

IMOBILIZAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DE XILANASE RECOMBINANTE DE *Bacillus subtilis* EM QUITOSANA-GLIOXIL

T. S. S. MILESSI¹, W. KOPP¹, A. B. NETO², P. W. TARDIOLI¹ e R. L. C. GIORDANO¹

¹ Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia Química

² VERDARTIS, Desenvolvimento Biotecnológico

E-mail para contato: thais.milessi@gmail.com

RESUMO – O aproveitamento da fração hemicelulósica da biomassa é essencial para a viabilidade da utilização de materiais lignocelulósicos em bioprocessos. As xilanases hidrolisam ligações glicosídicas entre unidades de xilose da hemicelulose, podendo ser aplicadas na etapa de pré-tratamento para liberação de açúcares fermentescíveis. A imobilização de xilanase é uma alternativa interessante, pois pode reduzir o custo da etapa de pré-tratamento. A quitosana-glioxil é um suporte de imobilização promissor devido ao seu baixo custo e por permitir a imobilização de enzimas por interações covalentes multipontuais. Neste contexto, o presente trabalho utilizou quitosana-glioxil para imobilizar endoxilanase recombinante de *B. subtilis* expressa em *E. coli* DH5 α . A imobilização foi realizada à pH 10.0 e 25 °C. O rendimento de imobilização foi de 76% com uma atividade recuperada de 53.6%. A enzima imobilizada apresentou meia vida de 5.9 h à 56 °C e pH 5.5, sendo 75x mais estável que a enzima solúvel.

1. INTRODUÇÃO

Os materiais lignocelulósicos vêm ganhando destaque como matéria prima em bioprocessos devido à sua grande disponibilidade, baixo custo e por não competir com a produção de alimentos (Nigam; Singh, 2011). Seu potencial como fonte de carbono sustentável está diretamente relacionado com sua composição, uma vez que são compostos principalmente por 40-50% de celulose, 20-25% de hemicelulose e 20-30% de lignina, dependendo do material (Fengel; Wegener, 1983).

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo constituído principalmente de xilose (Carvalho *et al.*, 2013). A partir de uma etapa de pré-tratamento, termoquímico ou enzimático, a matriz fibrosa da biomassa pode ser rompida e os açúcares fermentescíveis liberados (Mosier *et al.*, 2005). Entretanto, esta etapa acarreta custos adicionais significativos ao processo e ainda está em fase de pesquisa e implantação em escala industrial (Mussato *et al.*, 2010).

As xilanases (β -1,4-D-xilanase) são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas entre as unidades de xilose da fração hemicelulósica, podendo ser divididas em dois grandes grupos: as endoxilanases e as β -D-xilosidases (Carvalho *et al.*, 2013). As endoxilanases hidrolisam aleatoriamente a cadeia principal do polímero de hemicelulose, enquanto as β -D-xilosidases agem na extremidade não redutora da cadeia, liberando xilose (Manrich, 2012). Estas enzimas são produzidas,

em sua forma nativa, por diferentes microrganismos (fungos filamentosos, leveduras e bactérias) entre eles podemos citar os gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fibrobacter*, *Clostridium* e *Bacillus* (Carvalho *et al.*, 2013).

As xilanases são extensivamente utilizadas nas indústrias de papel e alimentos; devido à sua capacidade catalítica estas enzimas xilanolíticas apresentam também grande potencial para aplicação na bioconversão de lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis (Carvalho *et al.*, 2013). Entretanto, a utilização de xilanases na degradação de materiais lignocelulósicos é limitada por sua instabilidade em determinadas condições de processo e principalmente por seu alto custo de obtenção.

A xilanase de *B. subtilis* possui pH e temperaturas ótimos próximos a 5.0 e 50°C, respectivamente, e apresentam maior concentração de aminoácidos básicos do que xilanases de fungos (Bernier *et al.*, 1983). A xilanase utilizada neste trabalho apresenta predominantemente atividade de endoxilanase e foi expressa em *E. coli* DH5α.

