

PRODUÇÃO DE XILANASES POR *Aspergillus awamori* E A DETERMINAÇÃO DO SEU PESO MOLECULAR POR ELETROFORESE EM CONDIÇÕES DESNATURANTES

JUDITH LILIANA SOLÓRZANO LEMOS¹ & NEI PEREIRA Jr.¹

¹ Universidade Federal do rio de Janeiro/ UFRJ, Av. Athos da Silveira Ramos, 149, Centro de Tecnologia - Escola de Química – Depto. Engenharia Bioquímica – Núcleo de Biocombustíveis, de petróleo e seus derivados (NBPD) – Bloco K, Ilha do Fundão - Rio de Janeiro – RJ, CEP 21941-909.

ABSTRACT

Experiments in solid state fermentation (SSF) were performed, whose results using sugarcane bagasse, finely comminuted, without prior treatment, was able to sustain the growth of *A. awamori* and induce the production of 155 U/mL of endo-xylanase and 3.3 U/mL of α -xilosidase. The electrophoretic conditions denaturants chromatography identified the presence of 3 isoenzymes with the following molecular weights: 31, 51.4 and 55 kDa, confirmed by zimograma.

Keywords: electrophoresis, filamentous fungi, *Aspergillus awamori*, xylanases.

INTRODUÇÃO

Vários microrganismos, incluindo aeróbios e anaeróbios, mesófilos e termófilos, tem sido estudados em função de sua habilidade em sintetizar enzimas com atividade xilanásica. A maioria dos estudos tem sido conduzida com aeróbios, fungos mesófilos e bactérias.

Os fungos filamentosos têm sido muito utilizados para a produção de uma gama de produtos valiosos, e com o advento da biologia molecular, tornou-se evidente que estes fungos possuem um considerável potencial como hospedeiros para produção de proteínas heterólogas e de pequenas moléculas. Dessa forma, *Aspergillus* é um importante gênero, que inclui espécies bem conhecidos de im-

portância econômica e, além disso, amplamente utilizadas como base de investigação genética (Lubertozzi & Keasling, 2009).

Aspergillus awamori é conhecido por produzir várias enzimas hidrolíticas extracelulares, incluindo xilanases e celulases, que podem ser empregadas na hidrólise enzimática de hemiceluloses e celuloses, para a obtenção de monossacarídeos, utilizados na produção de biocombustíveis (Takuya et al., 2005; Pereira Jr et al., 2008).

A presença de enzimas, e as respectivas massas moleculares, podem ser avaliadas graças à técnica denominada eletroforese, acompanhada do respectivo zimograma. A eletroforese consiste na separação de moléculas através da migração de partículas carregadas

num determinado meio, sob a influência de uma diferença de potencial. Geralmente é realizada em géis de poliacrilamida (PAGE) onde as proteínas migram através dos poros do gel em resposta a um campo elétrico (Nelson & Cox, 2006).

A eletroforese na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) (condição desnaturante) separa as proteínas quase exclusivamente na base de sua massa (peso molecular), com os polipeptídios menores migrando mais rapidamente.

Depois da eletroforese, as proteínas são visualizadas pela adição de um corante (prata ou Coomassie Blue), que se liga às proteínas, mas não ao gel (Stryer, 1988; Nelson & Cox, 2006).

O nosso interesse na obtenção de enzimas xilanásicas, utilizando a fermentação em meio sólido (FMS), reside no fato de que este processo apresenta algumas vantagens econômicas em comparação ao processo submerso, sendo relacionadas principalmente com a diminuição de energia requerida.

Este trabalho insere-se exatamente nesse contexto, pois um de seus objetivos principais foi o de produzir xilanases pelo aproveitamento do bagaço de cana, sem tratamento prévio, com o intuito de minimizar os custos de produção. Além de evidenciar a presença das enzimas xilanásicas por meio da eletroforese.

MATERIAIS E MÉTODOS

Micro-organismo

Foi empregado *Aspergillus awamori* NRRL 3122, semeado em tubos inclinados, utilizando o meio Czapeck agarizado, após 6 dias de cultivo. Os esporos foram então removidos dos tubos, suspensos em 4 ml de água destilada estéril e contados em câmara de Neubauer para padronização dos inóculos. Foram adicionados 5×10^7 esporos/g de meio.

