

REtenção de Enzimas Celulolíticas por Membranas Tubulares Impregnadas com Solução de PVDF e PA

**Carla Eliana Todero Ritter^{1,2}, Jéssica Bonatto², Rafaela Zortea², Jocelei Duarte²,
Mára Zeni², Aldo José Pinheiro Dillon¹**

1. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, UCS– Caixa Postal 1352, 95070–560, Caxias do Sul, RS, Brasil (cetodero@gmail.com)

2. Laboratório de Química de Materiais, Universidade de Caxias do Sul, UCS, 95070–560, Caxias do Sul, RS, Brasil

Recibido: Octubre 2014; Aceptado:

Resumo

A bioconversão de lignocelulósicos a etanol consiste em operações complexas que compreendem o pré-tratamento, a hidrólise, o cultivo, a separação e purificação de produtos. Uma maneira eficaz para reduzir a repressão catabólica pelos produtos da hidrólise e a inibição enzimática por produto e substrato, é o uso de membranas em operação de filtração. A membrana tubular BEGE impregnada com poli (fluoreto de vinilideno) (PVDF – 10%) apresentou resultados similares às membranas comerciais da Andritz (N5 e N10). A membrana tubular polimérica P4 impregnada com poliamida 66 (PA66 – 17%) apresentou redução do fluxo permeado e aumento na retenção de proteínas totais em relação à membrana P3 impregnada com PA66 (10%). A impregnação dos suportes tubulares por soluções poliméricas acarretou aumento na retenção de enzimas celulolíticas.

Palavras-chaves: membrana, celulases, *Penicillium*, PVDF, PA66

Abstract

Bioconversion of lignocellulosic ethanol consists of complex operations such as pre-treatment, hydrolysis, fermentation, separation and purification of products. An effective way to reduce hydrolysis by catabolite repression and enzymatic inhibition by product and substrate and products is the use of membranes in the filtration process. The BEGE tubular membrane impregnated with poly (vinylidene fluoride) (PVDF – 10%) gave results similar to commercial membranes Andritz (N5 and N10) results. The polymer P4 tubular membrane impregnated with polyamide 66 (PA66 – 17%) showed a decrease of permeate flux and an increase in retention of protein relative to total membrane impregnated with PA66 (10%) P3. The impregnation of tubular supports for polymer solutions resulted increase in the retention of cellulolytic enzymes.

Keywords: membrane, cellulases, *Penicillium*, PVDF, PA66

INTRODUÇÃO

A conversão de biomassa lignocelulósica em biocombustível deverá diminuir a dependência de fontes fósseis, assegurando maior estabilidade energética e mudança às agressões ambientais associados ao uso do petróleo. A biomassa lignocelulósica tem sido reconhecida como uma matéria-prima alternativa para a produção de bio-ethanol. Dada a demanda por energia, a possibilidade de se utilizar etanol em substituição a gasolina em motores de combustão é cada vez mais atraente, tendo o benefício adicional a redução nos níveis de emissão de gases de efeito estufa [1].

Celulase é o nome genérico para um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de celulose e celooligossacarídeos relacionados. A ação sinérgica dos três tipos de enzimas que compõem as celulases, endo-1-4-β-glucanase (EG, EC 3.2.1.4), celobiohidrolase (CBH, EC 3.2.1.91) e β-glicosidase (BGL, EC 3.2.1.21), é essencial para a hidrólise enzimática completa [2].

Estudos de PCR quantitativo mostraram que a celulose, lactose, celobiose, sorbose e soforose apresentam capacidade de indução de exoglucanases, endoglucanases e β-glicosidases [3], enquanto que celobiose e glicose diminuem significativamente a taxa de hidrólise de celulose e são

consideradas inibidores de enzimas celulolíticas causadores de repressão catabólica no fungo *Trichoderma reesei*.

A remoção de açúcares de rápido metabolismo durante a obtenção de celulases e xilanases pode aumentar a atividade enzimática no meio e reduzir o efeito da repressão catabólica. O referido processo pode ser realizado com o uso de membranas seletivas para retirada de inibidores, na produção de complexos enzimáticos, visando a tecnologia do bioetanol.

