

MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE β -GLICOSIDASE DE *Aspergillus awamori*

C. D. da SILVA¹, R. S. S. TEIXEIRA², E. P. S. BON²

¹ Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química

² Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química

E-mail para contato: carolinedib@gmail.com

RESUMO – A enzima β -glicosidase (EC 3.2.1.21) catalisa a hidrólise do dissacarídeo celobiose, resultante da hidrólise da celulose, em dois monômeros de glicose. Em processos de hidrólise da celulose por celulases, a β -glicosidase minimiza a inibição das celulases por celobiose aumentando a eficiência da hidrólise do polissacarídeo. Este estudo visou à otimização da produção da enzima por *Aspergillus awamori*. A formulação do meio de cultivo foi avaliada por meio de um delineamento Plackett & Burman seguido de um delineamento completo composto rotacional (DCCR). A purificação de duas isoformas da β -glicosidase a partir do sobrenadante dos cultivos foi realizada por gel filtração e troca iônica e o grau de homogeneidade das amostras foi avaliado por eletroforese (Native PAGE) e zimograma. As enzimas apresentaram maior atividade em pH 4,5 e 60 °C.

1. INTRODUÇÃO

O aumento da demanda energética mundial, a diminuição das reservas de combustíveis fósseis e os problemas ambientais relacionados à exploração do petróleo e uso de seus derivados estimulam pesquisas sobre o uso e produção de combustíveis alternativos, como o etanol. Assim, no Brasil, vem se destacando o estudo da produção de etanol de segunda geração (também conhecido com etanol celulósico) proveniente da conversão por hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica, principalmente de matérias-primas de grande disponibilidade e baixo custo como o bagaço e a palha da cana-de-açúcar (LIN e TANAKA, 2006).

Os principais constituintes dessas matérias-primas são os polissacarídeos celulose e hemicelulose e a macromolécula de natureza fenólica, lignina (MOOSAVI *et al.*, 2010). O fungo filamentoso *Aspergillus awamori* 2B.361U2/1 produz níveis expressivos de enzimas celobiohidrolases e β -glicosidase (EC 3.2.1.21), que podem ser utilizadas na formulação de complexos enzimáticos usados na degradação de biomassa. A β -glicosidase catalisa a hidrólise da celobiose a dois monômeros de glicose, minimizando a inibição das celulases por celobiose e fornecendo glicose para a fermentação a etanol.

Nesse contexto, o objetivo deste presente trabalho foi a maximização da produção de β -glicosidases produzidas pelo fungo *Aspergillus awamori* 2B.361U2/1, a purificação da enzima e a sua atividade em diferentes valores de pH e em diferentes temperaturas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Condições de Cultivo:

A produção enzimática foi conduzida por sete dias a 30 °C e 200 RPM em frascos de 500 mL, contendo 100 mL do meio de cultivo. Os meios foram inoculados com 1% (v/v) da suspensão de esporos em glicerol 20% ($3,0 \times 10^6$ esporos/mL). Em uma primeira etapa foram realizados cultivos em triplicata para definir qual o pH mais adequado para produção de β -glicosidase usando o meio de cultivo complexo descrito por Breccia *et al.* (1995), como mostra a *Tabela 1*, tamponado (tampão fosfato de sódio e potássio 0,1M) em valores de pH 6,5, 7,0 e 7,5. Esses cultivos foram acompanhados por amostragem diária para determinação da atividade de β -glicosidase segundo a metodologia descrita pela IUPAC (GHOSE, 1987).

Tabela 1 - Meio de cultivo de Breccia modificado (BRECCIA *et al.*, 1995)

Meio de cultivo	Concentração (g/L)	2.2. Maxi miza ção da Produ ção de β- glicosi dase por
Nitrato de Sódio (NaNO_3)	1,20	
Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,20	
Cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,05	
Sulfato de manganês ($\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,0016	
Sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,0014	
Sulfato de ferro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,005	
Cloreto de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,020	
	Concentração (p/v)	
Extrato de Levedura	1,2%	
Fonte de Carbono	3,0%	

Planejamento Estatístico

Na tentativa de otimizar as condições de produção de β -glicosidase, foram adotados os delineamentos experimentais do tipo Plackett-Burman (PB), para a triagem dos componentes do meio de cultivo, e DCCR, para maximizar a produção de β -glicosidase por meio da otimização da formulação do meio de cultivo. Duas fontes de nitrogênio foram testadas no delineamento PB: extrato de levedura (fonte orgânica) e nitrato de sódio (fonte inorgânica). A atividade de β -glicosidase foi expressa em UI/mL, sendo uma unidade de atividade enzimática (UI – unidade internacional) correspondente à liberação de 1 μmol de açúcar redutor (equivalente a xilose ou glicose) por minuto, em condições de velocidade inicial.