Meio de produção – FMS

Na Tabela 1 mostram-se os componentes empregados na elaboração dos meios de produção para fermentação em meio sólido, a

30 °C por 5 dias. Para isso empregaram-se 4,0 g de bagaço de cana, usados como principal fonte de carbono. O referido bagaço foi umedecido com 56 ml de água que já continha os outros macronutrientes. Na Tabela 2 são apresentados os parâmetros otimizados, empregados na presente fermentação e obtidos em trabalhos anteriores (Lemos et al., 2000; Lemos et al., 2001).

Tabela 1. Composição básica do meio empregado nas fermentações em meio sólido

Componente	g/4 g de bagaço de cana
Peptona	0,5
Extrato de levedura (EL)	0,5
KH ₂ PO ₄	0,2
NaCl	0,2
MgSO ₄	0,04

Proteína

Foi determinada por meio do método de Lowry modificado utilizando albumina de soro bovino como padrão (Peterson, 1979).

Atividades enzimáticas

Endo- α (1-4)-xilanase

Foi determinada indiretamente pela hidrólise de xilana “birchwood”, dosando os açúcares redutores pelo método do DNS. 0,9 ml de uma solução contendo 1% de xilana e dissolvida em tampão citrato fosfato 50 mM, pH 5, eram pré-incubados durante 2 minutos a 60 °C. Em seguida, a esta solução era adicionado 0,1 ml de enzima bruta, previamente diluída, e a reação era interrompida após 2 minutos pela adição de 1 ml do reagente de DNS. A atividade era expressa em μ moles de xilose liberada por minuto por mililitro de extrato enzimático.

β -xilosidase

Foi determinada pela dosagem de p-ni-

trofenol liberado a partir de p-nitrofenil- β -D xilopiranosídeo (PNPX). 0,5 ml de uma solução de PNPX 1,25 mM, dissolvidos em tampão citrato fosfato 50 mM, pH 5 eram pré-incubados durante 2 minutos a 55 °C. A esta solução era adicionado 0,1 ml de enzima previamente diluída, e a reação era interrompida após 10 minutos pela adição de 4 ml de Na₂CO₃ 0,25 M. O p-nitrofenol liberado ao meio era medido em espectrofotômetro a 410 nm. A atividade era expressa em μ moles de p-nitrofenol liberado por minuto por mililitro de extrato enzimático.

Celulases

O ensaio para determinação da atividade celulásica era feito adicionando-se 1 ml de solução enzimática bruta e substrato, em 1 ml de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,5. Celulases Cx foi determinada usando como substrato 10 mg de CMC (Carboximetilcelulose). Após a incubação a 50 °C por 10 min as enzimas foram inativadas com 1 ml de NaOH 1 N, e os açúcares redutores dosados pelo método de Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952), tendo glicose como padrão. As atividades enzimáticas foram expressas em μ moles de glicose por minuto por litro de extrato enzimático.

Tabela 2. Meio de produção contendo os parâmetros otimizados para o cultivo de *A. awamori* em FMS

Parâmetro	Endo-xilanase	β -xilosidase
Tamanho da partícula	1 mm	1 mm
pH do meio de produção	5-7	5-7
Fonte de N	NaNO ₃ + EL	NaNO ₃ + EL
Relação C/N	10/1	10/1
Teor de N proven. de NO ₃ ⁻	40 %	40 %
Teor de N proven. de EL	60 %	60 %
KH ₂ PO ₄	0,1 g/4 g bc*	0,2 g/4 g bc*
NaCl	0,1 g/4 g bc*	0,1 g/4 g bc*
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,02 g/4 g bc*	0,06 g/4 g bc*

Celulases

O ensaio para determinação da atividade celulásica era feito adicionando-se 1 ml de solução enzimática bruta e substrato, em 1 ml de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,5. Celulases Cx foi determinada usando como substrato 10 mg de CMC (Carboximetilcelulose). Após a incubação a 50 °C por 10 min as enzimas foram inativadas com 1 ml de NaOH 1 N, e os açúcares redutores dosados pelo método de Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952), tendo glicose como padrão. As atividades enzimáticas foram expressas em μ moles de glicose por minuto por litro de extrato enzimático.

