

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Caracterização de uma β -xilosidase do fungo *Ceratocystis fimbriata* RM 35 e sua utilização na Hidrólise do Bagaço de cana-de-açúcar

Marcele Pandeló Martins¹, Rafaela Zandonade Ventorim¹, Roberta Ribeiro Coura¹,
Gabriela Pícolo Maitan-Alfenas¹, Valéria Monteze Guimarães¹

¹Universidade Federal de Viçosa – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
36570-000 Viçosa-MG
E-mail: marcelepandelo@hotmail.com

RESUMO

Este trabalho tem por objetivo a produção, purificação e caracterização de uma β -xilosidase de *Ceratocystis fimbriata*, além da avaliação de seu efeito combinado com uma xilanase na hidrólise da xilana beechwood. Esta enzima foi usada na suplementação do coquetel comercial Multifect CL Genecor® para hidrólise do bagaço-de-cana pré-tratado alcalino. A β -xilosidase apresenta massa molecular de 161,1 e 204,2 kDa, estimadas por SDS-PAGE e gel filtração, respectivamente. A enzima mostrou atividade máxima em pH 3,9 e 65 °C, e foi estável a 60 °C durante 24 h. Os valores de K_m e $V_{máx}$ foram 0,326mM e $0,91 \times 10^{-3} \mu\text{mol}/\text{min}$, respectivamente, com o substrato pNP- β -D-xilopiranosídeo. A suplementação do Multifect CL Genecor® com a β -xilosidase promoveu aumento de 97,7% e 45,7% na liberação de glicose e xilose a partir do bagaço-de-cana pré-tratado. Resultados indicam que a β -xilosidase de *C. fimbriata* tem potencial para uso biotecnológico, sendo uma alternativa promissora e econômica para indústria de bioetanol.

Palavras-chave: β -xilosidase, *Ceratocystis fimbriata*, Caracterização, Sacarificação, Bagaço de cana-de-açúcar.

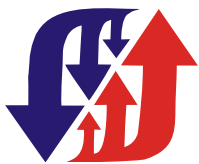
INTRODUÇÃO

A xilana é um polissacarídeo constituído de resíduos de xilose em ligação β -1,4 e sua hidrólise é um processo complexo que envolve diversas enzimas, principalmente as endoxilanases (EC 3.2.1.8) e β -xilosidases (EC 3.2.1.37). As xilanases hidrolisam ligações glicosídicas β -1,4 entre unidades de xilose, gerando como produto xilo-oligossacarídeos, que são hidrolisados pelas β -xilosidases, resultando em monômeros de xilose (Sunna *et al.*, 1997).

As xilanases e β -xilosidases são enzimas de interesse industrial para hidrólise ou bioconversão de resíduos lignocelulósicos a açúcares simples (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2014), além de apresentarem grande potencial de aplicação na indústria de papel e celulose (Beg *et al.*, 2001).

O fungo fitopatogênico *Ceratocystis fimbriata* foi descrito como sendo uma fonte viável para produção de hemicelulases. Portanto, sua utilização para produção de β -xilosidases extracelulares pode ser uma alternativa viável e produtiva.

Ultimamente, um dos desafios mundiais é a produção de energia limpa e sustentável, especialmente de combustíveis líquidos de fácil transporte e que possam ser utilizados como fonte de energia para movimentação. A bioconversão de resíduos lignocelulósicos a açúcares simples apresenta enorme potencial para produção de biocombustíveis devido a sua grande disponibilidade na natureza e baixo custo. Desse modo, o estudo de enzimas que degradam a



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

biomassa lignocelulósica torna-se de alta relevância. Portanto, a caracterização de β -xilosidases produzidas pelo fungo *C. fimbriata*, e a avaliação dos potenciais de utilização juntamente com xilanases, podem ser uma alternativa promissora e econômica para incrementar coquetéis comerciais e melhorar a qualidade dos processos industriais.

O objetivo deste trabalho foi produzir uma β -xilosidase a partir do fungo *C. fimbriata*, purificar, caracterizar bioquimicamente, além de verificar seu efeito combinado com uma endoxilanase na hidrólise de xilana beechwood. Esta enzima também foi avaliada na suplementação do coquetel comercial Multifect CL Genecor® para hidrólise do bagaço-de-cana pré-tratado.

MATERIAL E MÉTODOS

O fungo *C. fimbriata* foi cultivado por 168 h a 28 °C em meio mineral contendo 1,5% de farelo de trigo como fonte de carbono. O sobrenadante foi utilizado como fonte de β -xilosidase. A enzima foi purificada por cromatografia de troca iônica DEAE Sepharose seguida de ultrafiltração em membrana com poro de exclusão de 3 kDa e posterior gel filtração Sephacryl S-300, sendo então caracterizada bioquimicamente quanto ao efeito da temperatura, pH e termoestabilidade. O grau de pureza foi verificado através de eletroforese em gel de poliacrilamida (12%), contendo SDS, segundo Laemmli (1970).