Avaliação da formulação do meio por delineamento Plackett-Burman: Para a primeira série de experimentos de triagem dos componentes do meio foram realizados 21 ensaios. Esse experimento foi realizado seguindo a matriz gerada pelo *software* Statistica 7.0 (StatSoft,

Tulsa, OK, USA). A Tabela 2 mostra as concentrações de cada variável independente em cada nível do planejamento PB.

Tabela 2 - Variáveis e faixa de concentração dos componentes do meio de cultivo e os respectivos níveis da matriz gerada

Nº da variável	Variáveis independentes	Concentração (g/L) para os níveis da		
		-1	0	1
x1	Nitrato de Sódio (NaNO_3)	0,00	1,50	3,00
x2	Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,00	0,20	0,40
x3	Cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,00	0,05	0,10
x4	Sulfato de manganês	0,00	0,005	0,01
x5	Sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,00	0,020	0,040
x6	Sulfato de ferro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,00	0,002	0,004
x7	Cloreto de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,00	0,002	0,004
x8	Extrato de levedura	6	9	12
x9	Farelo de trigo	20	30	40

Otimização do meio de cultivo por DCCR: Após os experimentos de triagem, foram definidas as variáveis significativas para a produção de β -glicosidase. Esse experimento foi realizado seguindo a matriz gerada pelo *software* Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Foram selecionados três componentes para o DCCR 2³: nitrato de sódio, farelo de trigo e extrato de levedura. Na Tabela 3 são mostradas as variáveis com os valores codificados e os valores reais de concentração em g/L usadas nos 18 ensaios realizados.

Tabela 3 - Variáveis e concentração em g/L para cada um dos níveis da matriz dos componentes do meio de cultivo

Concentração (g/L) de cada componente para seus respectivos níveis da matriz						
		-1,68	-1	0	1	1,68
x1	NaNO_3	1	1,81	3	4,2	6
x2	Farelo de trigo	20	28,1	30	31,9	40
x3	Extrato de levedura	5	9,05	10	10,95	15

2.3. Purificação e caracterização da β -glicosidase

Utilizando o meio otimizado, foi produzido um litro de sobrenadante do cultivo de *A. awamori*. Este volume foi fracionado e concentrado 10 vezes por ultrafiltração tangencial em módulo Amicon utilizando membrana de 10 kDa. Na primeira etapa de purificação, a fração concentrada foi fracionada por filtração em gel (Sephadex G-75), sendo a coluna eluída com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. Na segunda etapa de purificação, as frações com atividade de β -glicosidase foram coletadas e subsequentemente fracionadas em coluna de troca iônica (DEAE 650), sendo esta eluída com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5. Em ambas as etapas, a atividade enzimática das frações coletadas foi medida usando o substrato

sintético p-nitrophenyl β -D-glucoside (pNPG) pelo método descrito por SINGHANIA *et al.* (2011) e a concentração de proteína foi estimada por leitura a 280nm.

Todas as amostras de interesse de cada uma das etapas de purificação descritas acima foram acompanhadas pela medida da atividade específica de β -glicosidase das frações relevantes seguindo a metodologia descrita pela IUPAC (GHOSE, 1987) e da concentração de proteína seguindo a metodologia descrita por BRADFORD (1976).

O grau de homogeneidade das amostras de cada etapa e a identificação de β -glicosidases provenientes da cromatografia de gel filtração e troca iônica foram analisadas por eletroforese *Native-PAGE* 8% e zimograma. O gel de *Native-PAGE* para análise de proteínas foi corado com Coomassie Coloidal e o zimograma para identificação de β -glicosidase foi incubado a 50 °C por 30 minutos em solução de esculin 0,2% e revelados com solução de cloreto férrico 0,06%, assim como descrito por SINGHANIA *et al.* (2011).

