

Caracterização da atividade lignocelulolítica de enzimas ruminais de ovinos quanto à ação de agentes redutores

Barbosa, Islan Cruz^{1}; Ribeiro, Regislane Pinto²;
Sousa, Ana Márjory Paiva²; Salles, Hévila
Oliveira³*

Enzimas termoestáveis são importantes para uso nos bioprocessos industriais. As enzimas lignocelulolíticas de micro-organismos ruminais aderidas à fibra do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) no rúmen de ovinos Morada Nova foram inicialmente caracterizadas como termoestáveis, mantendo sua atividade mesmo após 10 minutos a 90 °C. Como a presença de pontes de dissulfeto nas enzimas pode estar envolvida no mecanismo de estabilidade dessas moléculas, o objetivo desse trabalho foi caracterizar a atividade das proteínas aderidas à fibra (PAFs) do BCA obtida do conteúdo ruminal de ovinos Morada Nova, quanto à ação dos agentes redutores de pontes dissulfeto. Animais adaptados a uma dieta com BCA (100 g de BCA por dia no cocho) foram submetidos à coleta de conteúdo ruminal, quatro horas após administração de BCA (100 g) diretamente no rúmen, via fístula. O material obtido foi filtrado, lavado com Phosphate Buffer Saline (PBS, pH 7,2, sem Ca²⁺ e Mg²⁺) e as PAFs foram eluídas com ureia 8 M durante 15 min, filtradas, dialisadas contra água (*cut off* de 12 kDa) e liofilizadas. As PAFs foram extraídas com água, homogeneizadas e centrifugadas (14.000 x g por 5 min a 23 °C), e o sobrenadante coletado foi quantificado utilizando o método de Bradford. Às amostras de PAFs liofilizadas foi adicionada uma solução de β-mercaptoetanol (5%) ou de Ditiotreitól (DTT, a 50, 100 e 200 mM) e avaliada atividade celulolítica e hemicelulolítica

por difusão em gel de ágar. Para avaliar atividade enzimática foram depositados, por placa, 10 mL de solução de ágar (2%) com carboximetilcelulose ou xilano (1%) em Tampão Fosfato de Sódio 0,1 M, no pH 6,9 e 6,0, respectivamente, para cada substrato. Em poços 50 µL foram aplicadas as PAFs (10 µg de proteínas/poço) e como controle positivo foi utilizada enzima comercial de *Aspergillus niger* (0,005 µg de proteína, Sigma-Aldrich®, 1,24 U/mg). As placas foram incubadas a 38 °C por 21 horas. Após a incubação, foram coradas com vermelho Congo 0,1% por 40 minutos e descoradas com NaCl 1 M até a visualização dos halos, onde os mesmos foram medidos com o auxílio de paquímetro. As PAFs solúveis em água apresentaram atividade celulolítica (20,92±0,88 mm) e hemicelulolítica (21,11±0,25 mm) próxima da enzima comercial de *Aspergillus niger* (22,88±0,23 mm e 23,28±0,63 mm, respectivamente). Os agentes redutores, nas diferentes concentrações, não interferiram nas atividades celulolítica e hemicelulolítica das PAFs. Conclui-se que as pontes dissulfeto não estão envolvidas no sítio ativo das PAFs, nem interferem no mesmo.

Palavras-Chave: Celulase, Xilanase, microrganismos, Morada Nova, pontes dissulfeto.

Suporte financeiro: CNPq (Processo 441531/2014-8), FUNCAP.

¹Aluno do Curso de Graduação de Tecnologia em Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Bolsista BICT/FUNCAP/Embrapa.

²Aluna de Doutorado pela Rede Nordeste de Biotecnologia-RENORBIO, Universidade Estadual do Ceará.

³Pesquisadora da Embrapa Caprinos e Ovinos, Orientadora.

*Apresentador do pôster: islan.barbosa.7@hotmail.com