

NOME: SILVANA RODRIGUES PIRES MOREIRA

TÍTULO: ESTUDO DE UMA XILANASE DE FUSARIUM OXYSPORUM E APLICAÇÃO

AUTORES: SILVANA RODRIGUES PIRES MOREIRA, SILVANA RODRIGUES PIRES, JOSÉ HUMBERTO DE QUEIROZ, THIAGO RODRIGUES DUTRA, VALÉRIA MONTEZE GUIMARÃES, SEBASTIÃO TAVARES

PALAVRA CHAVE: Xilanase, Fusarium oxysporum, Indústria, Sacarificação

RESUMO

O fungo patogênico *Fusarium oxysporum* é amplamente distribuído, e coloniza os mais diversos hospedeiros como animais e diferentes espécies de plantas. Tem sido caracterizado como um bom produtor de diversas enzimas hidrolíticas, e como um importante microrganismo envolvido na penetração de plantas por patógenos. Celulose, hemicelulose e lignina são os maiores componentes da parede celular de plantas. A degradação da parede celular de plantas por fungos envolve a ação combinada de enzimas hidrolíticas, atuando sobre os polissacarídeos formadores da celulose, hemicelulose e lignina. As hemicelulases são enzimas produzidas por muitas espécies de bactérias, fungos e plantas e são responsáveis pela degradação da hemicelulose na parede celular de plantas. As xilanases (E.C. 3.2.1.8) são hemicelulases que atuam na despolimerização das fibras de celulose. Elas agem junto com outras hemicelulases, tais como as α -xilosidases (E.C. 3.2.1.37), mananases (E.C. 3.2.1.78), α -arabinofuranosidases (E.C. 3.2.1.55), dentre outras, sendo fundamentais no processo de liberação das fibras de celulose, devido à habilidade de promover a degradação seletiva das xilanas. As xilanases catalisam a hidrólise da xilana produzindo xilooligosacarídeos, que podem ser convertidos a açúcares. Devido a estas características, as hemicelulases têm sido muito estudadas com referência às suas propriedades e aplicações comerciais, tendo sido consideradas enzimas com grande potencial nas indústrias de biocombustível, e de papel e celulose. Nesse sentido, estão sendo realizadas pesquisas buscando técnicas para o uso de bagaço de cana-de-açúcar como fonte alternativa na produção de biocombustíveis. A estrutura complexa do bagaço de cana apresenta em sua constituição, celulose, hemicelulose e lignina, apresentando significativo potencial para aumentar a produção de biocombustível a partir de matéria-prima renovável. Celulose e hemicelulose podem ser hidrolisadas por produtos químicos (ácidos) ou enzimas (sacarificação) a açúcares que podem ser fermentados a diversos produtos, como o etanol. Assim, este trabalho teve como objetivo realizar a purificação e caracterização de uma xilanase de *Fusarium oxysporum* e suas potenciais aplicações biotecnológicas. Foi realizada sua aplicação em processo de sacarificação de biomassa, usando um complexo de celulase comercial na presença e na ausência de atividade da xilanase de *Fusarium oxysporum* e foram estabelecidas comparações. A xilanase de *Fusarium oxysporum* foi purificada usando procedimento de ultrafiltração, e cromatografia de troca iônica e de exclusão molecular. A enzima exibiu massa molecular de aproximadamente 21 kDa no SDS-PAGE e uma melhor atividade a 60°C em diferentes temperaturas de incubação (30-70° C). A xilanase mostrou pH ótimo de 6,0, usando o tampão McIlvaine, na faixa de pH de 3,0-8,0, resultado comparável ao de outras xilanases de fungos. A estabilidade térmica da xilanase purificada foi determinada em 50, 55 e 60 ° C. Nestas condições, a enzima manteve mais de 45% de sua atividade a 50° C durante 30 h, com um t_{1/2} de 26,1 h. A 55° C cerca de 40% da atividade foi mantida após 7 h de incubação, com t_{1/2} de 3,69 h. No entanto, a 60° C a xilanase mostrou baixa estabilidade: mantendo menos de 40% de sua atividade após 1h, com t_{1/2} de 0,48 h. Essas propriedades tornam a xilanase atraente para possíveis aplicações industriais, como sacarificação de biomassa. A enzima foi capaz de hidrolisar substratos específicos, incluindo xilana birchwood (concentração final de 1,5% p/v) e xilana oat spelts (concentração final de 1,5% p/v) em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,0, indicando que a xilanase promove eficientemente a hidrólise dos dois substratos naturais, sendo menor a taxa de hidrólise com o substrato solúvel xilana birchwood. O valor de K_M foi 0,85mM e o valor de V_{max} foi 0,23#956;M/min, utilizando xilana birchwood. A atividade enzimática foi drasticamente inibida por SDS, Fe²⁺, Cu²⁺, Al³⁺, dentre outros. E foi ativada por Mg²⁺. Em testes de aplicação, foi realizado um ensaio de sacarificação enzimática (15 unidades FPU por grama de biomassa) em bagaço de cana tratado alcalinamente com hidróxido de sódio a 1%. Neste teste, o efeito do coquetel de celulases comerciais, Multifect® CL, foi comparado ao resultado da hidrólise usando o mesmo coquetel complementado com 150 U ou 300 U de xilanase de *F. oxysporum* (por grama de biomassa). Foi avaliada a porcentagem total de açúcar redutor liberado (pelo método DNS) em cada um dos três experimentos de sacarificação enzimática, após 72 h de reação. A maior velocidade na liberação de açúcares redutores, quando Multifect® CL foi suplementado com a xilanase pode representar uma grande economia de tempo e maior faturamento na indústria. Os resultados obtidos indicam que o uso de Multifect® CL suplementado com xilanase promove uma maior taxa de hidrólise do bagaço de cana que o uso de Multifect® CL não suplementado. No entanto, novos estudos e novas variáveis devem ser analisadas de forma a obter uma maior eficiência no processo de sacarificação.