Da fração obtida da troca iônica, foram realizados dois ensaios de hidrólise com a xilana beechwood 0,5%, um utilizando as duas enzimas (xilanase e β -xilosidase), e o outro contendo somente a xilanase. Os produtos de hidrólise foram detectados e quantificados em HPLC.

A sacarificação do bagaço-de-cana pré-tratado com NaOH 1,5% foi conduzida por 72 horas, usando o coquetel comercial Multifect CL Genecor® suplementado com a fração de β -xilosidase obtida da troca iônica. Alíquotas foram coletadas em intervalos de tempo e os produtos de hidrólise foram analisados em HPLC.

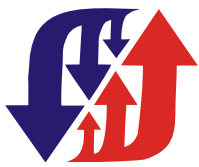
RESULTADOS E DISCUSSÕES

O fungo *C. fimbriata* foi capaz de produzir a enzima β -xilosidase, cujo peso molecular estimado por SDS-PAGE foi de aproximadamente 161,1 kDa, e cerca de 204,2 kDa, por gel filtração (FIGURA 1). A TABELA 1 resume as etapas de purificação realizadas.

Tabela 1. Resumo das etapas da purificação da β -xilosidase extracelular de *C. fimbriata* RM 35.

Etapas	Proteína (mg)	Atividade (U)	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação (X)	Rendimento (%)
Extrato bruto	10,5	14,40	1,37	1	100
DEAE-Sepharose	1,54	13,90	9,03	6,58	96,5
Sephacryl S-300	0,15	3,86	25,09	18,29	26,8

A enzima purificada mostrou atividade máxima em pH 3,9 e 65 °C, e foi estável a 60 °C durante 24 h. Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$, utilizando o substrato pNP- β -D-Xilopiranosídeo foram 0,326mM e $0,91 \times 10^{-3}$ μ mol/min, respectivamente. A atividade enzimática foi parcialmente inibida por sulfato de cobre II, III, cloreto de alumínio, SDS e xilose, nas



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

concentrações de 1 mM e 10 mM. A enzima mostrou atividade com o substrato sintético pNP- β -D-Xilopiranosídeo e menor com pNP- β -D-Glicopiranosídeo, evidenciando atividades de xilosidase e glicosidase, importantes para aplicação dessa enzima na hidrólise de hemicelulose da parede vegetal, visto que este polímero, em especial a xilana, é altamente complexo, apresentando ramificações com variados resíduos de açúcares.

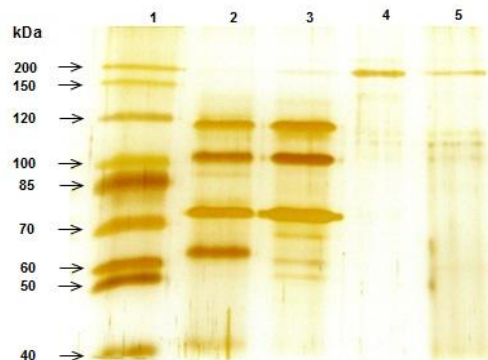


Figura 1. Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 12,0 %) das amostras contendo β -xilosidase extracelular de *C. fimbriata* RM 35. 1- marcador de massa molecular, 2 - extrato bruto, 3 - fração enzimática proveniente troca aniônica Sepharose-DEAE, 4 - fração enzimática proveniente de filtração em gel, 5 - fração enzimática proveniente da eletroforese em gel não desnaturante. A revelação do gel foi realizada com nitrato de prata.

A β -xilosidase parcialmente purificada foi utilizada em combinação com uma xilanase mutante para degradação da xilana beechwood. O efeito aditivo desta enzima com a xilanase foi comprovado pela detecção de xilose ($0,037 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e pela maior quantidade de xilo-oligossacarídeos gerados ao final do ensaio contendo as duas enzimas (FIGURA 2). Os xilo-oligossacarídeos gerados pela ação da xilanase foram eficientemente hidrolisados pela β -xilosidase, gerando xilose como produto final.

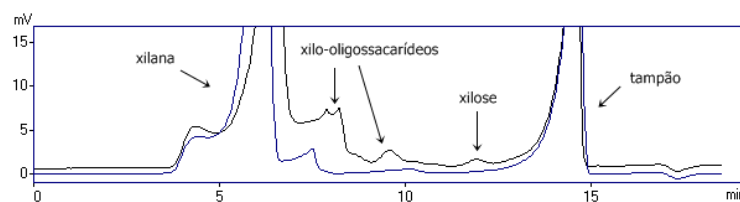
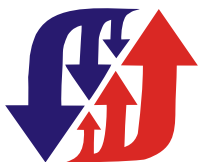


Figura 2. Comparação dos produtos de hidrólise gerados pelos ensaios com as duas enzimas (β -xilosidase e xilanase) em preto, e somente com a xilanase (em azul), analisados em HPLC.

