

## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### Efeito de Íons, Reagentes e Compostos Fenólicos na Atividade de $\beta$ -glicosidase Produzida pelo Fungo Termofílico *Myceliophthora thermophila* M.7.7

Emily Colferai Bonfá<sup>1</sup>, Júlia Raspante Martins<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 Ciências Biológicas, IBILCE-UNESP

<sup>3</sup>IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto SP 15054-000

#### RESUMO

*As celulasas estão presentes em grande parte das aplicações industriais de enzimas, principalmente na conversão de resíduos agro-industriais em açúcares fermentáveis. O conhecimento das respostas dessas enzimas frente a diferentes substratos pode definir a eficiência de hidrólise e do processo biotecnológico no qual poderia ser incorporada. O objetivo foi avaliar o efeito de íons, reagentes e compostos fenólicos na atividade  $\beta$ -glicosidase de 50 kDa (BG50) produzida pelo fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* M.7.7 cultivado em estado sólido. Testes de íons e reagentes mostraram diferenças nos efeitos sobre a atividade da enzima dependendo do substrato, principalmente com a adição de Ditiotreitól (DTT) utilizando celobiose, e inibição completa com  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  para pNPG e celobiose. A enzima não mostrou efeito inibitório quando na presença de nove compostos fenólicos. Os resultados enfatizam a importância de investigar potencialidades de  $\beta$ -glicosidasas baseadas na celobiose, por ser seu substrato natural.*

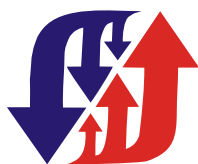
Palavras-chave: Bioetanol.  $\beta$ -glicosidase. *Myceliophthora thermophila*. Compostos Fenólicos.

#### INTRODUÇÃO

O complexo celulolítico é composto por uma grande variedade de enzimas hidrolíticas e de oxirredução que agem sinergicamente, sendo as principais do primeiro grupo as endoglicanasas, as exoglicanasas e as  $\beta$ -glicosidasas (RIEDEL, 1997; GÓMEZ, 1985).

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 a processos de sacarificação (JEFFRIES; JIN, 2000; SRIVASTAVA; GOPALKRISHNAN; RAMACHANDRAN, 1984; SUN; CHENG, 2002).

Devido às condições empregadas nos pré-tratamentos térmicos e químicos, é originada uma série de compostos que podem atuar como inibidores potenciais tanto da hidrólise enzimática, quanto da fermentação. Os tipos de compostos tóxicos e suas concentrações em hidrolisados lignocelulósicos dependem tanto da matéria-prima, quanto das condições operacionais empregadas no pré-tratamento. Um dos produtos de degradação, que são potenciais inibidores da fermentação os derivados fenólicos (PALMQVIST; HAHN-HÅGERDAL, 2000).



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### MATERIAL E MÉTODOS

Para a determinação da atividade de  $\beta$ -glicosidase, com o substrato pNPG foi executada metodologia conforme Leite et al. (2008). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1,0  $\mu\text{mol}$  de nitrofenol por minuto de reação. Tendo como substrato a celobiose, a metodologia foi adaptada de Gonçalves (2010), na qual são realizadas duas reações. Na reação 1, 20  $\mu\text{L}$  da solução enzimática foram adicionados a 10  $\mu\text{L}$  de celobiose (4mM) em tampão acetato de sódio (0,1 M e pH 5,0). A reação foi mantida a 50 °C por 20 minutos e interrompida pela imersão dos tubos em água fervente por 2 minutos. Em seguida foi determinada a concentração de glicose liberada pelo Kit enzimático de Glicose (KATAL) (reação 2), onde 1 mL do Kit foi adicionado a 10  $\mu\text{L}$  da reação 1 e a reação 2 foi mantida a 37 °C por 15 minutos. Para interromper a reação os tubos foram imersos no gelo. A leitura foi realizada em espectrofotometria a 505 nm e a quantidade de glicose liberada foi determinada a partir de uma curva padrão de glicose.