A condução do processo de hidrólise à elevadas temperaturas pode evitar a contaminação do meio extremamente rico em monossacarídeos e aumentar a velocidade da reação (Aragon *et al.*, 2013). Porém, Rojas *et al.* (2013) observaram que a endoxilanase recombinante de *Bacillus subtilis* apresentou um tempo de meia-vida de apenas 2,7 minutos à 60 °C. Desta maneira, uma estratégia para contornar esta instabilidade frente às condições de processo é a utilização da enzima imobilizada o que também permitiria a recuperação e reutilização do biocatalisador diminuindo consideravelmente o custo global do processo.

A imobilização de enzimas confere diversas vantagens ao biocatalisador, como a facilidade de separação e recuperação do produto e maior estabilidade térmica e frente ao pH. A imobilização covalente multipontual de enzimas em suportes ativados com grupos glioxil pode ainda aumentar a estabilidade do derivado enzimático uma vez que diminui a ocorrência de distorções tridimensionais na estrutura da proteína (Lopez *et al.*, 2005). Além disso, a facilidade de separação do sistema imobilizado do meio permite sua reutilização, resultando na redução do custo da etapa de hidrólise da hemicelulose (Sheldon, 2007).

A quitosana é um biopolímero obtido a partir da desacetilação da quitina de fungos ou crustáceos que apresenta grande potencial como suporte para a imobilização de enzimas por ser um polissacarídeo abundante e barato (Silva *et al.*, 2012). A quitosana é biocompatível, biodegradável e possui uma elevada densidade de grupos amina primária que podem ser modificados quimicamente formando grupos glioxil extremamente reativos (Kumar, 2000).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo a obtenção de um derivado de xilanase recombinante de *Bacillus subtilis* (BsXA) imobilizado em gel de quitosana-glioxil visando sua estabilização térmica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

Xilanase recombinante de *Bacillus subtilis* (BsXA) produzida pela Verdartis (Brasil), quitosana com 85% de desacetilação adquirida da Polymar S. A. (Ceará, Brasil), borohidreto de sódio e xilana de bétula adquiridas da Sigma-Aldrich SA (St. Louis, MO, EUA). Outros reagentes de grau analítico também foram utilizados.

2.1. Métodos

Preparo da Quitosana: O gel de quitosana foi preparado de acordo com metodologia de Silva (2013). Quitosana em pó 4% (m/m) foi solubilizada em ácido acético 2% (v/v) e homogeneizada por 30 minutos à temperatura ambiente. A solução homogênea foi então aquecida e mantida a 50 °C. KOH 0.5 M foi adicionado na proporção 3:2 (v/v) (volume de KOH/volume de solução) e a solução foi mantida sob agitação por 1 hora.

Ativação Suporte Quitosana-Glioxil: Quitosana ativada com grupos glioxil foi preparada por uma nova metodologia. Primeiramente, grupos epóxidos foram introduzidos na superfície do suporte pela reação de 10 g do gel de quitosana com o reagente epicloridrina em meio alcalino e na presença de acetona (4.4 mL de NaOH 20 M, 1.6 mL de acetona e 1.1 mL de epicloridrina). A reação foi mantida sob agitação mecânica constante por 16 horas em temperatura ambiente. Em seguida, os grupos epóxidos introduzidos na superfície do suporte foram hidrolisados à grupos gliceril através da incubação do suporte em ácido sulfúrico 0.5 M durante uma hora. Ao final, os grupos gliceril foram oxidados à grupos glioxil empregando uma solução de periodato de sódio 0.1 M na proporção de 2 mL de periodato/g de gel. Entre cada etapa da ativação o suporte foi filtrado e exaustivamente lavado com água destilada.

Determinação de Proteínas Totais: A quantificação da concentração de proteínas dos extratos enzimáticos foi determinada pelo método de Bradford (1976).

