

15º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP - 2024

Utilização de resinas cromatográficas para recuperação de enzimas presentes em processo biológico completo da cana de açúcar

GABRIEL V. PIOVEZAN¹, PEDRO H. MARIANO² THAIS S. MILESSI ESTEVES³, LEANDRO J. BENEDINI⁴

¹ Aluno do curso Técnico em Química Integrado ao Ensino Médio, Bolsista PIBIC, IFSP, Campus Catanduva, g.valentin@aluno.ifsp.edu.br;

² Aluno do curso Técnico em Química Integrado ao Ensino Médio, IFSP, Campus Catanduva;

³ Docente do Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos;

⁴ Docente do curso Técnico em Química Integrado ao Ensino Médio, IFSP, Campus Catanduva.

Área de conhecimento (Tabela CNPq): 3.06.02.03-3 Operações de Separação e Mistura

RESUMO: O Brasil é um dos principais produtores mundiais de açúcar e álcool, com uma safra anual de aproximadamente 600 milhões de toneladas de cana-de-açúcar. Um dos subprodutos é o bagaço, que contém polissacarídeos fermentescíveis que podem ser usados para produzir etanol de segunda geração (2G). Nesse contexto, o Processo Biológico Completo (PBC) destaca-se por utilizar microrganismos que secretam enzimas, permitindo a transformação de compostos lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis, que podem ser metabolizados em etanol 2G. Ainda existem poucos estudos sobre esse processo e faltam publicações científicas que proponham técnicas para recuperar as enzimas secretadas, que têm relevante interesse econômico. Por causa disso, este trabalho avaliou a capacidade de adsorção das enzimas do PBC em uma resina cromatográfica. Foram realizados experimentos de agitação em caldo do PBC para investigar o potencial de adsorção da resina. A quantificação das enzimas adsorvidas foi feita por meio de balanço de massa e métodos analíticos para determinação de proteínas. Os resultados mostraram que a resina cromatográfica utilizada apresentou eficácia na adsorção das enzimas do caldo do PBC, embora não tenha sido observada uma relação clara entre a capacidade de adsorção, o pH e a quantidade de resina usada.

PALAVRAS-CHAVE: resinas cromatográficas, enzimas, adsorção.

Use of ion exchange resins to recover hydrolytic enzymes present in complete biological process of sugar cane

ABSTRACT: Brazil is one of the world's leading producers of sugar and ethanol, with an annual harvest of approximately 600 million tons of sugarcane. One of the main by-products is bagasse, whose chemical structure contains fermentable polysaccharides that can be used to produce second-generation ethanol (2G). In this context, the Complete Biological Process (CBP) has gained attention, as it employs microorganisms that secrete enzymes, facilitating the conversion of lignocellulosic compounds into fermentable sugars, which can then be metabolized into 2G ethanol. Given that there are few studies investigating this process, there are currently no scientific publications proposing techniques for recovering the secreted enzymes, which hold significant economic interest. This study evaluated the adsorption potential of hydrolytic enzymes present in the CBP using a specific ion-exchange resin. To achieve this objective, experiments were conducted using a resin designed to adsorb and recover the enzymes through agitation. The enzymes were quantified using mass balance and analytical methods for protein determination. After analyzing the data, it was observed that the chromatographic resin used demonstrated the ability to adsorb the enzymes present in the CBP broth.

KEYWORDS: Ion Exchange Resins, Enzymes, Adsorption.

INTRODUÇÃO

Atualmente, os biocombustíveis destacam-se globalmente por suas vantagens ambientais e socioeconômicas em relação aos combustíveis fósseis, contribuindo para a redução da emissão de gases de efeito estufa e auxiliando no cumprimento de metas climáticas (Antunes et al., 2014; COP 21, 2015). O bioetanol é uma alternativa proeminente no Brasil, sendo uma fonte de energia limpa obtida de matérias-primas açucaradas, amiláceas e lignocelulósicas (Girio et al., 2010).

