



PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE ENDOGLUCANASE DO FUNGO *Kretzschmaria zonata*

Igor Barbosa Rocha Ribas¹; Gabriela Piccolo Maitan-Alfenas² (orientadora)

Universidade Federal de Viçosa - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

Trabalho de Pesquisa - Área temática: Purificação enzimática - Grande área: Bioquímica

Palavras-chave: biomassa lignocelulósica; enzima; atividade específica, purificação

¹igor.ribas@ufv.br ²gabriela.maitan@ufv.br

Introdução

As enzimas são macromoléculas que exercem o papel de catalisadores das reações nos sistemas biológicos. A celulose é um polissacarídeo linear que compõe a parede celular das células vegetais, constituído por unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas ($\beta 1 \rightarrow 4$). As celulasas, enzimas que hidrolisam a celulose, são divididas em três grupos: endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases. Endoglucanases hidrolisam ligações β -1,4 no centro da molécula de celulose e liberam oligossacarídeos (VÁSQUEZ et al., 2007). O fungo *Kretzschmaria zonata*, da família Xylariaceae, é fitopatogênico e causador do apodrecimento de raízes de várias espécies florestais (TOVAR et al., 2014) e tem demonstrado potencial na produção de celulasas.

Objetivos

Induzir a produção de endoglucanases pelo fungo *Kretzschmaria zonata* utilizando diferentes fontes de carbono e purificar parcialmente uma das enzimas obtidas.

Material e Métodos

Cultivo do fungo *Kretzschmaria zonata* por 8 dias a 28 °C, sem agitação, em meios semi-sólidos para a obtenção dos extratos brutos. Fontes de carbono testadas: capim elefante, café verde, bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho e farelo de trigo.

Extração enzimática com tampão AcNa 50 mM, pH5,0 a 150 rpm por 60 min à temperatura ambiente.

Determinação da atividade de endoglucanase dos extratos brutos pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959).

Quantificação de proteínas (Bradford, 1976).

Purificação parcial por precipitação com sulfato de amônio em diferentes concentrações.

Resultados e Discussão

A maior atividade enzimática (3,06 U/mL) foi induzida pelo capim elefante, provavelmente pela composição desta biomassa, rica em celulose. As atividades específicas dos diferentes extratos brutos podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Atividades específicas, em U/mg de proteína, apresentadas pelos diferentes extratos brutos.

Fontes de carbono	Atividade Específicas (U/mg) \pm DP
Café Verde	3,82 \pm 0,03
Capim Elefante	3,66 \pm 0,08
Farelo de Trigo	1,14 \pm 0,00
Bagaço de Cana	4,17 \pm 0,88
Sabugo de Milho	4,48 \pm 1,80

O extrato bruto obtido a partir do capim elefante foi o escolhido para as posteriores etapas de purificação parcial, por também ter apresentado uma expressiva atividade específica. Após purificação com sulfato de amônio, as atividades enzimáticas do extrato bruto e dos extratos pós precipitação, estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Atividades enzimáticas, em U/mL, de sobrenadantes e precipitados após as etapas de purificação com sulfato de amônio.

Etapa	Atividade Enzimática (U/mL) \pm DP
Sobrenadante (40%)	2,36 \pm 0,05
Sobrenadante (60%)	1,34 \pm 0,43
Precipitado (60%)	2,17 \pm 0,09
Sobrenadante (70%)	0,80 \pm 0,03
Precipitado (70%)	3,30 \pm 0,12
Sobrenadante (80%)	ND*
Precipitado (80%)	3,95 \pm 0,08

ND*: não detectável

Houve um aumento da atividade específica do extrato bruto, que era de 3,62 U/mg, para o extrato parcialmente purificado, que apresentou 5,65 U/mg, o que comprova a eficácia desse processo de purificação.

Conclusões

O fungo *Kretzschmaria zonata* apresenta potencial para produção de endoglucanases, enzimas importantes em diferentes aplicações biotecnológicas.

Bibliografia

- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 31, 426-430, 1959.
- Tovar, C.D., Pérez Vera, O. A., García Díaz, S. E., & Cibrián Tovar, J. (2014). *Kretzschmaria zonata* (Lév.) P.M.D. Martin, causante de la pudrición del cuello y la raíz de teca. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 5(25), 110-118.
- Vásquez, M.P., Silva, J.N, Souza, M.B.J., Pereira, N.J. (2007). Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 141-153.