A separação utilizando membranas pode ocorrer por diferença na interação dos permeantes com o material que forma a membrana (mecanismo de sorção–difusão) ou por exclusão devido à diferença de tamanho entre as partículas ou moléculas. Na primeira situação as membranas são consideradas densas, ou seja, o transporte dos permeantes ocorre por processos difusivos através dos espaços intersticiais (volume livre) do material que forma a membrana. Na segunda situação as membranas são consideradas porosas e o transporte ocorre preferencialmente através dos poros, predominando o mecanismo de transporte convectivo. Desta forma, a aplicação de determinada membrana depende basicamente de sua morfologia e do material que a constitui [4].

Assim, este trabalho tem por objetivo a produção e caracterização de membranas de configuração tubular com suporte cerâmico e polimérico impregnados com PA66 e PVDF, e compará-las às membranas comerciais, avaliando-as em relação à permeabilidade e à seletividade na retenção de proteínas totais e enzimas celulolíticas.

MATERIAL E MÉTODOS

Polímeros utilizados no preparo das membranas. Os polímeros utilizados na preparação das membranas foram a poliamida 66 (PA66) comercial da *Alfa Química* e o poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF) *SOLEF 1015/0078* fornecido pela *Solvay Solexis*. O solvente para a PA66 foi o ácido clorídrico (HCl) 37% da *Merck do Brasil* e para o PVDF, o N’N-dimetilformamida (DMF) 99,8% fornecido pela *Vetec Química*. Os tubos cerâmicos foram fornecidos pela *Tecnicer Tecnologia Cerâmica Ltda*, e os tubos de polipropileno fornecidos pela *Union Ind. de Fibras Plásticas Ltda*.

Preparação das membranas. Os suportes tubulares cerâmicos de α-alumina (C), de sílica e α-alumina (BEGE) e poliméricos de polipropileno (P), foram impregnados com soluções de PA66 e PVDF em diferentes concentrações. A porosidade média dos suportes BEGE é de 5 µm, segundo método definido pela norma ASTM D4284 [5] e realizado no *Instituto de Materiais Cerâmicos* (IMC) da UCS.

A impregnação do suporte foi realizada durante 40 minutos a 40°C, somente externamente. A temperatura do banho de inversão de fase foi mantida 25°C, utilizando água destilada como não solvente durante 24 h (Tabela 1).

As membranas tubulares de suporte polimérico (polipropileno) e de suporte cerâmico (α-alumina) possuíam 8 mm de diâmetro interno, e 11 e 13 mm de diâmetro externo, respectivamente. O comprimento das mesmas de 198 mm e 210 mm para as membranas poliméricas e cerâmicas respectivamente.

Com objetivo de comparações, as membranas tubulares comerciais *Andritz*, N5 e N10, foram caracterizadas pela empresa com *cut off* molecular de $5 \cdot 10^3$ a $1 \cdot 10^4$ g·mol⁻¹, respectivamente. As membranas comerciais possuíam 6 mm de diâmetro interno e 250 mm de comprimento.

Ensaios a pressão reduzida com extrato enzimático. Os ensaios foram realizados, em de

sistema à pressão reduzida (580 mm Hg) e a temperatura de $20 \pm 5^\circ\text{C}$, com água e extrato enzimático proveniente de cultivo em estado sólido de *Penicillium echinulatum*. O extrato enzimático diluído e centrifugado a 4°C foi produzido com 1 g de celulose, 0,5 g de farelo de trigo e 1 mL de solução de sais [6]. Os ensaios utilizando somente os suportes cerâmicos e poliméricos foram realizados anteriormente a impregnação dos mesmos.

Tabela 1. Membranas com seus respectivos solventes e concentrações.

Membrana	Impregnação (solução polimérica)	Solvente
BEGE	SI	SI
BEGE I	PVDF(10%)	DMF
P0	Suporte de polipropileno	SI
P1	PVDF(10%)	DMF
P2	PA66(10%)	HCl
P3	PA66(17%)	HCl
C0	Suporte cerâmico	SI
C1	PVDF(10%)	DMF
C2	PA66(10%)	HCl
C3	PA66(17%)	HCl
N5	SI	SI
N10	SI	SI

SI: sem impregnação

Fluxo de permeado. Os ensaios de fluxo permeado foram realizados utilizando água destilada antes e após os ensaios com extrato enzimático. O fluxo segue expresso conforme a equação:

$$J = \frac{V}{A \cdot \Delta t} \quad (1)$$

sendo J fluxo de permeado ($\text{L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$), V volume (L), A área superficial da membrana (m^2) e Δt tempo de ensaio (h).