Os materiais lignocelulósicos, amplamente disponíveis e de baixo custo, contêm até 70% de polissacarídeos fermentescíveis, como celulose e hemicelulose (Nigam; Singh, 2011). O Brasil, com sua abundância de bagaço de cana-de-açúcar, gerou aproximadamente 90 milhões de toneladas deste subproduto em 2021 (CONAB, 2021). Apesar de parte ser utilizada para energia, uma quantidade significativa pode ser convertida em etanol de segunda geração (2G), promovendo a redução de gases de efeito estufa e o aumento da produção nacional de combustíveis, sem necessidade de expansão de área plantada (Milessi, 2017). Entretanto, a produção de etanol 2G enfrenta desafios, como a hidrólise enzimática necessária para acessar frações celulósica e hemicelulósica. O alto custo das enzimas é um obstáculo para a aplicação em larga escala (BARUAH et al., 2018). O Processo Biológico Completo (PBC) é uma tecnologia promissora que utiliza microrganismos para produzir etanol 2G de maneira eficiente, realizando todas as etapas em um único biorreator (Olguin-Maciél et al., 2020). Este trabalho propõe o uso de resinas para recuperar as enzimas secretadas durante a fermentação no PBC. Foram realizados experimentos laboratoriais para testar a eficiência das resinas, utilizando planejamento fatorial para avaliar o impacto de variáveis como pH e massa de resina. A quantificação de enzimas foi feita pelo método de Bradford, que mede proteínas em amostras por meio de um corante que altera de cor. Esses estudos ajudam a recuperar biocompostos com relevância industrial e a desenvolver processos de extração mais sustentáveis.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais: Reagente de Bradford; água destilada; *Bovine Serum Albumine* (BSA); caldo de fermentação proveniente do processo biológico completo (PBC); resinas cromatográficas; micropipetas de 1000 e 100 μL ; tubos de ensaio; tubos falcon de 15 e 45 mL; espectrofotômetro; pHmetro; shaker e centrífuga.

Métodos: Primeiramente, foi construída uma curva padrão com soluções de BSA em diferentes concentrações e reagente Bradford. Após a construção da curva padrão, foi realizado um planejamento fatorial para determinar a influência do pH e da quantidade de resina utilizada no processo de adsorção.

TABELA 1. Determinação das concentrações de BSA nos tubos de ensaio utilizados para construir a curva padrão de proteínas.

Tubos de ensaio	1	2	3	4	5	6
B.S.A (1mg/ml)	0 μL	5 μL	10 μL	15 μL	20 μL	25 μL
Água destilada	100 μL	95 μL	90 μL	85 μL	80 μL	75 μL
Concentração final de B.S.A (mg/mL)	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25

Construção da curva padrão: Para construir a curva padrão de BSA, foram utilizados água destilada, reagente de Bradford e BSA (1mg/mL). Foram preparadas seis soluções com concentrações diferentes de BSA, de acordo com o exposto na Tabela 1, e essas concentrações foram relacionadas com suas respectivas absorvâncias através da lei de Lambert-Beer. Para isso, em seis tubos de ensaio, os volumes de água destilada e BSA (1mg/mL) foram misturados, produzindo soluções de BSA com diferentes concentrações, variando entre 0,00 e 0,25 mg/mL.

Após realização das soluções, elas foram colocadas no espectro para análise em 595 nM, de tal forma que fosse possível estabelecer uma relação linear entre a absorvância e a concentração. Essa relação foi expressa em uma reta ajustada, com equação e coeficiente de determinação (R²).

Planejamento fatorial para determinação dos fatores que influenciam a adsorção: O planejamento fatorial foi utilizado para determinar a influência do pH e da massa de resina no processo de adsorção.

Para realização do planejamento fatorial, foi determinado o valor mínimo, médio e máximo do pH (5,10; 6,01 e 6,96, respectivamente) e da massa de resina (aproximadamente 0,0090; 0,0130 e 0,0180 respectivamente) durante o processo de adsorção. Os valores de pH foram combinados com os de massa de resina como mostrado pela Tabela 2.

