



## Caracterização Bioquímica de $\beta$ -glicosidase Produzida pelo Fungo Termofílico *Myceliophthora thermophila* M.7.7: Estabilidade e Efeitos da Temperatura e do pH

Emily Colferai Bonfá<sup>1</sup>, Gabriella Fernanda Miranda Rodrigues<sup>2</sup>, Eleni Gomes<sup>3</sup> e Gustavo Orlando Bonilla-Rodriguez<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Mestranda em Microbiologia, IBILCE-UNESP, E-mail: emilycbonfa@gmail.com

<sup>2</sup>Estudante de Graduação em Química, IBILCE-UNESP <sup>3</sup>IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto SP 15054-000

### RESUMO

As celulases podem ser utilizadas na bioconversão da celulose de resíduos agroindustriais em açúcares fermentáveis, visando à obtenção de combustíveis renováveis e produtos químicos. As  $\beta$ -glicosidases são cruciais para a total sacarificação da celulose. Portanto, é fundamental o conhecimento dos parâmetros bioquímicos das enzimas. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar a  $\beta$ -glicosidase de 50 kDa (BG50) produzida pelo fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* M.7.7 cultivado em estado sólido (CES). A caracterização da BG50 mostrou que a enzima se mantém estável durante dois meses em todas as condições de conservação avaliadas. A atividade ótima da BG50 aconteceu a 60 °C e em pH 5,0 usando pNPG como substrato. A estabilidade térmica se manteve entre as temperaturas de 30 a 60 °C, o pH apresentou estabilidade de 3 a 5.

Palavras-chave: Celulase,  $\beta$ -glicosidase, bioetanol, *Myceliophthora thermophila*.

### INTRODUÇÃO

A sacarificação enzimática da celulose cristalina por enzimas de fungos e bactérias com o objetivo de obter açúcares fermentáveis para a produção de bioetanol ou etanol de segunda geração em processos em batelada requer a ação de várias enzimas altamente específicas, cujo produto final é, principalmente, o monômero de glicose. O complexo celulolítico é composto por uma grande variedade de enzimas hidrolíticas e de oxirredução que agem sinergicamente, sendo as principais hidrolases endoglicanases, exoglicanases e  $\beta$ -glicosidases (Gómez, 1985; Riedel, 1997).

É conhecido que as enzimas do complexo celulolítico são inibidas pela celobiose ou pelo produto final da hidrólise, a glicose (Rabelo, 2010). O entendimento dos mecanismos inibitórios da  $\beta$ -glicosidase pela glicose permite propor rotas de remoção dos inibidores, resultando em processos mais eficientes, de menor custo econômico e o uso de menores quantidades de enzimas, quando aplicadas em processos de sacarificação (Srivastava; Gopalkrishnan; Ramachandran, 1984; Jeffries; Jin, 2000; Sun; Cheng, 2002).

### MATERIAL E MÉTODOS

Para a determinação da atividade de  $\beta$ -glicosidase, 50  $\mu$ L da solução enzimática foram adicionados a uma mistura de 250  $\mu$ L de solução tampão acetato de sódio (0,1 mol/L e pH 5,0) e 250  $\mu$ L de 4-nitrofenol- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (4 mmol/L) – PNPG (Sigma-Aldrich). A reação foi mantida a 60 °C por 5 minutos e interrompida com 2 mL de solução 2 mol/L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. O nitrofenol liberado foi quantificado por espectrofotometria a 410 nm. A metodologia foi executada conforme Leite *et al.* (2008). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1,0  $\mu$ mol de nitrofenol por minuto de reação.