Protease

Foi determinada segundo a metodologia descrita por Charney e Tomarelli (1947). O sobrenadante do meio de cultura (0,5 ml) foi incubado a 37 °C por 40 minutos em azocaseína (0,5% em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5). A reação foi paralisada pela adição de ácido tricloroacético 10%. Após centrifugação a 5000 x g por 5 minutos, o sobrenadante foi recolhido e 1,0 ml de KOH 5 N adicionado. A absorção da solução resultante foi medida a 430 nm. A atividade proteásica foi obtida pela diferença entre a absorvância da amostra e do branco contendo a enzima desnaturada ao final do ensaio. As atividades enzimáticas foram expressas em Δ Absorvância por minuto por litro de extrato enzimático ($\Delta A/\text{min.L}$).

Eletroforese em SDS-PAGE

Preparo da amostra: a amostra utilizada na determinação da massa molecular de endo-xilanase por cromatografia eletroforética em condições desnaturantes, bem como no zimograma, foi obtida a partir de fermentação em meio sólido, utilizando como única fonte de nitrogênio NaNO₃, visto que através do emprego desta fonte inorgânica de nitrogênio obteve-se o maior valor em atividade específica.

A eletroforese em SDS-Page foi realizada segundo o método descrito por Laemmli (1970). A solução enzimática bruta foi desmineralizada em Coluna PD-10 Sephadex G-25 (Pharmacia), de acordo com as indicações do manual. E embora o extrato sofresse diluição em 40% (fator de diluição 1,4) o sistema permitia o descarte de partículas menores que 10.000 kDa.

A adição das amostras no gel de poliacrilamida estava restrita a 30 µL de uma mistura formada por enzima e tampão de amostra (Tabela 3) numa relação 4/1. Cada mistura era transferida para “eppendorf”, onde a enzima sofria desnaturação dentro de um becher com água, aquecido por 2 minutos, na potência máxima, em micro-ondas. Após resfriamento a amostra era aplicada ao gel.

Tabela 3. Tampão de amostra para eletroforese

Reagente	Quantidade (mL)
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,0
Glicerol	80,0
SDS* 10 % p/v	1,6
2-β-mercaptoetanol	0,4
Azul de bromofenol 0,05 % p/v	0,2
Água destilada	4,0

Preparo do gel: os géis de poliacrilamida foram preparados respeitando uma ordem de adição de reagentes, como sugerido na Tabela 4.

Aplicação da amostra: as amostras foram adicionadas nas cavidades formadas após a polimerização do gel de concentração, pela inserção de um pente no referido gel. Paralelamente às amostras, um padrão de peso molecular (“High Molecular Weight Standard Mixture” - Sigma) (Tabela 5), acrescido de lisozima (Sigma), foi aplicado em uma das cavidades. A seguir, a cuba

do “Mini-Protean II Electrophoresis Cell” foi preenchida com tampão de corrida (Tabela 6), e iniciada a separação das proteínas, mantendo constante a voltagem do aparelho em 200 V.

Tabela 4. Composição dos géis de poliacrilamida-de separação e de Concentração

Reagente	Gel de separação (12 %)	Gel de concentração (3,9 %)
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,5 mL	-
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	-	1,25 mL
Água destilada	2,84 mL	3,05 mL
Xilana 1%	0,5 mL	-
Acrlamida 30 %	4,0 mL	0,65 mL
SDS* 10 %	100 µL	50 µL
APS* 10 %	50 µL	25 µL
TEMED* 100%	10 µL	5 µL
Volume final	10 µL	5 mL