Determinação da Atividade Enzimática de BsXA: A atividade de xilanase foi medida de acordo com metodologia utilizada por Manrich (2012) na qual a liberação de açúcares redutores ao longo do processo de hidrólise de xilana de bétula (1% m/v), catalisada pela enzima, foi quantificada. O substrato foi constituído de xilana de bétula em tampão citrato 50 mM pH 5.5. Enzima livre ou imobilizada foram adicionadas ao substrato e incubadas a 50 °C por 10 min. Alíquotas foram retiradas em intervalos de 2 minutos e os açúcares redutores liberados foram quantificados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). Uma unidade de atividade (UI) foi considerada como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de xilose por minuto nas condições de ensaio.

Imobilização de BsXA: Os procedimentos de imobilização foram realizados à baixa carga de proteína visando evitar problemas com limitação de transferência de massa intrapartícula. Quitosana-glioxil foi suspensa na solução enzimática (0.25 mg/mL e 11.48 UI/mL) na proporção 1:10 Vgel/Vsolução em tampão bicarbonato de sódio (100 mM e pH 10.0). A suspensão foi mantida à 25

°C sob agitação constante, amostras foram retiradas em intervalos periódicos e a atividade enzimática e concentração de proteínas totais foram medidas. Ao final do processo as bases de Schiff formadas e os grupos aldeído remanescentes no suporte foram reduzidos com borohidreto de sódio (1 mg/mL, 4 °C, 30 min). Posteriormente, o derivado foi exaustivamente lavado com tampão citrato 50mM pH 4.8 e seco por sucção à vácuo.

Estabilidade Térmica da BsXA: A estabilidade térmica das enzimas livre e imobilizada foi realizada à 56 °C, incubando-se as enzimas em tampão citrato 50 mM pH 5.5. Durante o ensaio, alíquotas da solução de enzima livre ou uma massa conhecida da enzima imobilizada foram coletadas para quantificação da atividade residual e estimativa do tempo de meia-vida.

3. RESULTADOS

A quitosana é um material abundante e de baixo custo utilizado em estudos para imobilização de diversas enzimas (Silva et al., 2012; Mendes et al, 2011; Kumar, 2000). Além de suas características vantajosas e de seu baixo custo, sua utilização pode ainda significar uma alternativa interessante para o aproveitamento dos resíduos das indústrias de frutos do mar (Rodrigues et al., 2008). Sua aplicação como suporte para a imobilização de enzimas através da ativação com grupos glioxil utilizando epícloridrina como agente ativador é um método novo e promissor, uma vez que a epícloridrina permite a ativação e o entrecruzamento do suporte em uma única etapa.

Xilanase recombinante de *Bacillus subtilis* foi imobilizada em gel de quitosana-glioxil visando obtenção de um derivado de elevada atividade e estabilidade. O acompanhamento do ensaio de imobilização pode ser observado na Figura 1. Não foi possível acompanhar a atividade na suspensão devido a baixa dispersibilidade das partículas de quitosana em pH 10.0, ocasionada pela forte interação iônica do polímero em valores de pH alcalinos.

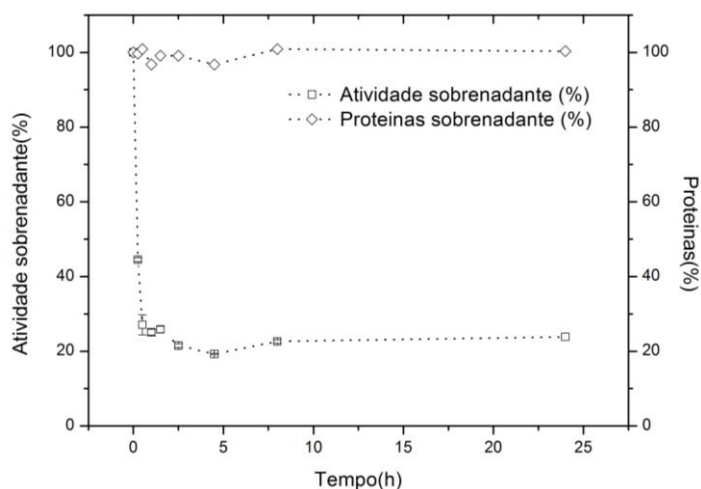


Figura 1 – Cinética de imobilização da xilanase recombinante de *Bacillus subtilis* (BsXA) em quitosana-glioxil.

