

Caracterização e purificação de beta-glicosidase de *Aspergillus niger* por cromatografia de troca iônica

Anderson Baraldo Júnior¹; Paulo Waldir Tardioli²; Cristiane Sanchez Farinas³

¹Aluno de iniciação científica em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, UFSCar, andersonbjunior@gmail.com.br

²Professor Adjunto, Departamento de Engenharia Química, UFSCar;

³Pesquisadora, Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, SP.

No Brasil, dentre os resíduos lignocelulósicos da agroindústria com grande potencial de produção de etanol de segunda geração (etanol 2G), destaca-se o bagaço de cana-de-açúcar. As etapas envolvidas no processo são pré-tratamento do bagaço para remoção de lignina e hemicelulose, hidrólise enzimática da celulose e fermentação das hexoses por *Saccharomyces cerevisiae*. A etapa de hidrólise enzimática requer a ação sinérgica de endoglicanases, exoglicanases e β -glicosidases (BGs). Embora preparações comerciais estejam disponíveis no mercado, pode ser necessária a suplementação dessas preparações com BG a fim de eliminar o efeito inibitório de celobiose sobre a ação das demais enzimas do complexo celulolítico. Assim, justifica-se a purificação e caracterização de BG. Neste trabalho, BG foi produzida por cultivo de *Aspergillus niger* em meio sólido, sob condições padronizadas pela EMBRAPA Instrumentação, por fermentação em estado sólido. Em trabalhos anteriores, BG foi purificada por cromatografia de troca iônica (processo em batelada) e caracterizada quanto ao efeito do pH, temperatura e estabilidade térmica a 37 e 50°C. BG no estado bruto apresentou atividade enzimática máxima em torno de 55°C e pH 4,5 e meias-vidas a 37°C e 50°C de 342h e 148h, respectivamente. A purificação do extrato enzimático por cromatografia de troca iônica rendeu um fator de purificação de 2,6. BG purificada apresentou atividade enzimática máxima em pH e temperatura similares aos da enzima bruta. Entretanto, as meias-vidas a 37°C e 50°C reduziram drasticamente, 53h e 8h, respectivamente. Este é um resultado incomum, pois, normalmente, processos de purificação melhoram a estabilidade da enzima, devido à eliminação de proteases e outras proteínas presentes no extrato bruto capazes de agregarem-se com a molécula alvo. O foco principal deste trabalho foi estudar a viabilidade da purificação de BG por troca iônica em coluna. Neste processo, uma coluna foi empacotada com a matriz de cromatografia (MANAE-agarose com baixa ativação) e equilibrada com tampão cromatográfico. Após aplicação do extrato enzimático bruto à coluna, coletaram-se frações e analisaram-se proteínas e atividade enzimática. Em seguida, as proteínas adsorvidas na matriz foram eluídas da coluna variando-se a força iônica do tampão de cromatografia. Proteínas contaminantes foram desorvidas com tampão contendo 150 mM de NaCl e a BG foi totalmente desorvida com tampão contendo 300 mM de NaCl. Na etapa de adsorção, BG foi excluída da coluna com 21-28 min, obtendo-se uma solução enzimática com atividade específica de 70,4 U/mg, o que corresponde a um fator de purificação de 6,0. Na etapa de eluição, BG foi excluída da coluna com 32 min, obtendo-se uma solução enzimática com atividade específica de 66,5 U/mg, o que corresponde a um fator de purificação de 5,7. Ambos os fatores de purificação foram aproximadamente duas vezes maiores que aquele obtido no processo em batelada. Eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida revelou a pureza das soluções enzimáticas. As BGs purificadas também serão imobilizadas covalentemente em suportes sólidos e investigadas quanto a sua ação na biomassa vegetal (bagaço de cana).

Apoio financeiro: Embrapa Instrumentação.

Área: Agropecuária.