Estimativa do peso molecular de endo-xilanase:

o peso molecular de endo-xilanase foi estimado segundo a metodologia descrita no manual da Boehringer Mannheim Biochemica. Para tal, o gel foi corado com Coomassie Blue R-250 0,1 % (Coomassie Blue R-250 0,1%, metanol 40% e ácido acético 10%); no entanto, as bandas de proteína só foram reveladas depois de lavagens consecutivas com solução descorante, constituída de ácido acético 5% e de etanol 40%. Revelação por prata também foi realizada da seguinte maneira: a fixação foi executada por 30 minutos em mistura contendo etanol 30%, ácido acético 10% e TCA 20%. A lavagem: foi realizada durante 15 minutos em etanol 30%, repetindo o procedimento por três vezes. A seguir, era feita uma lavagem em água destilada durante 20 minutos. A coloração: acontecia por 30 minutos em uma mistura de nitrato de prata 0,2%, 80 µl de formaldeído 37% e água destilada suficiente

para preparar 100 ml de solução. Lavagem posterior era realizada em água destilada, durante 1 minuto, para retirada do excesso de corante. A revelação: era feita em solução contendo 3 g de carbonato de sódio, 50 µl de formaldeído 37%, 800 µl de tiosulfato de sódio 2,5 mM e água suficiente para completar 100 ml de solução. A coloração desejada obteve-se adicionando 10 ml de ácido acético puro ao gel corado após 2 a 10 minutos de reação.

Tabela 5. Padrão de proteínas (Sigma)

Proteína	Peso molecular (KDa)
Miosina	205
β-galactosidase	116
Fosforilase	97,4
Soro Albumina Bovina	66
Ovoalbumina	45
Anidrase	29
Lisozima	14

Tabela 6. Tampão de corrida para eletroforese

Reagente	Quantidade (g)
Tris base	9,0
Glicina	43,2
SDS*	3,0
Água destilada	600 mL

Zimograma: após a eletroforese, o SDS foi removido do gel lavando-o durante 45 minutos com Triton-X 100 2,5 % para renaturação das enzimas. A seguir, foram feitas 4 lavagens sucessivas do mesmo em água destilada com o intuito de remover o Triton-X. A continuação, a reação enzimática foi realizada em tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 5, a 50 °C, e interrompida por meio da incubação do gel em vermelho congo, a 7 °C, depois de 5 minutos de reação. A visualização das bandas foi possível por meio

de lavagens sucessivas com NaCl 1 M, sofrendo viragem de cor ao pingarmos, lentamente, gotas de HCl 1 N.

Secagem do gel: a conservação do gel, obtido após a corrida de eletroforese, foi feita mediante a secagem do mesmo em solução secante, composta de 40 % de metanol e de 6 % de glicerol, por 30 minutos. Para completar esta operação o gel foi preso em papel celofane e posto para secar a temperatura ambiente durante 4 ou 5 dias.

RESULTADOS

Perfil cinético da produção de endo-xilanase e β-xilosidase em FMS com o meio otimizado

Como dito anteriormente, parâmetros importantes para produção das enzimas xilanásicas, produzidas por *A. awamori*, foram otimizados em trabalhos já publicados (Lemos et al., 2000; Lemos et al., 2001) e, no presente trabalho mostra-se apenas o resultado dessa otimização. Então, estimulados pelo desejo de resultados evidentes sobre o benefício da otimização do meio de fermentação, levamos a cabo o levantamento do perfil cinético da produção enzimática por *A. awamori*, em FMS, exibido nos gráficos da Figura 1.

A figura a seguir mostra que os picos máximos de produção para endo-xilanase e β-xilosidase ocorreram após 48 e 96 horas de cultivo, respectivamente. Mostrando, ainda, que as respectivas atividades proteásica e celulásica máximas foram alcançadas após 41 e 60 horas de fermentação. Na Tabela 7 resumem-se os maiores valores de atividade, produtividade volumétrica e atividade específica para as enzimas estudadas.