O efeito do pH e da temperatura na atividade de β -glicosidase da amostra concentrada em membrana de 100 kDa foi determinado pela dosagem enzimática seguindo o protocolo descrito pela IUPAC (GHOSE, 1987). Os ensaios foram realizados a 50°C utilizando tampão citrato de sódio nos pHs 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 4,8, 5,0, 5,5; e tampão fosfato de sódio nos pHs 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 e 8,0. Os ensaios para estudo do efeito da temperatura foram realizados no pH ótimo encontrado e na faixa de temperaturas de 30 °C a 80 °C com variações de 5°C.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Maximização da Produção de β -glicosidase por Planejamento Estatístico

Efeito do pH na Produção de β -glicosidase

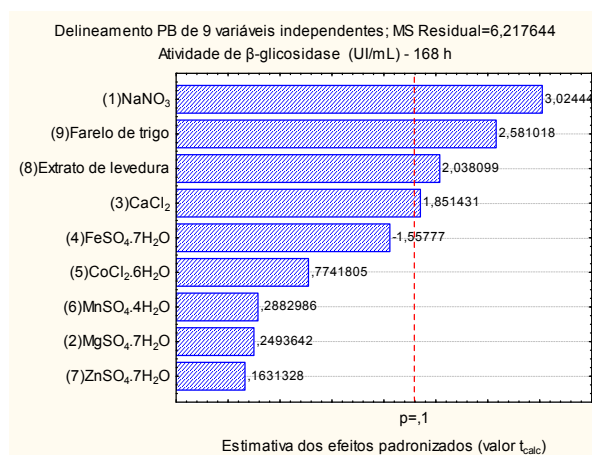
O pH do meio de cultivo é de grande relevância para a produção de β -glicosidase pelo fungo *A. awamori*. A produção enzimática medida no 7º dia de cultivo variou de acordo com o pH inicial ajustado para 6,5, 7,0 e 7,5, apresentando atividades iguais a $17,7 \pm 1,8$ UI/mL, $24,1 \pm 4,0$ e $26,3 \pm 4,9$ UI/mL, respectivamente. O tamponamento em pH 7,5 foi o que influenciou mais positivamente a produção da enzima, e por esta razão, este pH foi escolhido para os experimentos de otimização dos componentes do meio.

Delineamento Plackett-Burman

A Figura 1 apresenta o Diagrama de Pareto que mostra as variáveis significativas e seus efeitos para a produção de β -glicosidase. Os componentes nitrato de sódio, farelo de trigo e extrato de levedura - fonte de carbono e nitrogênio do meio - mostraram-se significativos e com efeito positivo na produção de β -glicosidase, ou seja, quanto maior sua concentração dentro da faixa de concentração estudada, maior a atividade de β -glicosidase após sete dias de cultivo. As demais variáveis não apresentaram efeito significativo e podem ser utilizadas na concentração mais baixa estudada. Como a concentração de muitas delas foi igualada a zero, elas puderam ser retiradas do meio de cultivo. A presença de cloreto de cálcio no meio foi significativa para o sétimo dia de cultivo, entretanto não foi significativa no sexto dia de

cultivo e em p valores inferiores a 0,1 em ambos os dias. Assim, optamos por estudar apenas o nitrato de sódio, farelo de trigo e extrato de levedura, que apresentaram maior efeito positivo na produção de β -glicosidase, como variáveis independentes em um delineamento completo central rotacional (DCCR) 2^3 .

Figura 1 - Diagrama de Pareto construído pela análise estatística da atividade de β -glicosidase dos 21 ensaios do PB, com 168 horas de cultivo



Delineamento DCCR 2^3

A otimização dos componentes significativos para uma maior produção de β -glicosidase - nitrato de sódio, farelo de trigo e extrato de levedura - foi realizada por meio de um delineamento DCCR 2^3 . A Tabela 4 apresenta os níveis da matriz previstos para a composição do meio de cultivo com pH inicial de 7,5 do modelo gerado pelo programa Statistica 7.0 para maximizar a produção de β -glicosidase, bem como os valores em massa equivalentes a cada nível, baseados nas concentrações da Tabela 3.

Tabela 4 – Níveis da matriz gerada por previsão computacional para maximização da produção de β -glicosidase

	NaNO ₃	Farelo de trigo	Extrato de levedura
Níveis da matriz	0,144716	0,18953	-0,497541
Massa correspondente (g/L)	3,173659	30,36011	9,527336

3.2. Identificação das Frações Purificadas

Duas β -glicosidases de *A. awamori*, BGL1 e BGL2, com massas moleculares distintas foram separadas na primeira etapa de cromatografia, como mostrado na Figura 2. A fração da β -glicosidase de maior massa molecular (BGL1) foi subsequentemente fracionada em coluna de troca iônica (DEAE 650), como mostrado na Figura 3.