Os ensaios para determinar o fluxo de permeado foram realizados em duas etapas: a primeira succionando o extrato enzimático para fluir para dentro da membrana tubular com o auxílio de bomba a vácuo e o outro em modo crossflow com o auxilio de bomba *Carretos*, a fluxo constante.

Efeito do Fouling. A fim de analisar o efeito do *fouling* evidenciado pela redução do fluxo após o ensaio com extrato enzimático, os ensaios à pressão reduzida foram realizados em três etapas: inicialmente com água destilada, posteriormente com extrato enzimático e novamente com água destilada. Entre os ensaios, as membranas foram limpas por processo de limpeza química utilizando solução de hidróxido de sódio a 1,0% (m/v). O coeficiente de *fouling* (CF) denota o grau de obstrução dos poros da membrana após o ensaio. O CF foi obtido a partir de medidas do fluxo com água antes e após o teste com extrato enzimático. O índice foi calculado pela equação [7]:

$$C_f = \left(1 - \frac{J_w}{J'_w} \right) \cdot 100 \quad (2)$$

sendo C_f coeficiente de *fouling* (%), J_w fluxo permeado de água inicial ($\text{L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$) e J'_w fluxo

permeado de água após o ensaio com extrato enzimático ($L \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$).

Resistência total da membrana. A resistência total (R_t) da membrana foi expressa pela equação:

$$R_t = \frac{\Delta P}{\mu \cdot J_w'} \quad (3)$$

sendo R_t a resistência total ($m^2 \cdot L^{-1}$), ΔP a diferencial de pressão (Pa), μ a viscosidade da solução permeada (Pa·s), e J_w' : o fluxo de permeado do ensaio para determinação do efeito do *fouling* ($L \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$).

Análise enzimática e de proteínas totais. Para análise de retenção de enzimas celulolíticas por membranas tubulares determinou-se a atividade enzimática sobre papel-filtro (FPA). Para a dosagem de celulases, foi utilizada a análise de atividade enzimática sobre papel filtro [8], a dosagem de açúcares redutores foi realizada utilizando glicose como padrão [9] e para a determinação de proteínas totais utilizou-se metodologia definida por Bradford [10].

Aplicação de SDS-PAGE para detecção de proteínas. Para a determinação da massa molecular das proteínas das amostras e do permeado foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida (8,5 cm · 7,5 cm · 0,1 cm), contendo 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), 1,5 cm de gel de concentração 12% e 6 cm de gel para separação das proteínas 4% [10]. A corrida eletroforética foi realizada a 200 V por 1 h.

O tampão da amostra para proteínas possuía 2,5 mL de glicerol, 2 mL de solução de SDS 10%, 0,2 mL de solução de azul de bromofenol 0,5%, 1,25 mL de tampão Tris-HCl com pH 6,8 e 3,55 mL de água destilada.

Em microtubos de 2 mL foi feita a precipitação das amostras com acetona gelada (1:2) a –20°C por 15 min. Após as amostras foram centrifugadas e o *pellet* foi solubilizado em 0,025 mL de tampão da amostra e aplicado na canaleta do gel.

O marcador de massa molecular utilizado foi o *Precision Plus ProteinTM Standars All Blue (BioRad)*. A corrida eletroforética foi realizada em cuba vertical *BioRad Mini-Protean Tetra System®*.

