

12º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP - 2021

ESTÁGIOS INICIAIS DE PURIFICAÇÃO DE BIOMOLÉCULA PRODUZIDA POR FERMENTAÇÃO SÓLIDA

BIANCA A. J. A. DE BARROS¹, VANIA BATTESTIN WIENDL²

¹ Graduanda em Licenciatura em Química, Bolsista PIBIFSP, IFSP, Câmpus São José dos Campos, alice.b@aluno.ifsp.edu.br.

² Engenheira de Alimentos - Professora Dra, IFSP, Câmpus São José dos Campos, vbattestin@ifsp.edu.br.

Área de conhecimento (Tabela CNPq): 2.08.05.00-4 Enzimologia

RESUMO: Biomoléculas produzidas por processos fermentativos através de rotas sustentáveis ganharam destaque no cenário mundial da última década. A purificação dessas biomoléculas é uma etapa de grande importância para o conhecimento e entendimento de sua função, bem como sua aplicação em diversas áreas de interesse industrial. Diante de tal contexto, o projeto contempla a produção e os estágios iniciais de purificação da enzima Tanase, obtida através de fermentação sólida, tendo como matéria prima rejeitos agroindustriais regionais e um microrganismo isolado no solo do campus do IFSP.

PALAVRAS-CHAVE: tanase; enzimas; proteínas; fermentação; resíduos.

EARLY STAGES OF PURIFICATION OF BIOMOLECULE PRODUCED BY SOLID STATE FERMENTATION

ABSTRACT: Biomolecules produced by fermentative processes through sustainable routes gained prominence in the global scenario of the last decade. The purification of mentioned biomolecules is a step of great importance to get to know and comprehend their functions, such as applications in many areas of industrial interest. In face of such context, the project contemplates the production and the early stages of purification of the enzyme Tannase, obtained through solid-state fermentation, having as raw material regional agro-industrial residues and a microorganism isolated from the soil of the IFSP campus.

KEYWORDS: tannase; enzymes; proteins; fermentation; rejects.

INTRODUÇÃO

Os resíduos gerados pela agroindústria representam um potencial problema ambiental, tendo em vista seu descarte indiscriminado decorrente da ausência de aplicações diretas para tais materiais. (PANESAR *et al.*, 2016 *apud* SANTOS *et al.*, 2018). Em países como o Brasil, onde a economia ainda é fortemente ligada a agropecuária, o problema é ainda mais alarmante. Em contrapartida a premissa de que tais rejeitos representam crescente preocupação ambiental para o país, está o potencial de reaproveitamento dessa matéria através das diferentes utilidades da biomassa (COELHO *et al.*, 2001, *apud* SANTOS *et al.*, 2018).

Os rejeitos da agroindústria são, em sua maioria, ricos em açúcares, proteínas e fibras – essas substâncias podem ser reaproveitadas em outros processos industriais através do tratamento correto dos rejeitos, que permite a obtenção de diversas moléculas de valor agregado e aplicabilidade interessante, como, por exemplo, enzimas. A Tanase (TAH) (E.C: 3.1.1.20) é um exemplo de enzima que destacou-

se no cenário mundial graças à sua capacidade de produzir antioxidantes de grande relevância para a indústria química, farmacêutica e alimentícia, e que pode ser obtida através da fermentação em estado sólido tomando como matéria prima os rejeitos agroindustriais. (COUTO, 2008). Para sua aplicação, é ainda necessária a etapa de purificação, onde a enzima é devidamente isolada dos demais produtos do processo de fermentação. Nesta etapa, os processos de purificação de proteínas fazem-se essenciais; essa classe de processos denota grande interesse para a comunidade científica, e foi o principal fator que permitiu os avanços mais recentes na área de biotecnologia (JANSON, 2011).

Tendo o cenário descrito em vista, o projeto de pesquisa foi desenvolvido visando a produção e a pré-purificação da enzima Tanase, a ser obtida através de fermentação sólida, tomando como matéria prima rejeitos agroindustriais da região do Vale do Paraíba, e pré-purificada através do fracionamento com sulfato de amônio.

