus* BsXA promoter. *Biotechnol Appl Biochem.* 2006 Jan;43(Pt 1):9-15.