A revelação das bandas do gel foi realizada por incubação do gel durante 30 minutos em solução de 0,2% de *Coomassie Brilliant Blue G 250*, 50% de etanol e 10% de ácido acético. Após, o gel foi lavado com água destilada e imerso em solução de 50% de etanol e 10% de ácido acético por 30 minutos. Este processo foi realizado sob agitação de 60 rpm e realizado em duplicita.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foram realizadas análises da superfície e da seção transversal das membranas com objetivo de verificar alterações na sua estrutura, resultantes do processo de preparação das mesmas. Para a observação da seção transversal as membranas foram cuidadosamente fraturadas em nitrogênio líquido. As amostras foram metalizadas com uma fina camada de ouro por *sputtering*, com tempo de exposição de 2 min. As análises foram realizadas utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura (MEV) marca *Shimadzu*, modelo SSX-550, com tensão de aceleração de 15 kV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observações da membrana por MeV. A morfologia da membrana C1 visualizada em MeV apresenta-se com uma camada bem definida de polímero sobre a estrutura cerâmica externa (Figura 1). Entretanto essa camada apresenta algumas irregularidades, o que pode estar relacionada com a

inversão de fases (Figura 1 A).

A estrutura da superfície das membranas depende fortemente das taxas de saída e entrada de solvente e não-solvente na solução polimérica, respectivamente. De acordo com *Chuang et al.*[12], a camada densa é formada quando o solvente presente na solução polimérica migra para o banho de coagulação antes que o não-solvente migre para a solução polimérica. A camada densa para de crescer quando não-solvente suficiente difunde nas subcamadas para a formação de poros. Caso contrário, ocorre formação de poros na superfície da membrana (Figura 1 C).

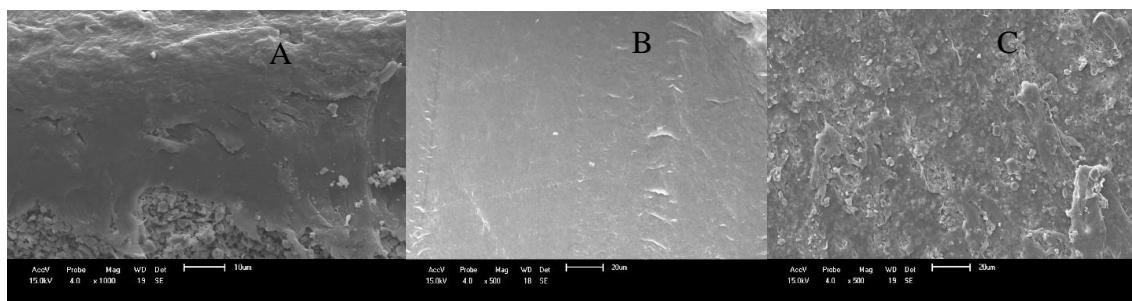


Figura 1. Micrografia de varredura eletrônica da membrana cerâmica C1.

Caracterização das membranas em relação ao fluxo permeado e ao fouling. A partir dos ensaios a pressão negativa realizados com membranas tubulares com água e com extrato enzimático, observou-se que o fluxo das membranas N5 e N10 reduziu drasticamente nos ensaios com extrato enzimático. O *fouling* reduziu o fluxo nas membranas N5 e N10 que apresentaram queda de 65 e 68%, respectivamente quando o ensaio foi realizado com extrato enzimático. Essa redução deve-se a obstrução dos poros da membrana em função do acúmulo de proteínas durante os ensaios com extrato enzimático e demais proteínas (Tabela 2).

Tabela 2. Fluxo máximo de permeado em ensaio a pressão negativa com água destilada inicial e com extrato enzimático para membranas tubulares comerciais N5 e N10, BEGE, BEGE I e P3.

	Fluxo em ensaio com água destilada ($\text{L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)	Fluxo em ensaio com extrato enzimático ($\text{L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)
N5	80	50
N10	120	70
BEGE	170	160
BEGE I	150	130
P3	43	38

A membrana P2 (PA66 10%) apresentou fluxo máximo de água de $957 \text{ L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ e após o ensaio com extrato, o efeito do *fouling* reduziu o fluxo para $648 \text{ L} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, apresentando assim maior fluxo e retenção de proteínas responsáveis por FPA em relação a BEGE. A redução do fluxo foi maior na membrana P3 (PA66 17%) em relação a P2 (Figura 2).