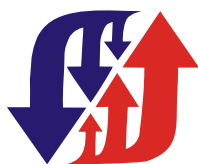
A influência de íons, reagentes e compostos fenólicos foi avaliada medindo a atividade da BG50 com substratos celobiose e pNPG na presença de NaCl,  $\text{MnCl}_2$ , KCl,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{LiCl}_2$ , álcool polivinílico (PVA), dimetilsulfóxido (DMSO), Triton-X-100, isopropanol, polietilenoglicol (PEG), etanol, acetona, ácido etilenodiamino tetracético (EDTA), ditiotreitól (DTT), tensoativo dodecil sulfato de sódio (SDS), glicose, ácido tânico, ácido p-comárico, ácido siríngico, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido 4-hidroxibenzoico, vanilina, ácido vanílico, siríngalgeido em concentração 2,5 mM na mistura reacional. Devido à coloração dos reagentes Ácido Tânico, Ácido Ferúlico e Siríngalgeido as concentrações foram alteradas para 0,062, 0,5 e 0,25 mM para atividade com substrato pNPG. Os resultados foram comparados com os da amostra controle (referência de 100 %) utilizando o teste t de Student, adotando como significantes valores de  $p < 0,05$ , realizada pelo software QtiPlot 0.9.8.8 Svn 2255 (© 2004-2011 Ion Vasilief).

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

A atividade enzimática foi inibida totalmente pelos íons  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$  utilizando ambos os substratos, pelo íon  $\text{Zn}^{2+}$  e pelo reagente DTT utilizando substrato pNPG, mostrando diferença entre os substratos, como destacado nas tabelas 1 e 2. Nenhum íon induziu elevação significativa de atividade enzimática.

**Tabela 1.** Efeito de íons sobre a atividade enzimática da BG50. (\*) diferenças significantes ( $p < 0,05$ ) no teste t de Student.

	Atividade residual % [média e desvio padrão (DP)]			
	pNPG	DP	Celobiose	DP
Controle	100	$\pm 13,3$	100	$\pm 0,3$
NaCl	70,6*	$\pm 6,7$	57,1*	$\pm 8,4$
$\text{MnCl}_2$	49,6*	$\pm 9,9$	67,1*	$\pm 8,8$
KCl	76,2*	$\pm 5,0$	81,9	$\pm 15,6$
$\text{FeCl}_3$	0,0*	0	0,0*	0
$\text{BaCl}_2$	105,4	$\pm 6,9$	76,7	$\pm 11,1$
$\text{MgCl}_2$	100,0	$\pm 7,8$	62,7*	$\pm 9,1$
$\text{AlCl}_3$	83,5	$\pm 6,9$	43,7*	$\pm 7,2$
$\text{ZnCl}_2$	63,0	$\pm 10,6$	0,0*	0
$\text{CuCl}_2$	0,0*	0	0,0*	0
$\text{LiCl}_2$	102,6	$\pm 2,7$	128,4	$\pm 37,3$



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

**Tabela 2.** Efeito de reagentes sobre a atividade enzimática da BG50. (\*) diferenças significantes ( $p < 0,05$ ) no teste t de Student.

	Atividade residual % [média e desvio padrão (DP)]			
	pNPG	DP	Celobiose	DP
Controle	100	± 13,3	100	± 0,3
DMSO	92,9	± 5,6	57,0*	± 1,3
PVA	71,2	± 3,0	56,8	± 19,0
Triton	45,0	± 10,6	57,5*	± 8,9
Isopropanol	70,1	± 7,9	66,5	± 14,9
PEG 8000	67,6	± 6,2	58,5*	± 8,3
Etanol	70,6	± 15,9	55,6*	± 5,7
Acetona	76,5	± 8,9	52,8*	± 1,3
EDTA	68,3	± 17,0	62,0*	± 8,5
DTT	82,5	± 6,9	0,0*	0
SDS	82,4	± 9,2	60,6	± 27,1

Uma inibição significativa por  $Fe^{2+}$  e  $Cu^{2+}$  também foi observada para uma  $\beta$ -glicosidase produzida por *Thermoascus aurantiacus* em trabalho apresentado por Leite et al. (2007).

A independência de cofatores e uma ampla tolerância à presença de íons observada para a BG50 de *M. thermophila* apresenta similaridade com a  $\beta$ -glicosidase produzida pelo fungo *Aureobasidium pullulans* em trabalho apresentado por Saha, Freer e Bothast (1994).

