

CARACTERIZAÇÃO DA XILANO FERULOIL ESTERASE DE *CLOSTRIDIUM THERMOCELLUM*

Renata Costa Sinzker (PIBIC/CNPq/UEM), Dyoní Matias de Oliveira, Wanderley Dantas dos Santos (Orientador), e-mail: resinzker@yahoo.com.br

Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências Biológicas/Departamento de Bioquímica/Maringá, PR.

Ciências Biológicas II/Bioquímica

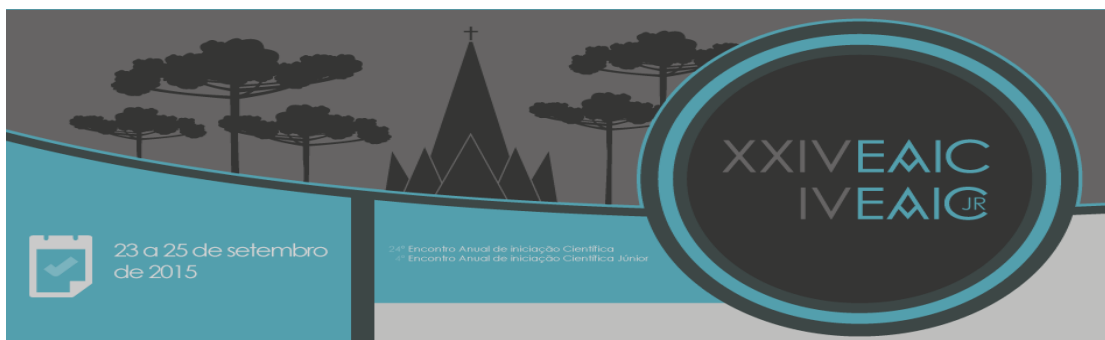
Palavras-chave: ex.: Lignocelulose; Ácido ferúlico; Etanol celulósico.

Resumo:

O etanol pode ser produzido a partir dos açúcares que compõem a biomassa lignocelulósica (bagaço e palha) utilizando-se processos capazes de promover a sacarificação dos polissacarídeos. A sacarificação enzimática baseia-se na aplicação de polissacaridases e enzimas acessórias visando hidrolisar as ligações glicosídicas dos polissacarídeos para produzir açúcares fermentáveis. O ácido ferúlico desempenha um papel fundamental na arquitetura da parede celular de gramíneas interligando polissacarídeos, proteínas e lipídeos. Feruloil esterases (FAEs) são capazes de quebrar a esterificação entre resíduos de ácido ferúlico e arabinoxilanos. A aplicação de feruloil esterase (FAE_{xynZ}) de *Clostridium thermocellum* pode aumentar a eficiência dos coquetéis enzimáticos voltados à sacarificação da biomassa lignocelulósica em gramíneas contribuindo para o desenvolvimento de uma sociedade sustentável.

Introdução

No Brasil, o etanol é produzido a partir da fermentação da sacarose contida no caldo da cana-de-açúcar. A biomassa residual gerada pela usina é utilizada como combustível para caldeiras ou revendida como ração animal. Entretanto, o bagaço é constituído essencialmente por polissacarídeos que podem ser hidrolisados para produzir açúcares fermentáveis e posteriormente em etanol (Buckeridge et al., 2010). Este combustível é denominado de etanol de segunda geração ou etanol celulósico já em produção no país desde 2014. A lignocelulose é constituída por 35-50% de celulose, 20-35% de hemicelulose 15-30% e lignina (Sierra et al., 2008). A celulose é um homopolissacarídeo constituído por unidades de D-glicose unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$, sendo o principal constituinte da parede



celular (Canilha et al., 2010). A hemicelulose é um heteropolissacarídeo ramificado cujas cadeias principais podem ser formadas por glucanos, xilanos e mananos que podem ser ramificados açúcares, oligossacarídeos, ácidos urônicos e ácidos hidroxicinâmicos. A principal hemicelulose das gramíneas, como a cana-de-açúcar são glucuronoarabinosilanos feruloilados (FA-GAX). A lignina está presente na parede secundária de tecidos especializados. Ela confere resistência mecânica e proteção contra o ataque de enzimas, constituindo a fração não polissacarídica mais abundante da lignocelulose. Formada pela ligação covalente de álcoois hidroxicinâmicos, a lignina pode formar ligações covalentes com a hemicelulose ao polimerizar-se com o ácido ferúlico (FA) dos FA-GAX (Buckeridge et al., 2010).