A impregnação da membrana BEGE I favoreceu a retenção de proteínas e de enzimas do complexo celulolítico (Tabela 2), quando comparada a BEGE sem impregnação, entretanto, o *fouling* reduziu o fluxo permeado em 89% (Tabela 3). Houve maior redução do fluxo de permeado para as membranas cerâmicas impregnadas com 10% de PA66 (C2) quando comparada à respectiva polimérica (P2). Essa redução pode estar associada a porosidade do suporte e à formação de filme aderido à mesma. Observou-se que com o aumento da concentração de poliamida houve

um decréscimo no fluxo de permeado de água (C2 e C3).

A membrana C1 apresentou CF menor que a P1 evidenciando que o filme polimérico reteve maior quantidade de partículas obstruindo os poros da mesma. As membranas N5 e N10 apresentaram resistências similares, entretanto a N10 apresentou maior CF (69%) em relação à membrana N5 (16%). Os ensaios repetitivos com meio completo produziram redução drástica no fluxo de permeado na membrana N5 (Figura 5B). O fluxo de permeado foi máximo ($300 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) quando a membrana estava isenta de partículas nos poros e velocidade de circulação de $3 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ e em diferentes velocidades de remoção do permeado (Figura 2). Após cinco ensaios com meio completo em circulação na membrana houve redução do fluxo máximo ($153 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) nas mesmas condições (Figura 2 C).

Tabela 3. Coeficiente do *fouling* (CF) nas membranas tubulares em ensaios realizados com água e extrato enzimático.

Membrana	Coeficiente do <i>fouling</i> – CF (%)	Resistência da membrana R_t $\text{m}^2\cdot\text{mL}^{-1}\cdot 10^{-9}$	Resistência devido ao <i>fouling</i> R_f $\text{m}^2\cdot\text{mL}^{-1}\cdot 10^{-9}$
BEGE	56	29,3	3,18
BEGEI	89	13,7	12,5
P1	48	ND	ND
P3	26	92,1	30,7
P4	70	4,93	1,44
C1	43	ND	ND
C4	63	ND	ND
C5	30	ND	ND
N5	16	3,19	1,81
N10	69	3,1	2,95

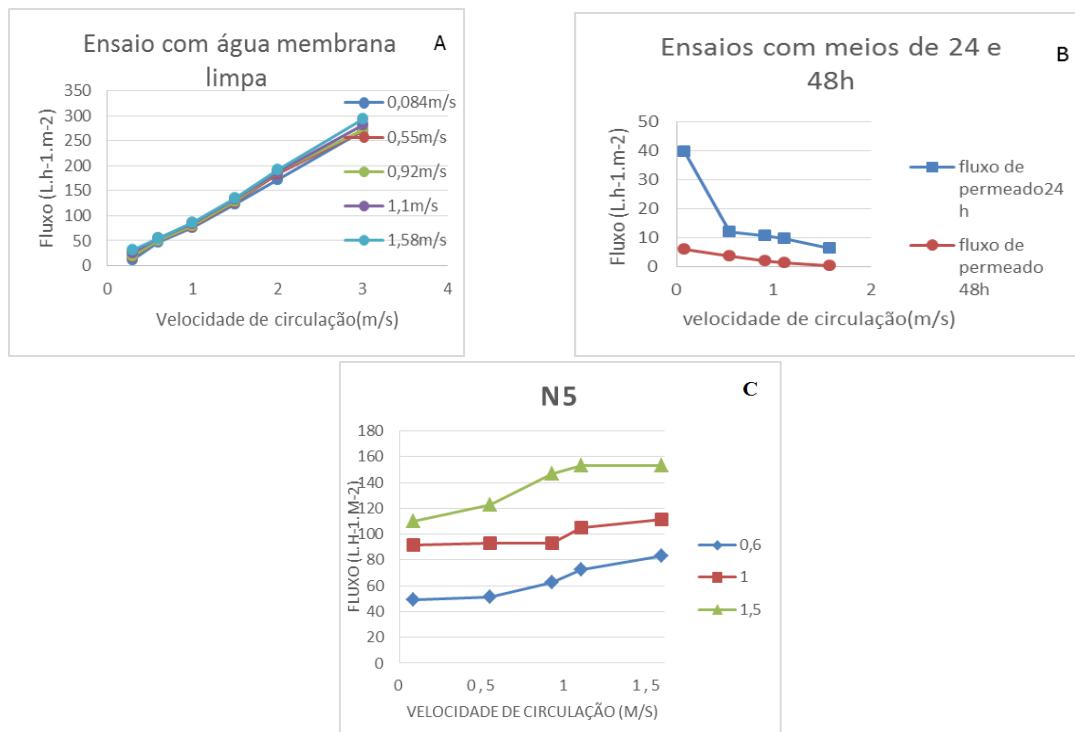


Figura 2. Fluxo de permeado em ensaio com meio completo utilizando membrana de nanofiltração.

