

## **Extração líquido-líquido de proteases de *Pleurotus albidus* (DPUA 1692) empregando sistema de duas fases aquosas (peg-fosfato)**

Martim SR<sup>1</sup>, Silva LSC<sup>1</sup>, Machado ARG<sup>1</sup>, Teixeira RA<sup>1</sup>, Santos-Ebinuma VC<sup>2</sup>, Cruz-Filho R F<sup>1</sup>,  
Teixeira MFS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, AM. <sup>2</sup>UNESP - Universidade Estadual Paulista - UNESP Emails: salomao.martim@gmail.com; larissasvetlanas@gmail.com; ritamachado.nutri@hotmail.com; raiane.aila@hotmail.com; - rfilho@ufam.edu.br; mteixeira@ufam.edu.br.lelacarvalho21@yahoo.com.br

### **Resumo**

No presente estudo, sistema de duas fases aquosas (SDFA) composto de polietilenoglicol (PEG) e fosfato de potássio foi utilizado para avaliar a influência da massa molar do PEG (MMPEG), concentração do PEG (CPEG) e concentração de fosfato (CFOSF) na partição da protease produzida por cultivo submerso de *Pleurotus albidus* DPUA 1692. As maiores CPEG e CFOSF exerceram efeitos positivos no rendimento de partição das proteases. Levando em consideração o fator de purificação foi observado que maiores valores de MMPEG, CPEG e CFOSF promoveram resultados superiores. As melhores condições de extração foram obtidas com 6000 g mol<sup>-1</sup> (MMPEG), 19,7 % (CPEG) e 17,7 % (CFOSF), que proporcionaram rendimento de 78,57 % e fator de purificação de 1,65. Os resultados obtidos neste estudo revelaram que maiores massas molares de PEG geram melhores resultados e que SDFA pode ser empregado como técnica de purificação de baixa resolução a fim de extrair proteases do meio fermentado de *Pleurotus albidus* DPUA 1692.

**Palavras-chaves:** purificação, cogumelo, enzima

## **Introdução**

O desenvolvimento de novos processos de extração e purificação de proteínas é uma etapa limitante na produção de bioprodutos. A extração líquido-líquido é um sistema formado por duas fases aquosas imiscíveis ou parcialmente miscíveis entre si, obtidas pela adição de polímeros hidrofílicos ou um desses polímeros e um sal (Porto et al., 2008). As proteases somam cerca de 60% do total de enzimas comercializadas mundialmente (Gupta et al., 2008). Esses biocatalisadores têm uma grande variedade de aplicações biotecnológicas, principalmente em formulação de detergentes, bebidas e processamento de alimentos, amaciamento de couro, tratamento de águas residuais e formulações médicas (Merheb et al., 2007). Os fungos fazem parte do grupo de organismos investigados quanto à produção destas enzimas, e como produtores destas moléculas apresentam muitas vantagens. Um desses benefícios se deve ao fato de que as enzimas produzidas são normalmente extracelulares, facilitando sua recuperação (Germano et al., 2003). O gênero *Pleurotus* compreende um grupo de cogumelos comestíveis de interesse comercial devido a seu sabor refinado, capacidade de produzir biocompostos antitumorais, antivirais, antibióticos, anti-inflamatórios, antioxidantes entre outros. O cultivo deste fungo vem crescendo devido principalmente a menor complexidade das técnicas de cultivo, e sua capacidade de adaptar-se a diferentes meios de crescimento, graças a sua capacidade em produzir uma grande variedade de enzimas (Campos et al., 2010; Lechner e Albertó, 2011). Porém, há carência de estudos reportando a purificação de proteases produzidas por *P. albidus* encontrados na Amazônia. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da massa molar do PEG (MMPEG), concentração do PEG (CPEG) e concentração de fosfato (CFOSF) no rendimento e na purificação de protease produzida por *P. albidus* DPUA 1692.