Para a estimativa da massa molecular das isoformas em condições desnaturantes, foi feita uma eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDSPAGE), usando gel de corrida a 10 (m/v) e gel de empilhamento a 5 (m/v). O gel foi dividido em duas partes, uma denominada “A”, corada com *Coomassie Blue* e a outra denominada “B”, corada pelo método esculina/cloreto férrico. A estimativa das massas moleculares das isoformas foi determinada comparando as bandas do zimograma com



os padrões de proteínas globulares de massa molecular conhecida. Para determinar o tempo de incubação ideal dos ensaios enzimáticos, foram realizadas as atividades enzimáticas sob diferentes tempos de reação (2 a 20 minutos). Foi adotado o tempo máximo de incubação que permitiu a liberação linear do produto em relação ao tempo.

A estabilidade da enzima durante o ensaio enzimático foi avaliada conforme proposto por Selwyn (1965). Foi feita a atividade enzimática com a amostra sem diluir e diluída duas vezes, variando também o tempo de reação (30 s, 1, 3 e 5 min). Como a concentração real da enzima não era conhecida, para confeccionar o gráfico foram multiplicados por dois os tempos das reações sem diluição e montado o gráfico no programa QtiPlot 0.9.8.8 Svn 2255 (© 2004-2011 Ion Vasilief). O valor de  $[P]$  é determinado apenas pelo produto do tempo e da concentração de enzima. Assim, se um conjunto de curvas de progresso da reação (Abs vs. tempo multiplicado pela concentração de enzima) no qual os parâmetros da reação são mantidos constantes (com exceção da concentração de enzima), devem se sobrepor:  $[E].t = f[P]$ .

Também foi avaliado o efeito da temperatura na conservação da enzima em temperaturas de -80, -10, 10 e 25 °C. Os ensaios enzimáticos foram feitos após 6 horas, 1 dia, 1 mês e 2 meses em cada condição.

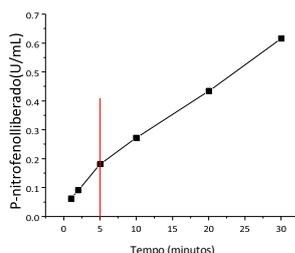
O comportamento da atividade da enzima em função do pH foi estudado incubando a solução enzimática e o substrato em diversos tampões, de tal maneira que o pH fosse próximo do pKa do mesmo: acetato (pH 3,0 a 5,5), MES (pH 5,5-6,5), HEPES (pH 7,0-8,0) e glicinaNaOH (pH 8,5 a 10,5), sendo medida a atividade a 60 °C. O efeito do pH sobre a estabilidade da enzima foi realizado mantendo a solução enzimática por 24 horas, a 25 °C, em tampões de pH 3 a 11, e o ensaio da atividade enzimática realizado nas condições de pH e de temperatura ótimos.

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi avaliado incubando-se a

mistura de reação em temperaturas de 30 a 80 °C e a atividade foi medida no pH determinado como ótimo. Para avaliar o efeito da temperatura sobre a estabilidade da enzima em ausência de substrato, a solução enzimática foi mantida por uma hora, em temperaturas de 30 a 80 °C. Após esse período, foram tomadas amostras para o ensaio da atividade enzimática, realizado nas condições de pH e de temperatura ótimos.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Figura 1, é possível observar que o tempo máximo para os ensaios foi de 5 minutos.



**Figura 1.** Determinação do tempo de incubação para os ensaios de cinética enzimática, representado pela linha vermelha.

A Figura 2, mostra a sobreposição dos resultados de atividade, confirmando a estabilidade da enzima. Curvas distintas, que não consigam ser sobrepostas, indicam que a enzima não se manteve estável no processo, sendo dependente da concentração de enzima utilizada (PINTO, 2009).

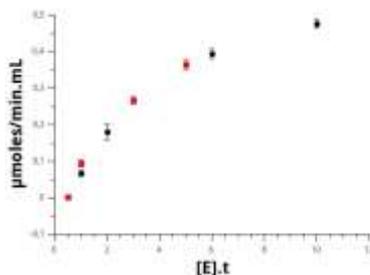


Figura 2. Teste de estabilidade de Selwyn.