TABELA 2. Relações estabelecidas entre pH do meio e massa de resina para realização do planejamento fatorial do processo de adsorção.

pH	Massa de resina (g)
5,10	0,0088
5,10	0,0182
6,98	0,0090
6,98	0,0184
5,99	0,0136
5,99	0,0136
5,99	0,0133

Para que fossem executadas as sete condições de adsorção representadas na Tabela 2, foram utilizados sete tubos falcons de 45 mL. Em cada um dos tubos, foram adicionados 2 ml do caldo de PBC. Na sequência, os pHs foram ajustados e as massas de resina foram adicionadas de acordo com o representado na Tabela 2. Na sequência, as misturas foram levadas para agitação em shaker durante 40 minutos. Durante a agitação, uma parte das enzimas presentes no caldo de PCB foi adsorvida pela resina.

Após a agitação, as amostras foram transferidas para falcons de 15 mL e centrifugadas a 100 rpm durante 10 min, para sedimentação da resina na mistura. Uma vez sedimentada a resina junto às enzimas adsorvidas, o sobrenadante foi retirado e levado para análise colorimétrica, utilizando 100 µL dos sobrenadantes, coletados com uma micropipeta, e 2,5 mL de reagente Bradford, que reagiram por 5 minutos e foram colocados no espectro para análise em 595 nM. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. Após medida das absorvâncias, as concentrações de proteína foram encontradas usando a curva padrão ajustada no item anterior.

A equação 1 foi utilizada para determinação da quantidade de enzimas adsorvidas:

$$Q = \frac{(c_1 - c_2) \cdot V}{m} \quad (1)$$

Em que: Q - relação massa adsorvida por massa de resina, mg/g; V- volume de caldo enzimático utilizado, mL; m- massa de resina,g; c₁- concentração inicial (mg/mL); c₂- concentração final (mg/mL).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como resultados desse trabalho, destacam-se a curva padrão de BSA e o planejamento fatorial executado. Ambos serão analisados separadamente.

a) Curva padrão de BSA:

O gráfico exposto na Figura 1 estabelece uma relação linear entre as concentrações de proteínas em solução e a absorvância medida pelo espectrofotômetro. A análise dos dados resultou em

um coeficiente de determinação (R^2) de 0,959, o que indica um ajuste adequado da curva obtida. Esse valor sugere que a curva é capaz de descrever de maneira eficaz a concentração de proteínas em solução com base na absorbância medida, corroborando a precisão do método utilizado para a quantificação das proteínas. Por meio de regressão linear, obteve-se a equação 2 que relaciona a concentração com a absorbância.

$$C = 0,6993 x A - 0,3505 \quad (2)$$

Em que: C - concentração, mg/mL; A- absorbância, adimensional.