Figura 2 - Perfil de eluição da β -glicosidase de *A. awamori* em Sephadex G75

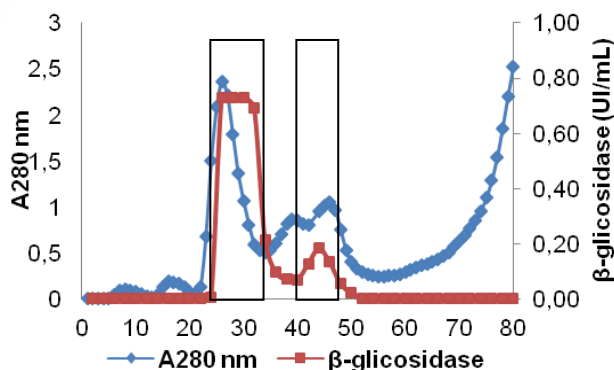
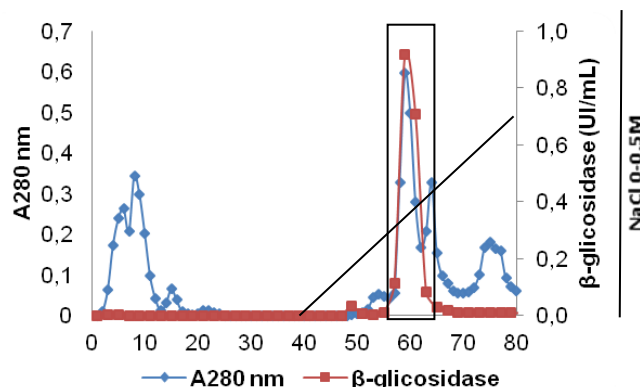
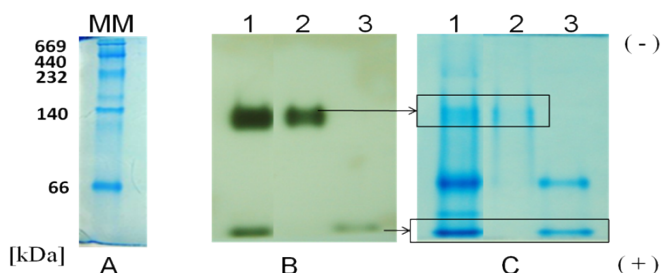


Figura 3 - Perfil de eluição da α -glicosidase BGL1 em DEAE 650



O grau de homogeneidade das amostras foi avaliado por eletroforese (Native-PAGE), gel B, e zimograma, gel C, como mostrado na Figura 4. A massa molecular da BGL1 e BGL2 puderam ser estimadas em 140 kDa e 30 kDa, respectivamente.

Figura 4 - Eletroforese: A – Marcador molecular; B - Zimograma; C – Native PAGE 8%



MM – Marcador molecular native-PAGE
1 – Concentrado *A. awamori* PM 100
2 – β -glicosidase BGL1
3 – β -glicosidase BGL2

3.3. Caracterização da β -glicosidase

O efeito do pH e da temperatura na atividade de β -glicosidase foi estudado. A maior atividade de β -glicosidase, tanto no concentrado em 100 kDa quanto na β -glicosidase BGL1, foi observada em pH 4,5 e 60 °C. Entretanto, a BGL1 não apresentou estabilidade a 50 °C com meia-vida de aproximadamente 3 horas.

4. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho mostram que foi possível reduzir a quantidade de componentes usados no meio de cultivo do fungo *A. awamori*, chegando a uma formulação ótima que visa o aumento da produção da enzima de interesse. Duas β -glicosidasas do fungo trabalhado, com massas moleculares distintas, foram identificadas e purificadas em duas etapas de cromatografia. A caracterização destas enzimas foi de suma importância para a otimização das misturas enzimáticas usadas na hidrólise de biomassa da cana-de-açúcar.

5. REFERÊNCIAS

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248-254, 1976.

BRECCIA, J.D.; CASTRO, G.R.; BAIGORÍ, M.D.; SIÑERIZ, F. Detection of endo-xylanase activities in electrophoretic gels with congo red staining. *Biotechnology Techniques*, v. 9, p. 145-148, 1995.

GHOSE T. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, v. 59 (2), p. 257-268, 1987.

LIN Y., TANAKA S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 69, p. 627-642, 2006.

MOOSAVI, M., MAJDI, M. Utilization of sugar beet pulp as a substrate for the fungal production of cellulase and bioethanol. *African Journal of Microbiology Research*, v. 4(23): p. 2556-2561, 2010.

SINGHANIA, R.R., SUKUMARAN, R.K., RAJASREE, K.P., MATHEW, A., GOTTUMULLALA, L., PANDEY, A. Properties of a major β -glucosidase-BGL1 from *Aspergillus niger* NII-08121 expressed differentially in response to carbon sources. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 1521-1524, 2011.