MATERIAL E MÉTODOS

Materiais:

Reagentes e meios de cultura:

Ácido Tânico, SDS-trietanolamina, sais minerais e tampões, PDA (Ágar de batata dextrosado), farelo de trigo, BSA (albumina de soro bovino), sulfato de amônio, membrana para diálise.

Equipamentos:

Espectrofotômetro (Metash-Tecnal); banhos termostáticos (Tecnal); centrífuga (Kasvi k14-4000); estufa de cultura (Tecnal TE-392-1); incubador Shaker (K-330-Pro); balança analítica (Mettler Toledo Me 104); pHmetro (Metler Toledo).

Métodos:

Utilizou-se linhagem fúngica isolada do solo da árvore *Inga edulis*, o Ingá. A linhagem, identificada como *Aspergillus niger*, foi conservada em meios de PDA (ágar de batata dextrosado) em tubos de ensaio inclinados e à 10°C, e repicada com suplemento de ácido tânico 0,2% (p.v⁻¹) e pH final do meio igual a 5,2, sob incubação em estufa a 32°C, pelo período de 120 horas, objetivando a pré-indução da Tanase. Para o preparo do meio de fermentação, utilizou-se de 20g da mistura de farelo de trigo e solução de sais, em proporção inicial de 1:1, misturando as substâncias em Erlenmeyers de 250 mL de capacidade, acrescentando ao resíduo solução de sais (0,02 g/L de CaCl₂; 1 g/L de KH₂PO₄; 0,2 g/L de MnSO₄; 2 g/L de (NH₄)₂SO₄; 0,2 g/L de MgSO₄) e ácido tânico, até alcançar a concentração final de 10% de ácido tânico. Esterilizou-se esse meio à 120°C pelo período de 20 minutos, e, após, os frascos foram inoculados com 2mL de solução de esporos. Os fungos raspados da superfície do meio PDA foram incubados a 32°C em estufa bacteriológica durante 120 horas. Ao fim do processo de fermentação, foram adicionados 70 mL de solução tampão acetato 0,2 M, de pH igual a 5. Os frascos foram agitados a 150 rpm durante 1 hora. A solução foi filtrada em algodão e, em seguida, levada à centrífuga durante 15 minutos e a 3000 rpm.

Preparou-se a solução de substrato através da adição de ácido tânico 0,2% (p.v⁻¹) em tampão acetato 0,2 M (pH 5,5). Utilizando-se de 0,3 mL da solução de substrato e 0,5 mL de extrato enzimático bruto, deixado em banho maria a 60°C por 10 minutos, realizou-se a reação, paralisada após a incubação através da adição de 3 mL de solução de BSA 1 mg.mL⁻¹ e cloreto de sódio 0,17M em tampão acetato 0,2M (pH 5). Em seguida, foi realizada centrifugação a 3000 rpm pelo período de 10 minutos. O precipitado formado foi adicionado a 3 mL de solução SDS-trietanolamina, acrescentado de 1mL de solução de FeCl₃. A absorbância foi medida após 15 minutos, e a 530 nm, em concordância com a metodologia de Mondal *et al.* (2001). A curva padrão foi elaborada através das quantidades de ácido tânico, variando entre 0,02 e 0,14mg, e, por fim, calculou-se a atividade enzimática através da absorbância a 530 nm, de acordo com a equação abaixo descrita:

$$Abs_{530} = Abs_{controle} - Abs_{teste} \quad (1)$$

em que:

Abs₅₃₀ = Absorbância medida

Abs_{teste} = substrato + enzima ativa

Abs_{controle} = substrato + enzima desnaturada

Adicionou-se ao extrato enzimático bruto sulfato de amônio em quantidades suficientes para fornecer 20%, 40%, 60% e 80% de saturação. O sal foi adicionado lentamente e com agitação branda. A mistura permaneceu em repouso por 24 horas, à temperatura de 4°C, para que ocorresse a precipitação completa das proteínas. Passado o período descrito, a mistura foi centrifugada a 4000 rpm pelo período de 20 minutos, e o precipitado foi dialisado por 24 horas em membrana de diálise para a retirada do sal. A atividade enzimática foi medida após o período.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os melhores resultados de produção da enzima através do processo de fermentação sólida foram obtidos utilizando o resíduo de farelo de trigo. O extrato obtido da fermentação sólida foi filtrado, centrifugado e denominado extrato enzimático bruto. Este extrato enzimático bruto seguiu para a etapa de pré purificação com sulfato de amônio.

