

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Purificação de Xilanases de *Trichoderma stromaticum* AM7

Elck Almeida Carvalho^{1,2}, Laís Mendes dos Santos Goes², Ana Paula T. Uetanabaro²,
Andréa Miura da Costa²

¹Instituto Federal Baiano – Centro de Tecnologia de Alimentos

Caixa Postal 45680-000 Uruçuca – BA - E-mail: elckcarvalho@gmail.com

²Universidade Estadual de Santa Cruz – Departamento de Ciências Biológicas

Caixa Postal 45662 – 900 Ilhéus – BA - E-mail: amcosta@uesc.br

RESUMO

Novas xilanases foram produzidas a partir da fermentação do resíduo agroindustrial da pupunha pelo fungo *T. stromaticum* AM7. As xilanases foram purificadas após a precipitação com sulfato de amônio, seguido por cromatografias Mono-Q Sepharose e Sephacryl S-100. Os dois extratos obtidos (Xyl1 e Xyl2) foram analisados por SDS-PAGE. O extrato Xyl1 apresentou três bandas proteicas de pesos moleculares 26,6, 31,0 e 34,2 kDa e no extrato Xyl2 uma banda de 22 kDa.

Palavras-chave: hemicelulases, xilanases, purificação.

INTRODUÇÃO

O xilano é um importante componente das hemiceluloses de parede celular vegetal, estando presente em grandes quantidades nesses resíduos. A sua hidrólise é feita pela ação de várias enzimas, sendo a principal envolvida a endo- β -1,4 xilanases (EC 3.2.1.8) que fazem a hidrólise das ligações β -1,4 na cadeia principal do polissacarídeo (Santos e Hishii, 2011). Essas enzimas geradas no sistema podem ser extraídas e exploradas comercialmente, pois detém amplo emprego industrial.

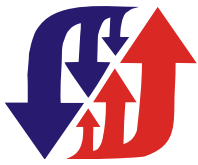
As xilanases vêm sendo bastante utilizadas na redução do uso do cloro no branqueamento de celulose, aumento do volume específico de produtos de panificação, redução da viscosidade e turbidez em cerveja, bioconversão da biomassa lignocelulósica em açúcares simples, aditivo na alimentação de monogástricos e na produção de diversos produtos químicos industriais, incluindo os biocombustíveis (Martín-Sampedro et al., 2011; Berekatain et al., 2013; Xin e He, 2013; Oliveira et al., 2014; Panwar et al., 2014).

A exploração de novas xilanases é uma importante fonte de recursos biotecnológicos e vislumbra alternativas para o mercado e suas diversas aplicações. Assim, nesse estudo buscou-se a purificação de novas enzimas xilanases contidas no extrato fermentativo de resíduo de pupunha pelo fungo *T. stromaticum* AM7 para potenciais utilizações industriais e biotecnológicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultura e condições de cultivo

O fungo *T. stromaticum* AM7 foi obtido da coleção da Almirante Cacau (Itajuípe, BA). A estirpe de fungo foi cultivada em ágar batata dextrose (BDA) a 30 ° C durante 6 dias. A fermentação em estado sólido (SSF) foi realizada com um inóculo de 10⁷ esporos gds⁻¹ de *T. stromaticum* AM7 em 25 g de resíduos agroindustrial de pupunha contendo 1% de farelo de soja e umedecido com água de torneira (1,5: 1 w/ v). Os cultivos foram realizados à 30 ° C por 6 dias e em seguida ressuspendidos em água, filtrados e centrifugados a 12.000 g a 4 ° C por 15 minutos. O sobrenadante foi utilizado para determinar a atividade enzimática.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Ensaio enzimático e quantificação de proteína

A atividade de xilanase foi verificada usando o método do ácido dinitrossalicílico (DNS) (Miller, 1959). Uma unidade de xilanase definida como a quantidade de enzima capaz de libertar 1 nmol de D-xilose nas condições de ensaio. A quantidade de proteína foi estimada pelo método de Bradford (1976) utilizando albumina bovina como padrão, e a absorbância de 280 nm foi utilizada para monitorizar a proteína nos eluatos da coluna.

Eletroforese em poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para verificar o peso molecular e a homogeneidade das frações proteicas foi utilizada a eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio (SDS) com 12,5% de poliacrilamida (Laemmli, 1970). Os padrões de massa molecular marca GE Healthcare (USA) foram utilizados como marcadores (97,0 kDa – Fosforilase B; 66,0 kDa – Soroalbumina bovina; 45,0 kDa – Ovoalbumina; 30,0 kDa – Anidrase carbônica; 20,1 kDa – Inibidor de tripsina; 14,4 kDa – α -Lactoalbumina).