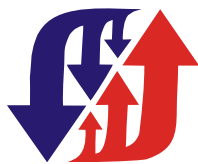
O teste do efeito de compostos fenólicos (Tabela 3) mostra uma ampla resistência da BG50 a vários compostos, mostrando ser uma enzima com alto potencial de aplicação na hidrólise de materiais lignocelulósicos que liberam esses derivados fenólicos. Não houve inibição significativa em nenhum dos resultados obtidos.

**Tabela 3.** Efeito de fenóis sobre a atividade enzimática da BG50 com os substratos pNPG e celobiose, medida como atividade residual % [média e desvio padrão (DP)].

	mM	pNPG	DP	mM	celobiose	DP
Controle	2,5	100	±13,7	2,5	100	±8,1
Ácido Tânico	0,0625	-	-	2,5	99,5	±12,3
Ácido p-Comárico	2,5	70,5	±17,4	2,5	118,0	±0,9
Ácido Siringico	2,5	95,2	±18,9	2,5	111,4	±2,3
Ácido Gálico	2,5	91,1	±14,4	2,5	75,3	±2,3
Ácido Ferúlico	0,5	97,4	±3,1	2,5	99,1	±4,2
Ácido 4-hidroxibenzoico	2,5	97,5	±6,0	2,5	109,7	±1,4
Vanilina	2,5	94,0	±1,3	2,5	118,0	±4,7
Ácido Vanílico	2,5	87,6	±0,1	2,5	125,1	±4,7
Siringaldeído	0,25	92,8	±36,9	2,5	96,4	±2,3

Os efeitos de fenóis em  $\beta$ -glicosidases a partir de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* foram comparados por Ximenes e colaboradores (2011) dado o efeito dramático do Ácido Tânico na glicose formada a partir da atividade enzimática.

Além da celobiose o pNPG foi também utilizado como um substrato para medir a atividade de  $\beta$ -glicosidase. O Ácido Tânico teve pouco efeito sobre a  $\beta$ -glicosidase numa preparação comercial de *Aspergillus niger*, ao passo que quase inibiu completamente a hidrólise de pNPG. Para os outros fenóis testados somente o Ácido Gálico inibiu a  $\beta$ -glicosidase de *Trichoderma reesei* para a atividade medida com pNPG. Ximenes e colaboradores (2011) concluíram que a  $\beta$ -glicosidase de *Trichoderma reesei* é mais suscetível a inibição do que a  $\beta$ -glicosidase de *Aspergillus niger*.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### CONCLUSÕES

A enzima não foi inibida significativamente quando testada na presença de nove compostos fenólicos eventualmente presentes em biomassa lignocelulósica pré-tratada, o que constitui um aspecto relevante, e apresentou ampla tolerância à presença de íons.

### 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-SP, 1985.
- GONÇALVES, D. Produção de álcool combustível a partir de hidrolizados enzimáticos de bagaço de cana-de-açúcar por leveduras industriais e leveduras fermentadoras de xilose. Dissertação (Mestre em Biotecnologia), **Universidade Federal de Santa Catarina**, Florianópolis-SC, 2010.
- 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* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 6, p. 391-395, 2008.
- LEITE, R.S.R., BOCCHINI, D.A., MARTINS, E.S., SILVA, D., GOMES, E., SILVA, R. Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aureobasidium pullulans* on solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.137, p. 281-288, 2007.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**. v. 74, p. 25-33, 2000.
- 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-SP, 2010.
- RIEDEL, K. Microbial BOD sensor: Problems of practical use and comparison of sensor BOD and BOD<sub>5</sub>. **Frontiers in Biosensorics II Practical Applications**, p.99-108, 1997.
- SAHA, B. C.; FREER, S.N.; BOTHAST, R.J. Production, purification and properties of thermostable  $\beta$ -glucosidase from a color variant strain of *Aureobasidium pullulans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 3774-3780, 1994.
- 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.
- XIMENES, E.; KIM, Y.; MOSIER, N.; DIEN, B.; LADISCH, M. Deactivation of celulasas by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 48, p. 54-60, 2011.