O processo de imobilização aconteceu rapidamente, com 30 minutos de processo apenas 27.08% da atividade inicial oferecida foi observada no sobrenadante. A rápida cinética de imobilização observada se deve, provavelmente, à elevada concentração de grupos glioxil na superfície do suporte. A imobilização por ligações covalentes multipontuais em suportes ativados com grupos glioxil ocorre em duas etapas, primeiramente ligações unipontuais são formadas entre a enzima e o suporte (bases de shift), estas ligações são reversíveis de forma que a enzima alterna entre a forma livre e imobilizada obedecendo um equilíbrio químico. Em uma segunda etapa duas ou mais bases de shift são formadas ao mesmo tempo entre a enzima e o suporte evitando assim a dessorção da enzima. A encubação do sistema enzima-suporte por tempos maiores favorece a formação de um maior número de ligações covalentes entre a enzima e o suporte, sendo o que caracteriza a técnica de imobilização multipontual. Geralmente quanto maior o número de uniões covalentes entre a enzima e o suporte maior será o incremento observado na estabilidade térmica e operacional da enzima (Guisan, 1988).

Assim sendo, considerando o mecanismo de imobilização multipontual, o ensaio foi estendido até 24 horas uma vez que a enzima solúvel mostrou-se estável por todo o tempo de processo nas condições de estudo. Tal estratégia foi aplicada visando aumentar a estabilidade e garantir uma boa imobilização enzimática, uma vez que de acordo com Lopez *et al.* (2005), quanto maior o tempo de imobilização, maior a concentração de ligações multipontuais formadas, garantindo assim uma maior estabilidade. De fato, Rodrigues *et al.* (2008) estudando a imobilização de lipase de *Candida antarctica* em suportes quitosana e agarose, observaram que derivados mais estáveis foram obtidos utilizando-se tempos de imobilização mais longos devido ao aumento no número de ligações covalentes multipontuais enzima-suporte.

Após 24 horas de imobilização ainda se observava 23.85% de atividade no sobrenadante, indicando que os grupos glioxil disponíveis no suporte provavelmente estavam saturados. Esta atividade residual pode-se ainda ser atribuída a presença de proteínas contaminantes no derivado, as quais podem ocupar sítios de ligação no suporte e prejudicar a imobilização, porém a cinética de imobilização em termos de proteínas totais observada indica que a maioria das proteínas contaminantes presentes no sobrenadante não foram imobilizadas no suporte. Os parâmetros relacionados ao processo de imobilização encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros de imobilização de xilanase recombinante de *Bacillus subtilis* (BsXA) em quitosana-glioxil (onde A_{of} = atividade oferecida na imobilização; R_{IU} = rendimento de imobilização; A_t = atividade teórica do derivado; A_{der} = atividade medida do derivado; AR = atividade recuperada)

Parâmetros de Imobilização	Valores
A_{of} (UI/g _{gel})	180.1 ± 7.6
R_{IU} (%)	76.2 ± 0.0
A_t (UI/g _{gel})	137.2 ± 5.8
A_{der} (UI/g)	72.4 ± 3.4
AR (%)	53.6 ± 1.7

A atividade recuperada (AR) do processo foi de 53.6%, mostrando uma provável inativação da

xilanase na etapa de redução com borohidreto de sódio. Este comportamento também foi observado por outros autores, Mendes et al. (2011) estudando a imobilização de diferentes lipases em quitosana ativada com diferentes grupos reativos verificaram que, para todos os suportes testados, entre 11 e 23% da atividade era perdida na etapa de redução. De acordo com os autores, a perda de atividade durante a redução com borohidreto de sódio está relacionada com uma possível redução das pontes dissulfeto da enzima.