No que se refere à temperatura de estocagem, a atividade enzimática se manteve estável durante dois meses em todas as condições a que foi submetida, inclusive quando mantida à temperatura ambiente, em torno de 25 °C (resultados não mostrados).

Os valores ótimos de atividade enzimática foram observados em pH 5,0 (Figura 3A) e 60 °C (Figura 4A). A estabilidade da BG50 se mostrou maior na faixa de pH de 3 a 5 (Figura 3B) e, em relação à temperatura, os maiores valores se mostraram de 30 a 60 °C (Figura 4B)

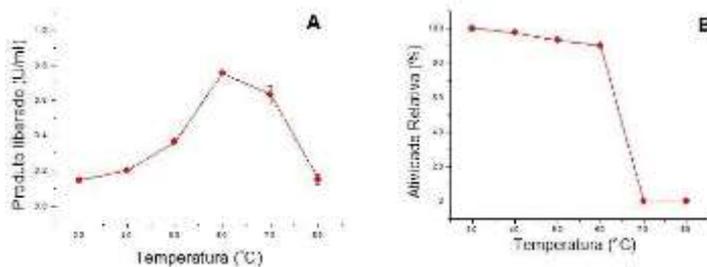


Figura 3 . Efeito da temperatura sobre a atividade da BG50. A) Temperatura ótima. B) Termoestabilidade.

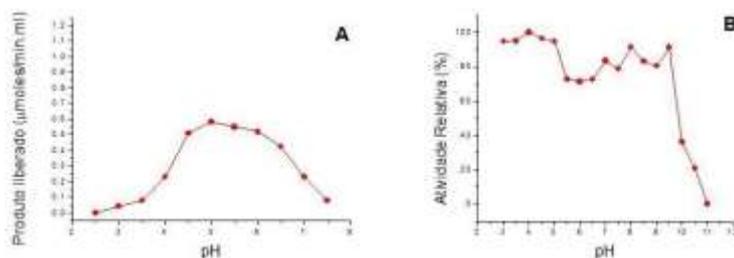


Figura 4. Efeito do pH sobre a BG50. A) pH ótimo. B) Estabilidade em relação ao pH.

## CONCLUSÕES

A BG50 produzida pelo fungo *Myceliophthora thermophila* mostrou elevada estabilidade em relação à temperatura de conservação e ao pH. As pesquisas prosseguem no sentido de analisar de forma mais pormenorizada a sua termoestabilidade e eventuais aplicações.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GOMEZ, C.H.R.J. Sacarificação da hemicelulose do bagaço de cana de açúcar e sua fermentação por *Pachysolen tannophilus*. Tese (Doutorado em Ciências do Alimento) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1985.



JEFFRIES, T. W.; JIN, Y.S. Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts . Ethanol and Thermotolerance in the Bioconversion. v. 47, p. 221-268, 2000.

LEITE, R. S. R. et al. Production and characteristics comparison of crude  $\beta$ -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* and *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. Enzyme and Microbial Technology, v. 43, n. 6, p. 391–395, 2008.

RABELO, S. C. Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração. Tese (Doutorado em Engenharia Química)- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

RIEDEL, K. Microbial BOD sensor: Problems of practical use and comparison of sensor BOD and BOD5. Frontiers in Biosensorics II Practical Applications, p.99–108, 1997.

SELWYN, M.J. A simple test for inactivation of an enzyme during assay. Biochim. Biophys. Acta vol. 105, p. 193-195, 1965.

SRIVASTAVA, S. K.; GOPALKRISHNAN, K. S.; RAMACHANDRAN, K. B. Kinetic characterization of a crude  $\beta$ -d-glucosidase from *Aspergillus wentii* Pt 2804. Enzyme and Microbial Technology, v. 6, n. 11, p. 508– 512, 1984.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. Bioresource Technology, v. 83, n. 1, p. 1–11, 2002.

**Agradecimentos:** CAPES e FAPESP.