## **Material e Métodos**

Culturas viáveis e puras de *P. albidus* reativadas em ágar batata dextrose + extrato de levedura 0,5% (p/v) foram usadas neste trabalho. Para o bioprocessamento foram utilizados frascos Erlenmeyer (125 mL) nos quais foram adicionados 50 mL de meio de cultivo GYP que foram esterilizados por 15 minutos. Em seguida foram adicionados ao meio de cultivo discos miceliais de 5 mm de *P. albidus* e a fermentação submersa foi conduzida durante cinco dias, a 30 °C em agitador

orbital a 150 rpm. Posteriormente os extratos foram filtrados em papel de filtro comum. O filtrado foi submetido ao processo de extração líquido-líquido utilizando o sistema de duas fases aquosas (SDFA) que foi preparado utilizando solução de polietilenoglicol de diferentes pesos moleculares (550, 4000 e 6000), a 50%, solução de Sais de Fosfato de 40 % e extrato enzimático, constituindo uma massa total de 3 gramas. Em tubos cônicos graduados (15 mL), quantidades necessárias de PEG e de sal foram misturadas para a manutenção do pH 5,8 e, em seguida, o conteúdo destes tubos foi agitado em vortex, adicionando-se em seguida o extrato enzimático. Após agitação em vortex, os SDFA permaneceram em repouso até separação das fases. Posteriormente os volumes das fases foram medidos, as fases foram coletadas e analisadas quanto à concentração de proteínas totais utilizando-se o Kit Comercial Doles, Brasil. A atividade proteolítica foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Leighton et al. (1973) que utiliza azocaseína a 1% (p/v) como substrato enzimático. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorbância de 0,1 em 1 hora e expressa em U/mL. Para avaliação da purificação pelo SDFA foram avaliados os parâmetros (rendimento e fator de purificação).

## **Resultados e Discussão**

Para avaliação da purificação das proteínas pelo sistema de duas fases aquosas foram analisadas as respostas, rendimento e fator de purificação. Para o sistema composto por 550 g mol<sup>-1</sup>(MMPEG), 16,7 % (CPEG) e 14,8 % (CFOSF) não foram observados valores de rendimento extrativo e de fator de purificação. Com a utilização de PEG com massa molecular de 500 g mol<sup>-1</sup> foram observados apenas valores intermediários de rendimento e de fator de purificação. Em relação ao rendimento extrativo os três maiores valores deste parâmetro (62,08; 69,15 e 78,57) foram observados quando foram empregadas concentrações de 19,7 % (PEG) e 17,7 % (sais de fosfato), independentemente da massa molar de PEG utilizada no sistema. Os resultados obtidos neste estudo variaram de 3,93 % a 78,57 %. Os menores de rendimento foram observados quando foram empregadas 6000 g mol<sup>-1</sup>(MMPEG), 11,8 % (CPEG) e 9,8 % (CFOSF). Os maiores rendimentos (78,57%) observados para *P. albidus* obtidos foram verificados quando utilizou-se 6000 g mol<sup>-1</sup>(MMPEG), 19,7 % (CPEG) e 17,7 % (CFOSF). Em relação ao fator de purificação verificou-se que o maior (1,65) e o menor valor (0,08) do fator de

purificação foram obtidos com a utilização de 6000 g mol<sup>-1</sup>(MMPEG). O menor valor para este parâmetro foi observado com MMPEG (6000 g mol<sup>-1</sup>), CPEG (11,8 %), CFOSF (9,8 %), ao passo que o maior valor do fator de purificação foi encontrado quando foram utilizados MMPEG (6000 g mol<sup>-1</sup>), CPEG (19,7 %) e CFOSF (17,7 %). Houve incremento deste parâmetro com a elevação de (CPEG) e de (CFOSF).