A presença de proteína residual no sobrenadante, a qual manteve-se constante durante todo o processo, deve-se a presença de proteínas contaminantes no extrato enzimático que não imobilizam no suporte quitosana-glioxil devido à ausência ou ao reduzido número de grupos lisinas em sua superfície. Este comportamento indica a ocorrência de uma imobilização seletiva, na qual somente as enzimas que possuem um número significativo de resíduos de lisina são imobilizadas, que é o caso da enzima de interesse (BsXA).

A Figura 2 apresenta o perfil de inativação da xilanase livre e imobilizada a 56 °C em tampão citrato 50 mM pH 5.5. Observa-se que a xilanase imobilizada foi significativamente mais estável que a solúvel, após 15 minutos de incubação o derivado conservou 92.6% de sua atividade inicial, enquanto a forma solúvel estava totalmente inativa. Os tempos de meia vida estimados são de 4.7 e 357.0 minutos para as enzimas livre e imobilizada, respectivamente. Desta maneira, a enzima imobilizada mostrou-se 75x vezes mais estável que a enzima solúvel, este aumento na estabilidade se deve, provavelmente, às ligações multipontuais formada entre a enzima e o suporte.

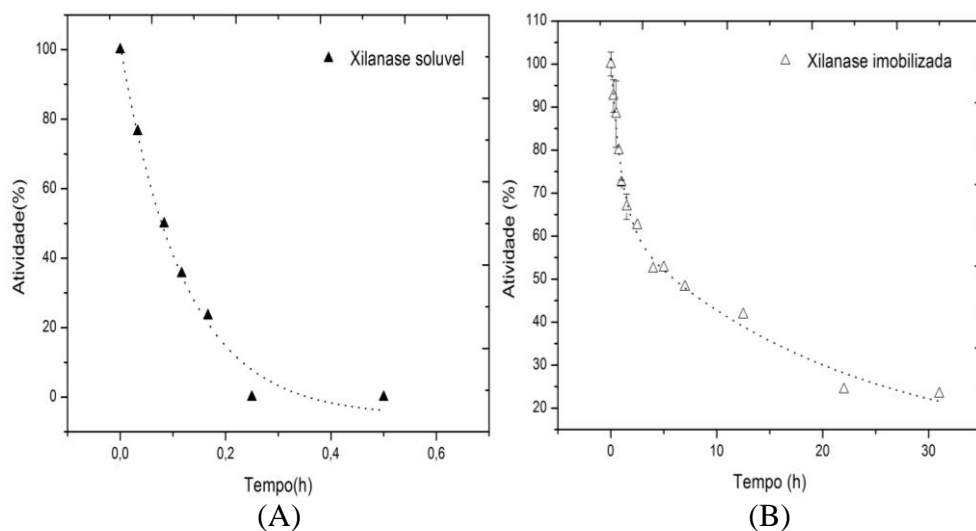


Figura 2 – Inativação térmica (56 °C e pH 5.5) de xilanase recombinante de *Bacillus subtilis* (BsXA) solúvel (A) e imobilizada em quitosana glioxil (B).

A hidrólise da hemicelulose é geralmente realizada em temperaturas mais amenas que 56°C,

geralmente são utilizadas temperaturas entre 40-50°C (Carvalho *et al.*, 2013), desta maneira, considerando que a estabilidade enzimática diminui com o aumento da temperatura, o derivado de xilanase de *B. subtilis* obtido será ainda mais estável nas condições de processo, ou seja, apresentará tempo de meia vida consideravelmente superior ao observado a 56°C.