Entre as várias enzimas que podem ser utilizadas para aumentar a eficiência dos coquetéis enzimáticos voltados à digestão de paredes celulares, as feruloil esterases (FAEs) merecem atenção especial. Estas enzimas agem de forma sinérgica com xilanases e celulases potencializando o processo de sacarificação da biomassa. As FAEs quebram as ligações éster entre o FA e o arabinosilano e certas pectinas presentes na parede celular vegetal. Esta atividade desagrega os polímeros interligados via FA permitindo o acesso de xilanases. A feruloil esterase (FAE_{XynZ}) de *Clostridium thermocellum* apresenta peso molecular de 28 kDa (Blum et al., 2000). O gene da FAE_{XynZ} foi previamente inserido no vetor de clonagem e expressão pET28a e transformado em *E. coli* BL21 pelo grupo de pesquisa em Biologia Molecular do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE/Campinas) e gentilmente cedido para a realização deste projeto.

Materiais e métodos

Expressão da proteína heteróloga: O pré-inóculo de *E. coli* BL21 contendo o vetor pET28a foi transferido para um Erlenmeyer de 1 L, contendo 250 mL de meio LB com 50 µg/mL de canamicina e incubado em shaker a 200 rpm a 37° C. Após 4 h de indução com 0,5 mM de IPTG, a amostra foi centrifugada a 8900 g por 30 min a 4° C. **Lise da célula:** O *pellet* foi ressuscitado em 20 mL de tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 adicionando-se 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil e 0,5 mg mL⁻¹ de lizozima. A suspensão foi incubada à temperatura ambiente durante 30 min sob leve agitação. Em seguida, a amostra foi sonicada e centrifugada a 8000 g por 30 min a 4° C, e o sobrenadante purificado em coluna de afinidade a Ni⁺². **Ensaio de digestibilidade da parede celular:** quinze mg de bagaço de cana (resíduo insolúvel em etanol) foram incubados com XynZ 30 µg/mL em fosfato de sódio 67 mM, pH 6,0 por 24 h a 50° C. A atividade enzimática foi determinada pela produção de FA e *p*-CA. **Conteúdo de hidroxicinamatos:** Após a digestão enzimática, amostras do sobrenadante foram injetadas em um cromatógrafo Shimadzu (Tokyo) equipado com um detector de arranjo de diodos. Os



compostos foram separados em coluna C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m; Shimpack CLC-ODS (M); Shimadzu), usando metanol:ácido acético 4% em água (30:70 v/v) como fase móvel em fluxo de 1,0 mL/min em corrida isocrática. Os compostos foram quantificados pelas áreas dos picos detectados pela absorção de luz UV em 322 nm, para o FA e 309 nm, para o *p*-CA em comparação com o tempo de retenção e as áreas de padrões.

Resultados e Discussão

A fração FA e *p*-cumárico *p*-CA esterificados aos arabinosilanos da parede celular de folha e colmo de cana de açúcar foi extraída por saponificação (extração alcalina) e o conteúdo de hidroxicinamatos determinado por HPLC (Fig. 1).

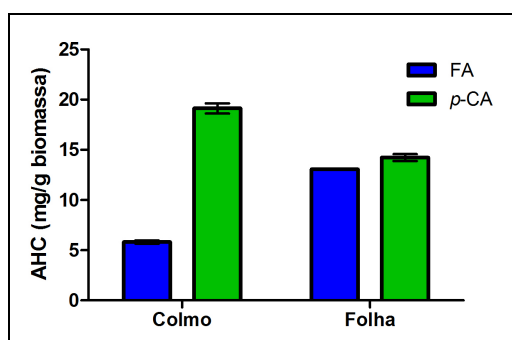


Figura 1. Conteúdo de ácidos hidroxicinâmicos (AHC) extraídos da biomassa de cana-de-açúcar com NaOH 0,1 M. FA: ácido ferúlico; *p*-CA: ácido *p*-cumárico. Valores expressos em microgramas de AHC por grama de biomassa (N = 3 \pm EPM).

A figura 2 apresenta a produção de FA e *p*-CA catalisado pela FAE_{xynZ} a partir de folha (palha) e colmo (bagaço) de cana-de-açúcar. Os ensaios demonstraram que a FAE_{xynZ} possui capacidade de liberar FA e *p*-CA a partir de diferentes fontes de parede celular. A enzima liberou 6,3% (31,7 \pm 0,34 μ g/g biomassa) do total de FA esterificado a parede celular do colmo (504,9 \pm 46,4 μ g/g biomassa) e 3,6% (31,0 \pm 0,37 μ g/g biomassa) do total de FA esterificado a parede celular da folha (861,1 \pm 155,21 μ g/g biomassa). A FAE_{xynZ} também extraiu uma pequena fração, 0,8% (7,57 \pm 0,43 μ g/g biomassa) e 0,9% (7,45 \pm 0,37 μ g/g biomassa) do *p*-CA esterificado a parede celular do colmo (934,25 \pm 31,84 μ g/g biomassa) e folha (837,76 \pm 49,10 μ g/g biomassa). Demonstrando que a FAE_{xynZ} possui maior afinidade pelos arabinosilanos feruloilados (Benoit et al., 2006).