Massa molecular de endo-xilanase

A massa molecular de endo-xilanase foi estimado em SDS-PAGE utilizando um gel com 12 % de poliacrilamida (Figura 2). A presença dos componentes protéicos da solução enzimática bruta, utilizada nesta determinação, pode ser evidenciada nas bandas situadas nas

linhas 2, 3 e 4 da Figura 2. O zimograma apresentado na Figura 3 revela as bandas com atividade endo-xilanásica, e permite identificar a presença de pelo menos duas isoenzimas de endo-xilanase. No entanto, no gel da Figura 4, corado com prata, podemos observar o aparecimento de duas bandas definidas exatamente no mesmo local onde se situa a banda superior do zimograma. Isto, provavelmente indica a presença não de uma, mas de duas isoenzimas na banda mais larga do gel corado com Coomassie Blue, com massas moleculares iguais a 55 e 51,4 kDa. A massa da outra isoenzima com atividade endoxilanásica foi calculado em 31 kDa.

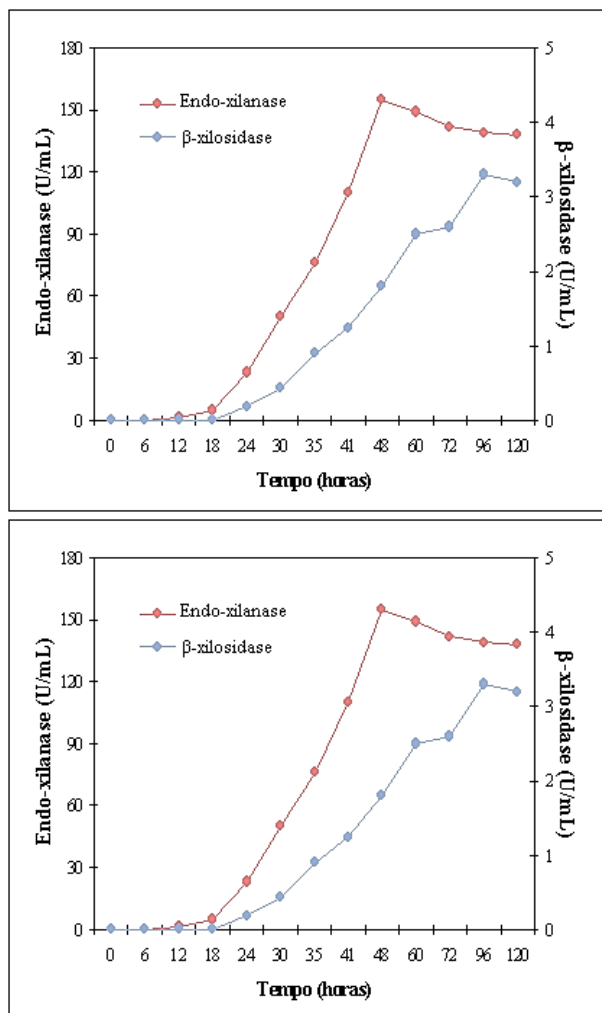


Figura 1. Cinética de produção de endo-xilanase, β -xilosidase, celulase e protease pelo fungo *A. awamori* em FMS a 30 °C.

Tabela 7. Atividades, produtividades volumétricas e atividades específicas para o complexo enzimático produzido por *A. awamori*

Enzimas	Atividade máx. (U/mL)	Atividade máx. (U/g de bagaço)	P.V.* máx. (U/Lh)	A.E. máx.** (U/mg prot.)
Endo-xilanase	155,0	6000,0	3229,0	50,0
β -xilosidase	3,30	129,0	34,0	1,0
Protease	0,157	6,0	0,66	0,01
Celulase	0,027	1,0	2,66	0,05

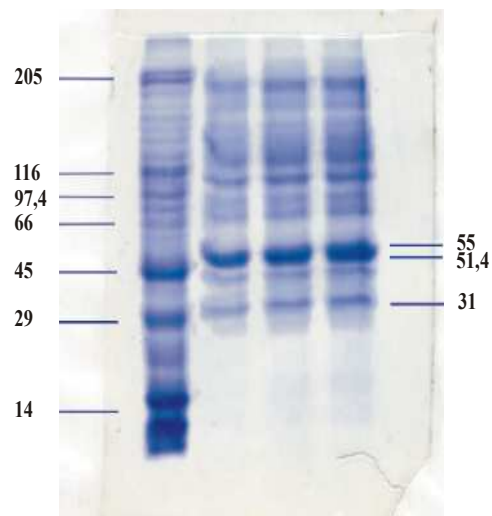


Figura 2. SDS-PAGE de endo-xilanase de *A. awamori*, cultivado em bagaço de cana por fermentação em meio sólido, corado com Coomassie Blue-R 0,1 %. Coluna 1: padrão de peso molecular; colunas 2, 3 e 4: proteínas que compõem a solução enzimática bruta de endo-xilanase.