Desta maneira, apesar do rendimento e atividade recuperada observados, a técnica proposta é interessante uma vez que a quitosana é um suporte barato com diversas vantagens e de fácil obtenção e o processo de ativação com grupos glioxil proposto além de novo mostrou-se efetivo e aumentou a estabilidade do derivado, compensando assim o baixo rendimento de imobilização

4. CONCLUSÃO

Foi possível ativar o suporte de quitosana com grupos glioxil utilizando epícloridrina como reagente de partida, a epícloridrina permitiu também o entrecruzamento do gel de quitosana aumentando sua estabilidade operacional e evitando sua dissolução quando empregado em valores ácidos de pH. A técnica de imobilização de enzimas por ligação covalente multipontual em quitosana-glioxil se mostrou eficiente para a imobilização da xilanase recombinante de *Bacillus subtilis* (BsXA). O processo apresentou rendimento de imobilização de 76.2% e atividade recuperada de 53.6%. A perda de atividade e rendimento de imobilização observados podem ser justificados considerando-se que a quitosana é um suporte de baixo custo e o derivado obtido é significativamente mais estável que a enzima solúvel (75x mais estável à pH 5.5 e 56 °C).

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

6. REFERÊNCIAS

- ARAGON, C.C.; SANTOS, A.F.; RUIZ-MATUTE, A.I.; CORZO, N. Continuous production of xylooligosaccharides in a packed bed reactor with immobilized-stabilized biocatalysts of xilanase from *Aspergillus versicolor*. *J Mol Catal B-Enzim*, v.98, p.8-14, 2013
- BERNIER, R.; DESROCHERS, M.; JURASEK, L.; PAICE, M. Isolation and characterization of a xilanase from *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microb*, v.46, n.2, p.511-514, 1983
- BRADFORD, M.M.; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, v 72, p.248-254, 1976.
- CARVALHO, A.F.A.; NETO, P.O.; SILVA, D.F.; PASTORE, G.M. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. *Food Res Int*, v.51, 75-85, 2013.
- FENGEL, D.; WENEGER, G. Wood – Chemistry Ultrastructure Reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 1983.
- GUISAN, J. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes.

Enzyme Microb Tech, v. 10, p. 375-382, 1988).

KUMAR, M.N.V.R. A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym*, v.46, p-1-27, 2000

LOPEZ, F.; MONTES, T.; FUENTES, M.; ALONSO, N.; GRAZU, V.; BETANCOR, L.; et al. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. *J Biotechnol*, v.116, p.1-10, 2005

MANRICH, A. Produção de xilo-oligosacarídeos a partir de lignocelulósicos pré-tratados com xilanases imobilizadas e estabilizadas. Tese de doutorado, Universidade Federal de São Carlos, Fevereiro de 2012.

MENDES A.A; CASTRO, H.F.; RODRIGUES, D.S.; ADRIANO, W.S.; TARDIOLI, P.W.; et al. Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* v.38, p.1055-1066, 2011.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.*, v.31, 426-428, 1959.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technol.*, v.96, p.673-686, 2005.

MUSSATO, S.I.; DRAGONE, G.; GUIMARÃES, P.M.R.; SILVA, J.P.A.; et al. Technological trends, global market and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnol. Adv.*, v.28, p.817-830, 2010.

NIGAM, P.S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Prog. Energ. Combust.*, v.37, p.52-68, 2011.

RODRIGUES, D.S.; MENDES, A.A.; ADRIANO, W.S.; GONÇALVES, L.R.B.; GIORDANO, R.L.C. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. *J Mol Catal B-Enzim*, v.51, p.100-109, 2008

ROJAS, M.J.; KOPP, W.K.; NETO, A.B.; et al. Imobilização e estabilização de xilanase recombinante de *Bacillus subtilis* em glioxil-agarose. XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos, X Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, Fóz do Iguaçu, 2013.

SHELDON, R.A. Enzyme Immobilization: The quest for optimum performance. *Adv. Synth. Catal.*, v.349, p.1289-1307, 2007

SILVA, C.R.; ZANGIROLAMI, T.C.; et al. Na innovative biocatalyst for production of ethanol from xylose in a continuous bioreactor. *Enzyme Microb Tech*, v.50, p.35-42, 2012.