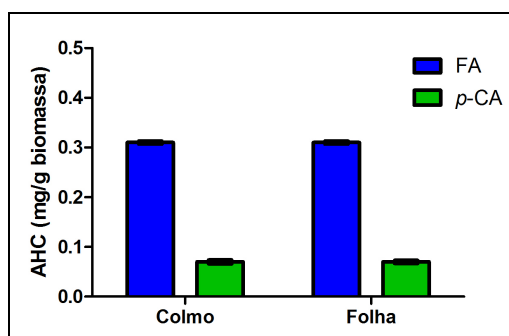
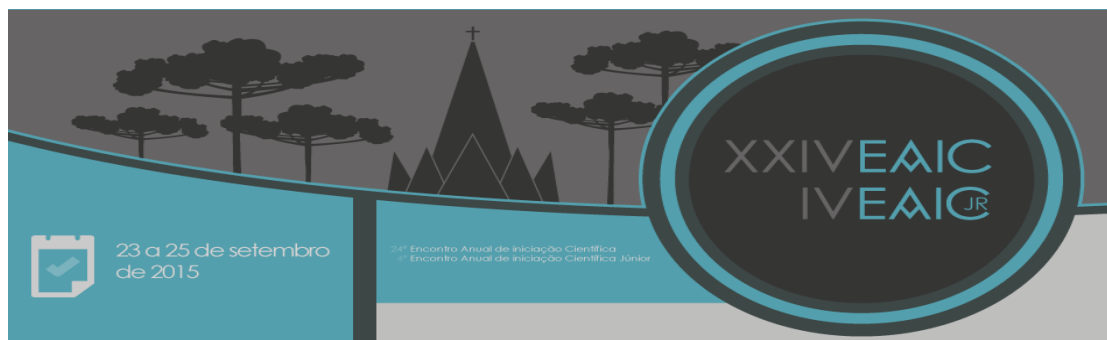


Figura 2. Análise de ácidos hidroxici-nâmicos (AHC) liberados de biomassa de cana-de-açúcar após 24 h de tratamento com FAE_{XynZ} . FA: ácido ferúlico. p-CA: ácido p-cumárico. Valores expressos em microgramas de AHC por grama de biomassa ($N = 3 \pm EPM$).

Conclusões

Embora tenha atividade residual sobre o p-CA, a FAE_{XynZ} libera preferencialmente FA indicando uma maior afinidade da enzima pela hidrólise das ligações éster entre FA e os resíduos arabinosil.

Agradecimentos

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, ao aluno de mestrado Dyoni Matias de Oliveira e demais colegas do BIOPLAN.

Referências

BENOIT, I., DANCHIN, E.G.J., BLEICHRODT, R.-J., VRIES, R.P.D. Biotechnological applications and potential of fungal feruloyl esterases based on prevalence, classification and biochemical diversity. **Biotechnology Letters** 30, 387–396, 2006.

BLUM, D. L., KATAEVA, I. A., LI, X. L., LJUNGDAHL, L. G. Feruloyl Esterase Activity of the *Clostridium thermocellum* Cellulosome Can Be Attributed to Previously Unknown Domains of XynY and XynZ. **Journal of Bacteriology**, 182: 1346–1351, 2000.

BUCKERIDGE, M. S., DOS SANTOS, W.D., SOUZA, A.P. As rotas do etanol celulósico no Brasil. In: CORTEZ, L. A. B. (Org.) **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para a produtividade e sustentabilidade**, Sao Paulo: Editora Edgard Blucher, p. 365-380, 2010.

CANILHA, L., MILAGRES, A. M. F., SILVA, S. S., SILVA, J. B. A., FELIPE, M. G. A., ROCHA, G. J., FERRAZ, A., CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pre-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, 44: 48-54, 2010.

SIERRA, R., SMITH, A., GRANDA, C., HOLTZAPPLE, M. T. Producing Fuels and Chemicals from Lignocellulosic Biomass. **SBE Special Section – Biofuels**, 10-18, 2008.