A massa molecular das enzimas foi calculada por meio do gráfico do coeficiente de migração (R_f), apresentado na Figura 5. Para tal, foram plotados no gráfico os R_f das proteínas padrão versus o logaritmo da sua massa molecular.

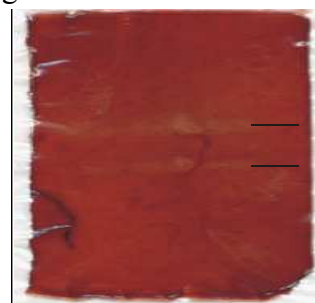


Figura 3. Zimograma de endo-xilanases de *A. awamori* contendo xilana “birchwood” na concentração final de 0,05 %.

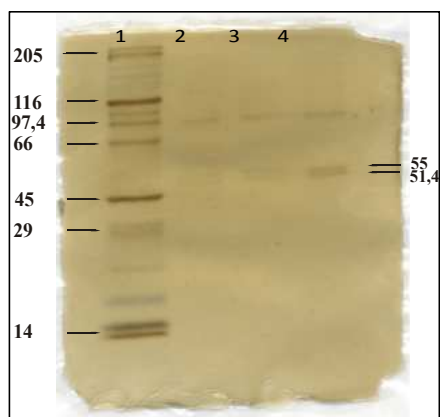


Figura 4. SDS-PAGE de endo-xilanase de *A. awamori*, cultivado em bagaço de cana por fermentação em meio sólido, corado com prata. Coluna 1: padrão de peso molecular; colunas 2, 3 e 4: proteínas que compõem a solução enzimática bruta de endo-xilanase.

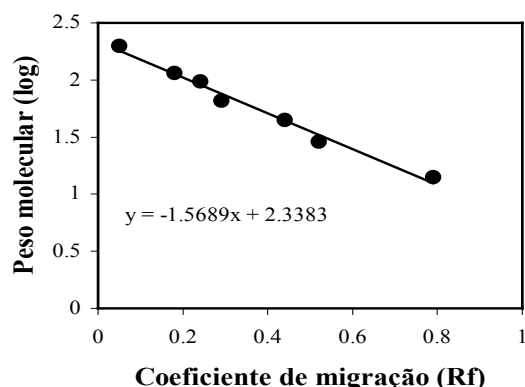


Figura 5. Coeficiente de migração (Rf) x logaritmo do peso molecular das proteínas padrão.

DISCUSSÃO

Perfil cinético da produção de endo-xilanase e β -xilosidase em FMS com o meio otimizado

Quanto às atividades xilanásicas pode-se dizer que o resultado apresentado para endo-xilanase, na Figura 1, está bem próximo ao obtido por Savitha e colaboradores (2009), empregando *Graphium putredinis* e *Trichoderma harzianum*, cujos resultados foram de 143.5 e 128.0 U/mL, respectivamente, utilizando xilana de aveia. Vale ressaltar que o bagaço de cana é

um substrato de mais difícil assimilação do que a xilana de aveia por causa da sua estrutura mais complexa. No entanto, *A. awamori* mostrou uma produção semelhante à dos fungos utilizados por Savitha e colaboradores (2009), assimilando um material lignocelulósico que não sofreu tratamento prévio. Em relação às β -xilosidases o resultado alcançado por Savitha e colaboradores (2009) foi de, aproximadamente, duas a quatro vezes superior (8,31 e 12,99 U/mL para *T. harzianum* e *G. putredinis*, respectivamente) do que o obtido pelos autores da presente pesquisa (3,30 U/mL para *A. awamori*).