Para a pré purificação, adicionou-se a frascos contendo 50 mL de extrato enzimático bruto, sob agitação branda, o sal sulfato de amônio, em quantidades suficientes para obter 20%, 40%, 60% e 80% de saturação. As misturas permaneceram em repouso durante 24 horas, resfriadas a temperatura de 4°C, para total precipitação das proteínas, conforme ilustra a figura 1. A quantidade de sal a ser adicionada aos frascos para obtenção das saturações desejadas foi calculada através de regra de três simples, utilizando como parâmetro de proporção valores tabelados.

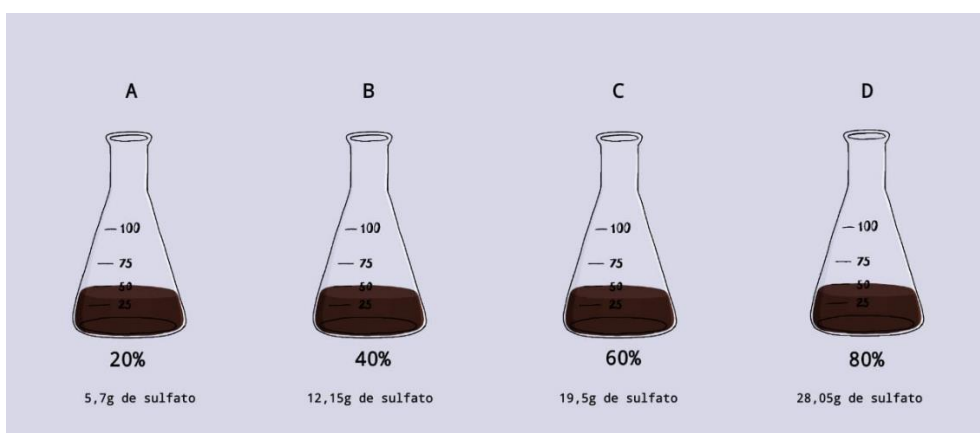


FIGURA 1. Precipitação com diferentes concentrações de sulfato de amônio (ilustrativa).

Uma vez terminado o período de repouso das amostras, estas foram centrifugadas sob agitação de 10000 rpm, durante 20 minutos, resultando na formação de um sistema com sobrenadante e precipitado. O precipitado foi dialisado para remoção do sal pelo período de 24 horas, e a atividade enzimática foi medida em concordância com a metodologia descrita em materiais e métodos. A figura 2 elucida o contraste entre os níveis de atividade enzimática aferidos para cada saturação com sulfato de amônio no sobrenadante e no precipitado dialisado.

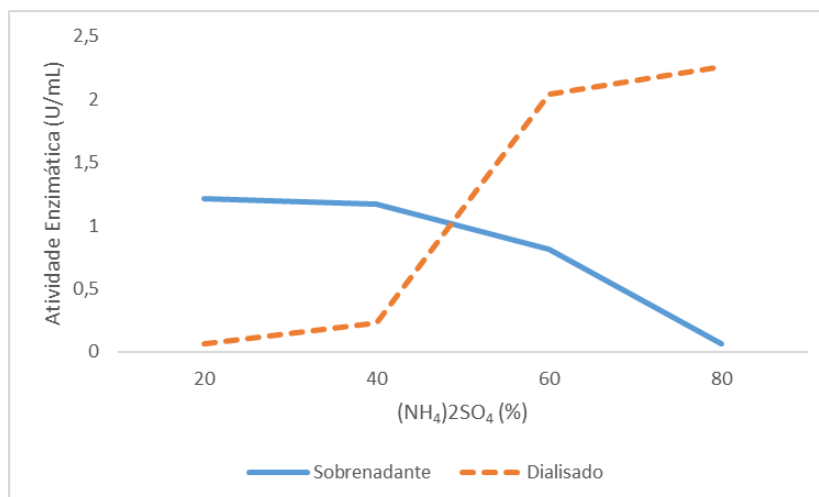


FIGURA 2. Atividade enzimática aferida no sobrenadante e no dialisado.