Retenção de enzimas e proteínas totais. A retenção de enzimas celulolíticas por membranas durante o cultivo submerso, pode ser uma alternativa para que a remoção de inibidores produzidos durante a produção enzimática levando a um aumento da produtividade volumétrica do processo. Celobiose e glicose são inibidores que causam repressão catabólica em fungos e inibem a atividade enzimática de enzimas celulolíticas [13]. Sendo assim, açúcares redutores quando retirados durante a hidrólise podem ser novamente adicionados ao sistema para serem fermentados diretamente na produção de bioetanol [14].

O percentual de retenção de proteínas totais e de enzimas celulolíticas foi expresso em função das diferentes concentrações poliméricas utilizadas para a impregnação dos suportes das membranas tubulares (Tabela 4). Os ensaios com água destilada e extrato enzimático realizados nos suportes, previamente a impregnação, demonstraram que os suportes poliméricos apresentam maior fluxo permeado em relação aos cerâmicos, mas em relação à seletividade, o suporte cerâmico apresentou-se mais seletivo que o polimérico.

Tabela 4. Resultados da retenção de proteínas totais e enzimas celulolíticas pelas membranas tubulares impregnadas e comerciais.

Membrana	Retenção (%)	
	FPA	Proteínas Totais
BEGE	7	35
BEGE I	80	67
P0	25	18
P1	67	50
P2	28	56
P3	38	12
C0	12	15
C1	88	66
C2	54	16
C3	10	23
N5	81	43
N10	85	36

Observou-se que as membranas BEGE I e C1 apresentaram resultados de retenção de proteínas totais superiores às membranas comerciais N5 e N10 em ensaio com extrato enzimático. Enzimas de massa molecular superior a $75 \cdot 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ foram removidas pelas membranas BEGE e BEGE I, enquanto que a membrana P3 não reteve nem as enzimas maiores que $150 \cdot 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (Figura 1). Chauves *et al.* [15] citaram que a massa molecular aparente de β -glicosidases de *T. reesei* (BGL1) é de $117 \cdot 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, enquanto que a teórica é de $75 \cdot 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.

A remoção de parte da β -glicosidase implica em redução da atividade sinérgica do complexo celulolítico, uma vez que promovem a ruptura de ligações β -1-4 do dímero de celobiose em glicose. Matos [16] investigou o perfil proteico do sobrenadante de cultivo com bagaço de cana por *P. echinulatum* e verificou que xilanases apresentam bandas intensas entre a massa molecular de $60\text{--}70 \cdot 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ e de intensidades entre $100 \cdot 10^3$ e $55 \cdot 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. As membranas BEGE, BEGE I e C3 retiveram as enzimas xilanases de $10 \cdot 10^4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, mas não retiveram as de massa molecular maiores que as citadas (Figura 3).