Quanto à questão nutricional microbiana, observou-se que os meios de produção devem ser formulados de tal maneira que proporcionem os nutrientes essenciais para realização das funções do metabolismo celular: formação de biomassa e produção de metabólitos (enzimas). Ficou claro, a partir de experiências em trabalhos anteriores, e do resultado do presente trabalho, que a obtenção do produto requerido é uma questão que não depende apenas da capacidade genética do micro-organismo produtor, mas também de condições específicas de nutrição e de metodologias adequadas para a consecução dos parâmetros desejados.

Massa molecular de endo-xilanase

Sem dúvida, os dados da literatura são de grande ajuda e vem ao encontro das estimativas das massas de endo-xilanases, uma vez que a multiplicidade enzimática é muito comum tanto em fungos como em bactérias e actinomicetos (SUNNA & ANTRANIKIAN, 1997). Segundo a compilação feita pelos referidos autores, *A. awamori* CMI 142717 produziu três isoenzimas com os seguintes pesos moleculares: 39, 23 e 26 kDa. Embora estes valores sejam diferentes aos determinados para *A. awamori* NRRL 3112, empregado no presente trabalho, sabe-se que diferenças quanto a variedade podem também gerar alterações no número, tipo e/ou tamanho das proteínas secretadas. No que tange aos valores das massas moleculares das endo-xilanases, estes encontram-se entre os comumente

obtidos para a maioria de micro-organismos, geralmente, entre 15 e 70 kDa.

CONCLUSÃO

O bagaço de cana, finamente cominuído, e sem tratamento prévio, foi capaz de sustentar o crescimento de *A. awamori* e induzir à produção de 155 U/mL de endo-xilanase e 3,3 U/mL de β -xilosidase.

Por meio de eletroforese, em condições desnaturantes, foi possível identificar 3 bandas com as seguintes massas moleculares: 31; 51,4 e 55 kDa, as quais apresentaram atividades xilánicas, ratificadas por meio de zimograma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

LUBERTOZZI D, KEASLING, J D. 2009. Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression. *Biotechnol Adv* 27: 53-75.

TAKUYA K, MIWA, T Y, FUSHINOBU S, HASHIZUME K. 2005. Biochemical characterization of recombinant acetyl xylan esterase from *Aspergillus awamori* expressed in *Pichia pastoris*: Mutational analysis of catalytic residues. *Biochimica et Biophysica Acta* 1749: 7-13.

PEREIRA JR N, COUTO, M A P G, SANTA ANNA L M M. 2008. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery, Series on Biotechnology, v. 2, Rio de Janeiro: Amigadigital, 46 p.

NELSON D L, COX M M. 2006. *Lehninger - Princípios de Bioquímica*, 4a ed., São Paulo: Editora Sarvier, 1202 p.

STRYER L. 1988. *Bioquímica*, 3ª ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro

LEMOS J L S, BON E P S, SANTANA M F E, PEREIRA JR N. 2000. Thermal stability of xylanases produced by *Aspergillus awamori*.

Braz J Microbiol 31: 206-211.

LEMOS J L S, FONTES M C A, PEREIRA JR N. 2001. Xylanase Production by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation and influence of different nitrogen sources. *Appl Biochem Biotechnol* 91-93: 681-689.

PETERSON G L. 1979. Review of the folin phenol protein quantitation method of lowry, rosebrough, farr and randall. *Anal. Biochem* 100: 201-220.

SOMOGYI, M. 1952. Notes on sugar determination. *J Biol Chem* 195: 19-23.

SOMOGY, M. A New Reagent for Determination of Sugars. A new Sugar Reagent, May p. 61 — 68, 1945.

CHARMEY J, TOMARELLI R M. 1947. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *J Biol Chem* 171: 501-505.

LAEMMLI U K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

SAVITHA S, SADHASIVAMA S, SWAMINATHAN K. 2009. Modification of paper properties by the pretreatment of wastepaper pulp with *Graphium putredinis*, *Trichoderma harzianum* and fusant xylanases. *Bioresour Technol* 100: 883-889.

SUNNA A, ANTRANIKIAN G. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit Rev Biotechnol* 17: 39-67.