Observa-se que a enzima sofre maior precipitação sob saturação de 80% de sal, encontrando-se, após a centrifugação, no dialisado. Ao adicionar 80% de sal no extrato enzimático bruto, a grande maioria das proteínas foram precipitadas, incluindo a enzima tanase que é o objeto da arte deste estudo. Sob esta concentração de sal obteve-se uma atividade enzimática de 2,26 U/mL.

Esse resultado está de acordo com conhecimentos pré estabelecidos acerca da precipitação de proteínas com sulfato de amônio, conforme demonstrado por Wingfield (2016), que aponta que moléculas de baixo peso molecular, como é o caso da tanase, requerem maiores concentrações do sal para realizar precipitação efetiva. O estudo desenvolvido também entra em concordância com os resultados observados por Al-Mraai, Al-Fekaiki e Al-Manhel (2019), onde a tanase teve maior precipitação sob saturação de sulfato de amônio variando entre 50% e 70%. Este estudo vai ao encontro com os dados reportados por Abdal, Al-Jubori e Muslim (2020) no qual utilizaram processo de precipitação de proteínas com sulfato de amônio e os melhores resultados foram obtidos utilizando a saturação de 70%.

CONCLUSÕES

Os protocolos de purificação de enzimas microbianas extracelulares dividem-se nas etapas de pré purificação e purificação por métodos cromatográficos; ao passo de que a pré purificação, realizada no presente projeto, consiste em uma técnica de concentração de proteínas, a purificação por métodos cromatográficos obtém resultados mais eficazes e com maiores taxa de purificação. A pré purificação com sulfato de amônio, no entanto, demonstrou-se eficiente com 80% de concentração. Em estudos futuros, será necessário liofilizar a enzima, determinar a concentração proteica neste extrato liofilizado e avançar para as etapas de purificação utilizando colunas de troca iônica.

AGRADECIMENTOS

Ao IFSP, pela concessão da bolsa PIBIFSP.

REFERÊNCIAS

ABDAL, A. K.; AL-JUBORI, S. S.; EF MUSLIM, S. N. **Screening, purification of tannase produced from Iraqi Klebsiella pneumonia isolates and its role in enhancement of biofilm inhibition formed by Enterobacteriaceae isolates.** *Enterobacteriaceae* effectiveness by produced tannase, v. 23, n. S6, p. 630 – 640, mar. 2020.

AL-MRAAI, S. T. Y.; AL-FEKAIKI, D. F.; AL-MANHEL, A. J. A. **Purification and characterization of tannase from the local isolate of *Aspergillus niger*.** *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, Basrah, v. 07, p 29 – 34, jan – fev. 2019. DOI: 10.7324/JABB.2019.70106

BATTESTIN, V. **Produção, purificação, caracterização e aplicação da Tanase de *Paecilomyces variotii***. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007. Disponível em <<http://repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/256633>> Acesso em 27 abr. 2021.

COUTO, Susana Rodríguez. **Exploitation of biological wastes for the production of value-added products under solid-state fermentation conditions**. Biotechnology Journal, v. 3, n. 7, p 859 – 870, jul. 2008. DOI: 10.1002/biot.200800031.

JANSON, J. C. **PROTEIN PURIFICATION: PRINCIPLES, HIGH RESOLUTION METHODS AND APPLICATIONS**. 3ª ed. Hoboken: John Wiley & Sons – 2011

MONDAL, K.C. BANERJEE, D.; JANA, M.; PATI, B.R. **Colorimetric Assay Method for determination of the Tannin Acyl Hidrolase activity**. Analytical Biochemistry 295- 168-171. 2001.

SANTOS, F. R. dos. **Método de Lowry: validação e estimativa do cálculo da incerteza**. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição – Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012. Disponível em <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/88341>> Acesso em 29 abr. 2021.

WINGFIELD, Paul T. **Protein precipitation using ammonium sulfate**. Current Protocols in Protein Science, Hoboken, v. 84, n. 1, APÊNDICE 3, abr. 2016.