A suplementação de β -xilosidase no coquetel comercial Multifect CL® promoveu maior eficiência na hidrólise do bagaço-de-cana pré-tratado alcalino, e foram observados aumentos de 97,7% e 45,7% nas concentrações de glicose e de xilose, respectivamente, em comparação com a sacarificação contendo apenas o coquetel comercial (FIGURA 3). Esse efeito se deve principalmente ao fato do coquetel enzimático comercial Multifect CL Genencor® ser deficiente em β -xilosidase, o que dificulta a hidrólise de xilo-oligossacarídeos (oriundos da xilana) à xilose. A maior quantidade de monossacarídeos gerados revela o potencial da β -xilosidase de *C. fimbriata* de aumentar a eficiência do processo de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar para produção de bioetanol.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

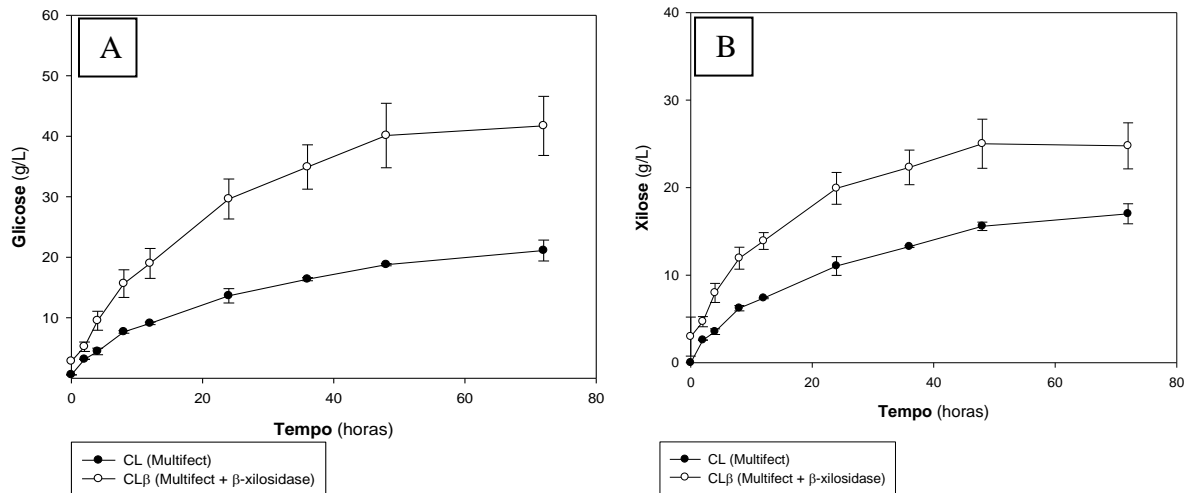


Figura 3. Liberação de glicose (g.L^{-1}) (A) e liberação de xilose (g.L^{-1}) (B) em função do tempo para a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado alcalino utilizando o coquetel comercial Multifect CL Genencor® (CL) (—●—) e coquetel comercial Multifect CL Genencor® com a β -xilosidase (CL β) (—○—).

CONCLUSÕES

O fungo *Ceratocystis fimbriata* RM 35 produziu, em meio contendo farelo de trigo, a enzima β -xilosidase extracelular ácida. O efeito aditivo da β -xilosidase com a xilanase mutante na degradação da xilana beechwood foi comprovado pela liberação de xilose e pela maior quantidade de xilo-oligossacarídeos gerados. A suplementação de β -xilosidase no coquetel comercial Multifect CL Genencor® incrementou a eficiência na hidrólise do bagaço-de-cana pré-tratado alcalino em comparação com a sacarificação contendo apenas o coquetel comercial Multifect CL Genencor®. Esses resultados indicam que a β -xilosidase de *C. fimbriata* tem potencial para uso biotecnológico, especialmente para sacarificação de biomassa e produção de etanol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Beg QR, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal GS. 2001 Microbial xylanases and their industrial applications: A review. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 56, 326–338

Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–683.

Pérez-Rodríguez N, Oliveira F, Pérez-Bibbins B, Belo I, Agrasar AT, Domínguez, J M. 2014 Optimization of Xylanase Production by Filamentous Fungi in Solid-State Fermentation and Scale-up to Horizontal Tube Bioreactor. *Appl Biochem Biotechnol* 173(3):803-25

Sunna A, Antranikian G. 1997 Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit Rev Biotechnol* 17:39–67