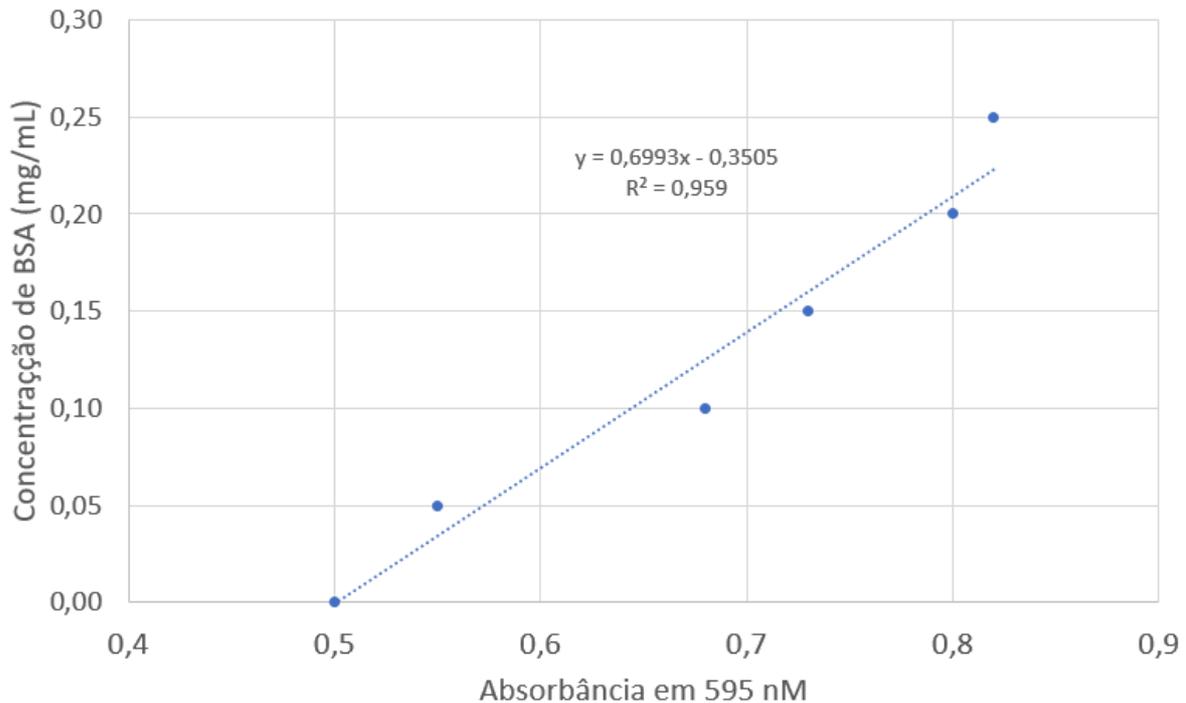


FIGURA 1. Relação linear entre absorbância e concentração. A relação foi obtida pela curva de calibração descrita nos Materiais e Métodos.

b) Planejamento fatorial do processo de adsorção:

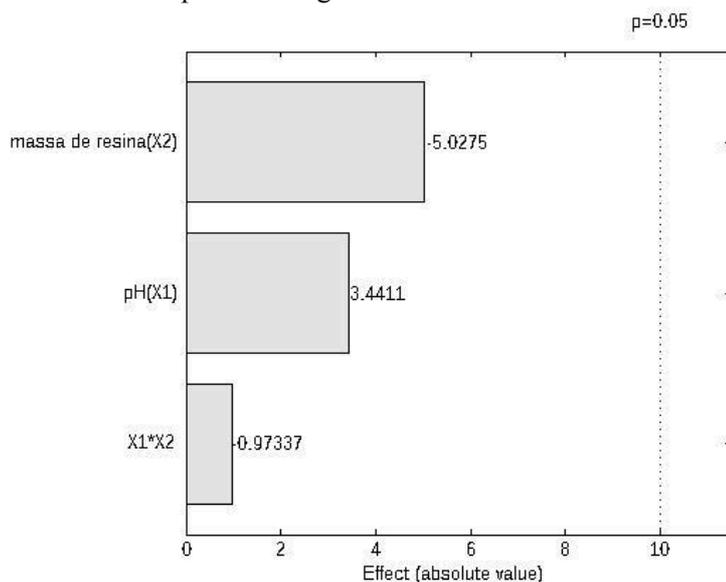
As análises colorimétricas dos processos de adsorção foram realizadas para verificar a influência do pH e da massa de resina no processo de adsorção. A relação massa adsorvida/massa de resina (Q) foi calculada a partir da Equação 1, permitindo quantificar a capacidade de adsorção em diferentes condições experimentais. A partir da análise da Tabela 3, é possível observar que a resina cromatográfica apresenta a capacidade de adsorver as enzimas do caldo do processo biológico completo. A condição de adsorção mais efetiva ocorreu em pH de 6,98, ao se utilizar uma massa de 0,0090 g de resina. Nessa situação, observou-se o maior valor de Q (8,47).