Purificação de xilanase a partir de *T. stromaticum* AM7

As proteínas do sobrenadante foram concentradas através da adição de sulfato de amônio a 80% de saturação. O precipitado foi coletado por centrifugação a 15.000 g por 15 min., ressuspenso em tampão fosfato de sódio (pH: 8,0) e dialisado por 48h em sacos de diálise (porosidade 3-6 kDa), contra o mesmo tampão. O extrato foi submetido à coluna cromatográfica G-25 com um fluxo de 2mL/min e posteriormente foi aplicado em um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE), marca AKTA, em coluna de troca iônica Mono-Q 300 mm x 7,9 mm, com fluxo da fase móvel de 2,0 mL.min⁻¹. A enzima de interesse foi lavada da coluna com 50 mM de tampão fosfato de sódio, pH:8,0 e com gradiente contínuo de sal (0 - 1M). As frações com atividade enzimática foram unificadas, concentradas por liofilização, ressuspenso e aplicadas em coluna de filtração em gel Sephacryl S-100 (2,5 x 64 cm) equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, a uma taxa de fluxo de 0,32 mL.min⁻¹, sendo coletados frações de 2,0 mL.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

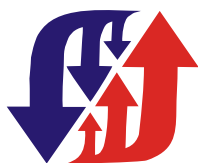
Produção e purificação de xilanas de *T. stromaticum* AM7

A produção do extrato enzimático foi obtido por fermentação em estado sólido por 6 dias à 32 graus, apresentando uma atividade de 1440 U/gds.

A análise das frações coletadas da coluna cromatográfica de troca iônica positiva Mono Q, demonstrou que as primeiras frações (1 e 2) da amostra eluída apresentaram elevados níveis de proteína e atividade de xilanase. O extrato resultante do primeiro pico da coluna de troca iônica foi considerado como única amostra e aplicada na coluna de purificação Sephacryl S-100 (Figura 01A). O perfil cromatográfico de eluição do extrato enzimático após a filtração em gel demonstrou dois picos de atividade de xilanase (Xyl1 e Xyl2) (Figura 01 B).

O fracionamento com sulfato de amônio (80% saturação) aumentou a atividade específica em 1,3 vezes, com 42% de recuperação da atividade de xilanase. Ao final do processo de purificação, obtivemos um grau de purificação de 84,6 e 329,1 vezes para Xyl1 e Xyl2 e um rendimento de 3,25 e 6,70, respectivamente. A fração Xyl2 apresentou maior atividade específica para xilanase comparado à Xyl1 (Tabela 01).

As frações de Xyl1 e a Xyl2 foram analisados em gel SDS-PAGE e Xyl1 apresentou três bandas com massa molecular de aproximadamente 26,6, 31,0 e 34,2 kDa e Xyl2 uma banda única com massa molecular de 22 kDa (Figura 02).



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

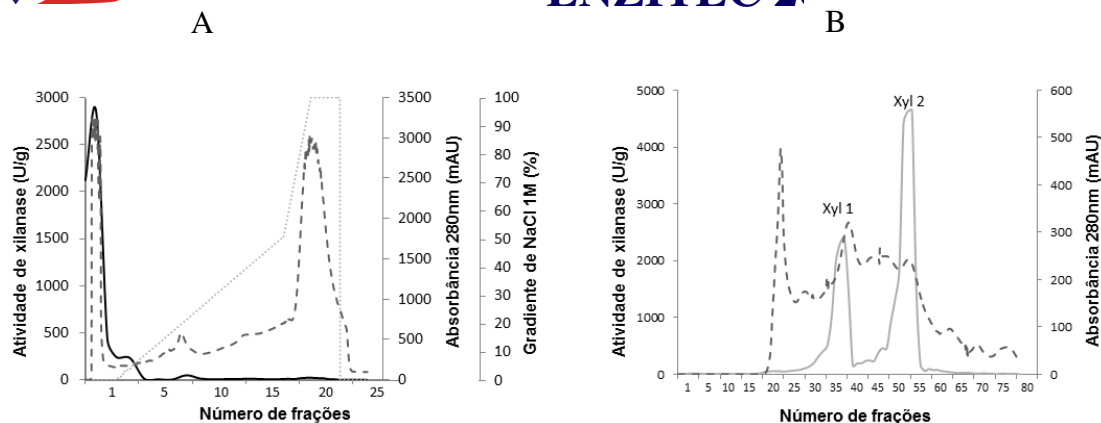


Figura 01 – Perfil de eluição de xilanases de *T. stromaticum* AM7 em: A) Mono Q -Sepharose e B) Sephacryl S-100. (—) atividade de xilanase, (- -) perfil de proteína a 280 nm e (.....) gradient de concentração de NaCl 1M no eluente (0-100%).

Este estudo proporcionou resultados melhores em termos de vezes de purificação, bem como de recuperação em comparação com os obtidos com *Streptomyces* sp. CS624 e *Trichoderma inhamatum* (Mander et al., 2014 e Silva et al., 2015), os quais apresentaram a purificação de 3,7 e 5,3 vezes, com recuperação de 24 e 12%, respectivamente.