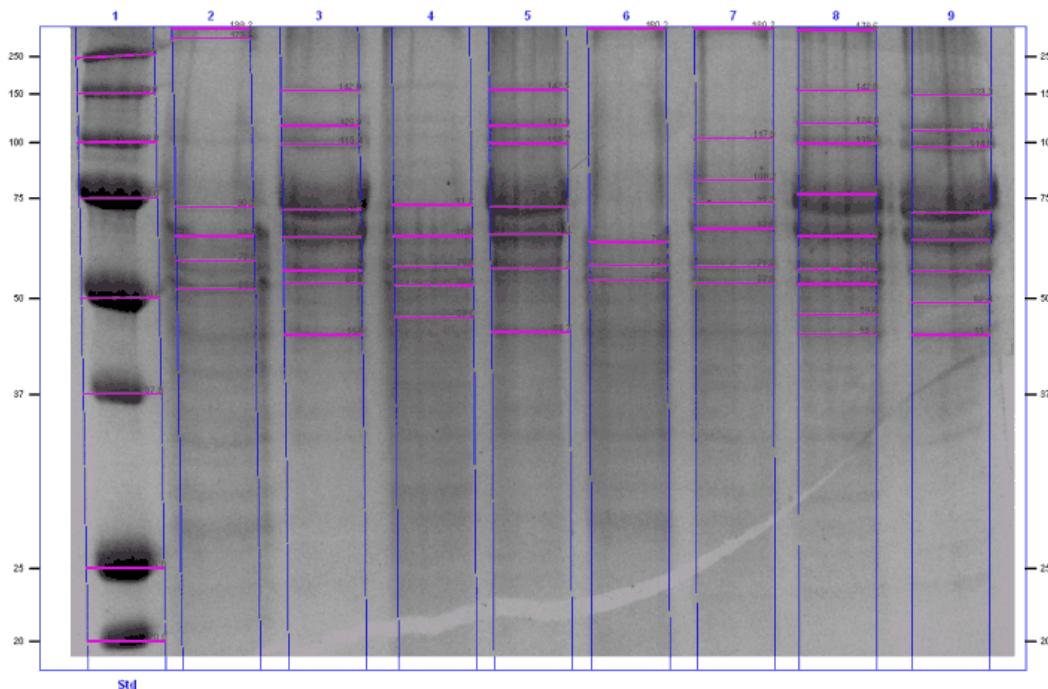


Figura 3. Zimograma de proteínas totais das membranas BEGE, BEGE I, C2 e P2. Da esquerda para direita: (1) marcador padrão, (2) BEGE permeado, (3) BEGE extrato, (4) BEGE I permeado, (5) BEGE I extrato, (6) C2 permeado, (7) C2 extrato, (8) P2 permeado, (9) P2 extrato.

CONCLUSÃO

Observou-se que a retenção de proteínas totais permite o uso das membranas de PVDF na remoção de inibidores que diminuem a atividade enzimática de celulases, aumentando a sua produtividade.

Agradecimentos. Os autores agradecem a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio técnico e financeiro na realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- [1] Camassola M, Dillon AJP, *J. Appl. Microbiol.*, **103**, 1204 (2007)
- [2] Martins LF, Kolling D, Camassola M, Dillon AJP, Ramos LP, *Bioresour. Technol.* **99**, 1417 (2008)
- [3] Verbeke J, Coutinho P, Mathis H, Quenot A, *Biotechnol Lett.*, **31**, 1399 (2009)
- [4] Costa ACM, *Tese*, COPPE-UFRJ (2009)
- [5] “ASTM D4284-12. Standard Test Method for Determining Pore Volume Distribution of Catalysts and Catalyst Carriers by Mercury Intrusion Porosimetry. Active Standard ASTM D4284”
- [6] Mandels M, Reese ET, *J. Bacteriol.*, **73**, 269 (1957)
- [7] Manttari M, Viikko K, Nystrom M, *J. Membrane Science*, **272**, 152 (2006)
- [8] Camassola M, Dillon AJP, *J. Analytical & Bioanalytical Techniques*, **1**, 1 (2012)
- [9] Miller G, *Anal Chem* **31**, 426 (1959)
- [10] Bradford MM, *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976)
- [11] Laemmli UK, *Nature*, **227**, 680 (2010)
- [12] Chuang W-Y, Young T-H, Chiu W-Y, Lin C-Y, *Polymer*, **41**, 5633 (2000)
- [13] Andrić P. et al. *Appl.Biochem.Biotechnol.*, **160**, 280 (2010)
- [14] Ishola MM, Jahandideh A, Haidarian B, Brandberg T, Taherzadeh M, *Bioresour. Technol.*, **133**, 68 (2013)
- [15] Chauve M, Mathis H, Huc D, Casanave D, Monot F, Ferreira NL, *Biotechnology for Biofuels*, **3**, 3 (2010)
- [16] Matos RWA. *Revista da Universidade de Brasília* (2012)