TABELA 3. Valores de Q obtidos em cada amostra do planejamento fatorial, considerando variações do pH e massa de resina.

pH	Massa de resina (g)	Q (mg _{prot} /g _{resina})
5,10	0,0088	4,05
5,10	0,0182	0,00
6,98	0,0090	8,47
6,98	0,0184	2,47
5,99	0,0136	2,62
5,99	0,0136	0,36
5,99	0,0133	5,00

A partir das informações apresentadas na Tabela 3, foi gerado um gráfico de Pareto (Figura 2) com o uso de *software Chemoface*. Esse gráfico ilustra a contribuição relativa de cada fator testado (pH e massa de resina) em relação à resposta observada, a relação massa adsorvida/massa de resina (Q). A avaliação estatística dos dados revelou que os valores de p associados a cada fator ultrapassaram 5%. Isso indica uma alta probabilidade de que os resultados experimentais satisfaçam a hipótese nula, referente à inexistência de efeitos significativos dos fatores testados sobre a adsorção. Portanto, observa-se que os valores experimentais analisados não demonstraram um impacto significativo na eficiência do processo de adsorção. Ou seja, isso significa que nas condições experimentais estabelecidas, os fatores investigados não contribuíram de maneira substancial para a otimização da adsorção, indicando a necessidade de explorar outras variáveis ou condições experimentais que possam ter um impacto mais relevante.

FIGURA 2. Gráfico de pareto da significância dos fatores de influência sobre a adsorção



CONCLUSÕES

Este estudo investigou a utilização de resinas cromatográficas para a recuperação de enzimas secretadas durante o processo biológico completo (PBC), visando a recuperação de enzimas produzidas durante esse processo. A construção da curva padrão de BSA confirmou a eficácia do método de quantificação de proteínas, com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,945, demonstrando a confiabilidade do método colorimétrico para medir concentrações de proteínas. Os experimentos de planejamento fatorial, realizados para avaliar a influência do pH e da massa de resina

sobre a adsorção de enzimas, revelaram que a condição mais eficiente ocorreu em pH de 6,98 e com uma massa de resina de 0,0090 g, resultando em uma relação de massa adsorvida/massa de resina (Q) de 8,47 mg_{prot}/g_{resina}. No entanto, a análise estatística indicou que os fatores testados não apresentaram efeitos significativos na eficiência do processo de adsorção, sugerindo que as condições experimentais estabelecidas não maximizaram a capacidade de adsorção. Esses resultados ressaltam a necessidade de investigar outras variáveis ou otimizações que possam aprimorar a recuperação das enzimas no contexto do PBC.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

G.V.P.: Análise de dados, Validação de dados e experimentos, Design da apresentação de dados, Redação do manuscrito original

P.H.M.: Análise de dados, Validação de dados e experimentos, Design da apresentação de dados, Redação do manuscrito original

T.M.E.: Conceitualização, Recebimento de financiamento, Pesquisa, Administração do projeto, Supervisão

L.J.B.: Análise de dados, Validação de dados e experimentos, Design da apresentação de dados, Supervisão.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Instituto Federal de São Paulo, por fornecer a bolsa PIBID que possibilitou execução dessa pesquisa.

REFERÊNCIAS

ANTUNES, F.A.F.; MILESSI, T.S.S.; CHANDEL, A.K. et al. Innovated approach to produce ethanol from sugarcane bagasse hydrolysate by immobilized cells of a xylose fermenting yeast isolated from Brazilian forest. In: Industrial, medical and environmental applications of microorganisms: current status and trends. ISBN: 978-90-8686-243-6, 2014.

BARUAH, J. Recent trends in the pretreatment of lignocellulosic biomass for value-added products. **Frontiers in Energy Research**, v. 6, p. 141, 18 dez. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fenrg.2018.00141>.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>. Acesso em: 22 out. 2022.

COP 21. Conference of the Parties. Janeiro, 2017.

GÍRIO, F.M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; MARQUES, S.; NIGAM, P.S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, p. 52-68, 2011.

MILESSI, T.S.S. Produção de etanol 2G a partir de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar utilizando *Saccharomyces cerevisiae* selvagem e geneticamente modificada imobilizadas. 2017. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, [s.l.], 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/nfscar:9179>.

OLGUIN-MACIEL, E. Consolidated bioprocessing, an innovative strategy towards sustainability for biofuels production from crop residues: an overview. **Agronomy**, v. 10, n. 11, p. 1834, 22 nov. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/agronomy10111834>.

PEREZ, Caroline Lopes. Produção de etanol 2G em reator de leito fixo e por bioprocessamento consolidado utilizado em leveduras de alta performance. 2021. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2021.