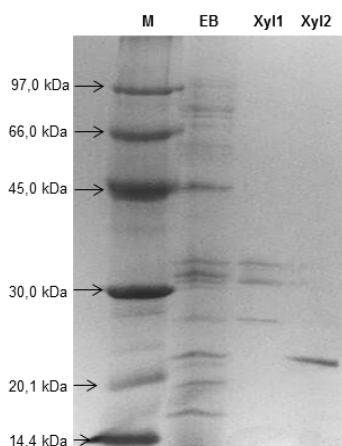


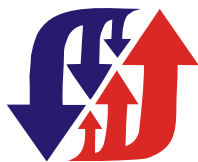
Figura 02 – SDS-PAGE análise of xilanase de *T. stromaticum* AM7. Linha 1: Marcador Molecular; Linha 2: Extrato bruto (EB) e Linha 3: Xyl1; Linha 3: Xyl2.

As xilanases de *Trichoderma stromaticum* exibiram altas atividades específicas tanto para o extrato Xyl1 como para Xyl2 (9233,2 e 35937,5 U/mg) (Tabela 01). Estudos realizados com *Aspergillus niger* DFR-5 e *Thielaviopsis basicola* MTCC1467 apresentaram atividades específicas inferiores (1399 e 1360 U/ mg, respectivamente) nas enzimas purificadas (Pal e Khanum, 2011 e Goluguri et al, 2016).

Tabela 01 – Purificação de xilanases de *T. stromaticum* AM7

Passos de purificação	Atividade total (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Purificação (vezes)	Recuperação (%)
Extrato Bruto	253854,4	2324,7	109,2	1,0	100,00
(NH ₄) ₂ SO ₄	106816,0	749,9	142,4	1,3	42,08
Sephadex G-25	101712,3	562,4	180,9	1,7	40,07
Mono Q Sepharose	47756,5	208,8	228,7	2,1	18,81
Sephacryl S-100	8260,0	0,9	9233,2	84,6*	3,25
	16905,0	0,5	35937,5	329,1**	6,70

* Xyl 1; ** Xyl 2.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

CONCLUSÕES

Ao final das etapas de purificação obtivemos duas frações xilanásicas Xyl1 e Xyl2. O extrato Xyl1 apresentou 3 bandas proteicas e a Xyl2 apresentou 1 banda proteica com altos valores de atividade de xilanase. Ambas apresentaram alto rendimento de purificação e atividade específica, sendo ótimas candidatas a futuras aplicações biotecnológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barekatin MR, Antipatis C, Choct M, Iji PA. 2013. Interaction between protease and xylanase in broiler chicken diets containing sorghum distillers dried grains with soluble animal feed. *Sci. Technol.* 182, 71-81.
- Bradford MM. 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.
- Goluguri, BR, Thulluri C, Addepally U, Shetty P. 2016. Novel alkali-thermostable xylanase from *Thielaviopsis basicola* (MTCC 1467): Purification and kinetic characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*. Volume 82, p. 823–829.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, n. 15, p. 680-685.
- Mander P, Choia YH, Pradeep GC, Choia YS, Honga JH, Chob SS, Yoo JC. 2014. Biochemical characterization of xylanase produced from *Streptomyces* sp. CS624 using an agro residue substrate. *Process Biochemistry* 49, 451–456.
- Martín-Sampedro R, Eugenio ME, Villar JC. 2011. Biobleaching of *Eucalyptus globules* kraft pulps: comparison between pulps obtained from exploded and non-exploded chips. *Bioresource Technol.* 102 (6), 4530–4535.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426-428.
- Oliveira DS, Telis-Romero J, Da-Silva R, Franco CML. 2014. Effect of a *Thermoascus aurantiacus* thermostable enzyme cocktail on wheat bread quality. *Food Chem.* 143, 139-146.
- Pal A, Khanum F. 2011. Efficacy of xylanase purified from *Aspergillus niger* DFR-5 alone and in combination with pectinase and cellulase to improve yield and clarity of pineapple juice. *J Food Sci Technol.* 48(5), 560–568.
- Panwar D, Srivastava PK, Kapoor M. 2014. Production, extraction and characterization of alkaline xylanase from *Bacillus* sp. PKD-9 with potential for poultry feed. *Biocatal Agric. Biotechnol.* 3, 118-125.
- Prakash B, Vidyasagar SK, Jayalakshmi SK, Sreeramulu K. 2012. Purification and some properties of low-molecular-weight extreme halophilic xylanase from *Chromohalobacter* sp. TPSV 101. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 74, 192-198.
- Santos LF, Hishii PL. 2011. Xylanases: Methodologies and kinetic parameters. *J. Biotechnol. Biodivers.* 2, 7-15.
- Silva, LAO, Terrasan, CRF, Carmona, EC. Purification and characterization of xylanases from *Trichoderma inhamatum*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18 (2015) 307–313.
- Xin F, He J. 2013. Characterization of a thermostable xylanase from a newly isolated *Kluyvera* species and its application for biobutanol production. *Bioresource Technol.* 135, 309-315.