O rendimento indica quanto (em %) da proteína de interesse ativa presente no material de partida foi recuperado ao final da purificação. Em relação a este parâmetro verificou-se que CPEG e CFOSF exerceram efeitos positivos, isso significa que o aumento de CPEG e CFOSF favoreceu o incremento deste parâmetro. Porém, a elevação da MMPEG não influenciou positivamente no rendimento extrativo das proteases excretadas por *P. albidus*. Este resultado difere daqueles obtidos por Ratanapongleka (2010) que ao utilizar PEG de baixas massas molares observaram elevação de 80 % no rendimento de lacases extraídas de *Agaricusbisporus*. Além disso, os resultados obtidos neste estudo são inferiores aos encontrados por Cavalcanti et al. (2008) que reportaram rendimentos de 168 % na extração de fosfolipase C utilizando SDFA composto por PEG/ fosfato. Segundo Mayerhoff et al. (2004) altos valores na recuperação dessas biomoléculas podem ser explicadas pela diminuição na concentração de inibidores enzimáticos e ativação da enzima pela interação com os componentes do sistema que podem favorecer a atividade enzimática. Quanto ao fator de purificação verificou-se influência positiva com a elevação dos parâmetros MMPEG, CPEG, CFOSF. Estes resultados corroboram com aqueles obtidos por Kirsch et al., 2012 que verificaram interação significativa e positiva entre MMPEG, CPEG e CFOSF, indicando que aumento simultâneo destas três variáveis contribuíram para melhorar o fator de purificação de proteases excretadas por *Lentinus citrinus*.

### **Conclusão**

O sistema de duas fases aquosas de PEG / fosfato aquosa revelou baixa eficiência na purificação total de proteases a partir de *P. albidus*, embora represente uma ferramenta simples, economicamente viável e promissora para uso nas etapas iniciais de processos de purificação enzimática.

### **Agradecimentos**

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e a Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior) pelo suporte financeiro.

### Referências Bibliográficas

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

Campos C, Dias DC, Valle JS, Colauto NB, Linde GA (2010) Produção de biomassa, proteases e exopolissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* em cultivo líquido. *Arq Ciênc Vet Zool* 13:19-24.

Cavalcanti MTH, Porto TS, Barros Neto B, Lima-Filho JL, Porto ALF, Pessoa Jr A (2006) Aqueous two-phase systems extraction of  $\alpha$ -toxin from *Clostridium perfringens* type A. *J Chromatogr B* 833:135-140.

Cavalcanti MTH, Porto TS, Barros Neto B, Lima-Filho JL, Porto ALF, Pessoa Jr A (2008) Purification of  $\alpha$ -toxin from *Clostridium perfringens* type A in PEG-phosphate aqueous two-phase systems: a factorial study. *J Chem Technol Biotechnol* 83:158-162

Germano S, Pandey A, Osaku CA, Rocha SN, Soccol CR (2003) Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. *Enzyme Microb Tech* 32:246-251.

Gupta A, Joseph B, Mani A, Thomas G (2008) Biosynthesis and properties of an extracellular thermostable serine alkaline protease from *Virgi bacillus pantothenicus*. *World J Microbiol Biotechnol* 24:237-243.

Kirsch LS, Pinto ACS, Teixeira MFS, Porto TS, Porto ALF (2012) Partition of proteases from *Lentinus citrinus* DPUA 1535 by the peg/phosphate aqueous two-phase system. *Quim Nova* 35:1912-1915.

Lechner BE, Albertó E (2011) Search for new naturally occurring strains of *Pleurotus* to improve yields. *Pleurotus albidus* as a novel proposed species for mushroom production. *Rev Iberoam Micol* 28:148-154.

Leighton TJ, Doi RH, Warren RAJ, Kelln RA (1973) The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* 76:103-122.

Mayerhoff ZDVL, Roberto IC, Franco TT (2004) Purification of xylose reductase from *Candida mogii* in aqueous two-phase systems. *Biochem Eng J* 18:217-223.

Merheb CW, Cabral H, Gomes E, Da-Silva R (2007) Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. *Food Chem* 104:127-131.

Nitsawang S, Hatti-Kaul R, Kanasawuda P(2006) Purification of papain from *Carica papaya* latex: Aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation. *Enzyme Microb Tech* 39:1103-1107.

Porto TS, Silva GMM, Porto CS, Cavalcanti MTH, Barros Neto B, Lima-Filho JL, Converti A, Porto ALF, Pessoa Jr A (2008) Liquid-liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. *Chem Eng Process* 47:716-721.

Ratanapongleka, K (2010) Recovery of Biological Products in Aqueous Two Phase Systems. *Int. J. Chem. Eng. Appl.*1:191-198.