

## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### **Produção de $\beta$ -Glucosidase por *Aspergillus awamori* em Culturas em Estado Sólido Utilizando Folhas de Coroa de Abacaxi e Aplicação na Sacarificação de Celulose**

**Verônica Sayuri Nishida, Emanuelle Neiverth de Freitas, Vanesa Gesser, Adelar Bracht, Rosane Marina Peralta**

Universidade Estadual de Maringá– Departamento de Bioquímica  
Av. Colombo, 5.790 CEP 87020-900  
Maringá - Pr Telefones: (44) 3011-1372  
E-mail: rmperalta@uem.br

#### **RESUMO**

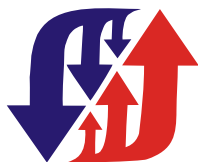
*Neste trabalho uma beta-glicosidase de Aspergillus awamori, com massa molecular de 180 kDa foi produzida em cultivos em estado sólido utilizando uma mistura de folhas de coroa de abacaxi e farelo de trigo (4:1). Atividade máxima da enzima foi obtida após 8 dias de cultivo a 28° C e umidade inicial de 80%. Extratos contendo beta-glicosidasas de A. awamori foram combinados a uma celulase comercial de T. reesei para sacarificar celulose microcristalina, elevando de 25 para 55  $\mu\text{mol/mL}$  a glicose liberada após 24 h de hidrólise.*

Palavras-chave: *Aspergillus* sp, beta-glicosidase, bioetanol, sacarificação

#### **INTRODUÇÃO**

As  $\beta$ -glicosidasas (E.C. 3.2.1.21) catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 a partir da extremidade não redutora de oligossacarídeos, dissacarídeos e glicosídeos conjugados. As  $\beta$ -glicosidasas apresentam grande importância biotecnológica, tendo um amplo espectro de aplicações. Associadas às endo- e exoglucanases, as beta-glicosidasas são necessárias para o processo de sacarificação completa do componente celulose da matéria orgânica vegetal. Esta última aplicação tem recebido atenção, devido ao interesse na obtenção do etanol de segunda geração. O componente celulose da matéria lignocelulósica é inicialmente hidrolisado por endo- (EC 3.2.1.4) e exo-glucanases (EC 3.2.1.91) o que leva à geração de pequenos oligossacarídeos e celobiose. A beta-glicosidase finaliza a hidrólise gerando glicose. Para o processo ser eficiente é necessária a presença concomitante de todas as enzimas, principalmente pelo fato de que endo- e exoglucanases são inibidas pelo acúmulo de celobiose.

O mais conhecido fungo celulolítico é o *Trichoderma reesei* que apresenta grande potencial produtor de endo- e exoglucanases, mas não produz quantidades significativas de beta-glicosidase (Singhania et al. 2013). Para uma eficiente hidrólise da celulose torna-se necessária, portanto, a adição de uma beta-glicosidase de outro microrganismo ao pool enzimático originário do *T. reesei*. Diversas espécies do gênero *Aspergillus* tem sido descritas como boas produtoras de beta-glicosidasas e vários trabalhos tem abordado a possibilidade de enriquecer o pool enzimático de *T. reesei* com beta-glicosidasas de *Aspergillus* sp. Os objetivos deste trabalho foram: 1) produzir e caracterizar uma beta-glucosidase de *Aspergillus awamori* em cultivos em estado sólido utilizando como substrato um resíduo agrícola ainda



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

pouco explorado, as folhas de coroa de abacaxi e 2) avaliar a capacidade da enzima associada à um pool comercial de celulasas de *Trichoderma reesei* em hidrolisar celulose microcristalina.

### MATERIAL E MÉTODOS

O fungo filamentoso *A. awamori* foi cultivado em estado sólido utilizando 5 g de cada de substratos ou associação dos substratos em frascos Erlenmeyer de 125 mL e solução mineral para obtenção de umidade inicial de 80%. Após esterilização a 121° C por 20 minutos,  $10^6$ – $10^9$  esporos foram adicionados aos frascos, sendo as culturas mantidas em estufa a 28° C por períodos variáveis. Para a obtenção dos extratos enzimáticos brutos um volume de 20 mL de água destilada foi adicionado às culturas e após homogeneização, mantidas a 4° C por 1 h. As misturas foram em seguida filtradas em gaze e os filtrados das culturas centrifugados a 9000 rpm por 20 min a 4° C. Os sobrenadantes obtidos foram considerados como sendo os extratos enzimáticos brutos.

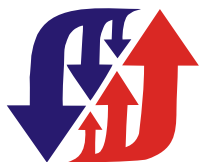
A atividade da beta-glicosidase foi avaliada utilizando-se o substrato sintético *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo (PNPG), na concentração de 1mg/mL em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,5, a 45° C. A reação foi interrompida pela adição de tetraborato de sódio saturado e a absorbância do produto formado *p*-nitrofenolato foi determinada a 410 nm. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu$ mol de *p*-nitrofenol por min..

Para caracterização eletroforética da enzima, os filtrados foram dialisados e concentrados por liofilização. A eletroforese foi conduzida em condições não desnaturantes em gel de poliacrilamida a 10%. Ao término da corrida eletroforética, o gel foi cortado e submetidos à coloração utilizando Coomassie Blue G e à coloração para visualização da atividade beta-glicosidase (Peralta et al., 1990).

A sacarificação da celulose microcristalina, foi conduzida utilizando-se 0,5 g de celulose microcristalina e 10 mL de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5,0. As hidrólises iniciaram-se pela adição de 1) 1 mg/mL da celulase comercial (5 U/mL) de *Trichoderma reesei*; 2) 1 mg/mL da celulase comercial de *Trichoderma reesei* mais 100  $\mu$ L da beta-glicosidase de *A. awamori*. As misturas foram mantidas em agitador de culturas a 150 rpm a 37° C por 6, 12 e 24 h. Glicose liberada foi estimada pelo método da glicose oxidase utilizando um kit comercial.

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

O efeito de diferentes substratos na produção da beta-glicosidase por *A. awamori* foi avaliado (Fig. 1A). Folhas de coroa de abacaxi destacaram-se como substrato, produzindo níveis de enzima próximos aos obtidos nos cultivos desenvolvidos com o tradicional substrato de culturas em estado sólido, farelo de trigo,  $535\pm 20$  e  $652\pm 50$  U/g de substrato, respectivamente. Outros substratos utilizados tais como sabugo de milho, bagaço de cana, casca de laranja, casca de soja, casca de café e casca de maracujá proporcionaram a obtenção de atividades beta-glicosidase inferiores a 300 U/ g de substrato. Fig 1B mostra o efeito do tempo de cultivo na produção da enzima. Tanto nas folhas de coroa de abacaxi quanto no farelo de trigo, a máxima produção de enzima foi obtida com 8 dias de cultivo. Optou-se por



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

escolher no presente estudo as folhas de coroa de abacaxi como substrato, pois é um resíduo ainda pouco utilizado como substrato para fungos filamentosos. Porém, para tentar melhorar a produção da enzima, as culturas foram suplementadas com farelo de trigo a 20%. A mistura de folha de coroa de abacaxi suplementada com farelo de trigo a 20% possibilitou a obtenção de atividade beta-glicosidase semelhante à obtida com os cultivos em farelo de trigo, ao redor de 850 U/g de substrato.

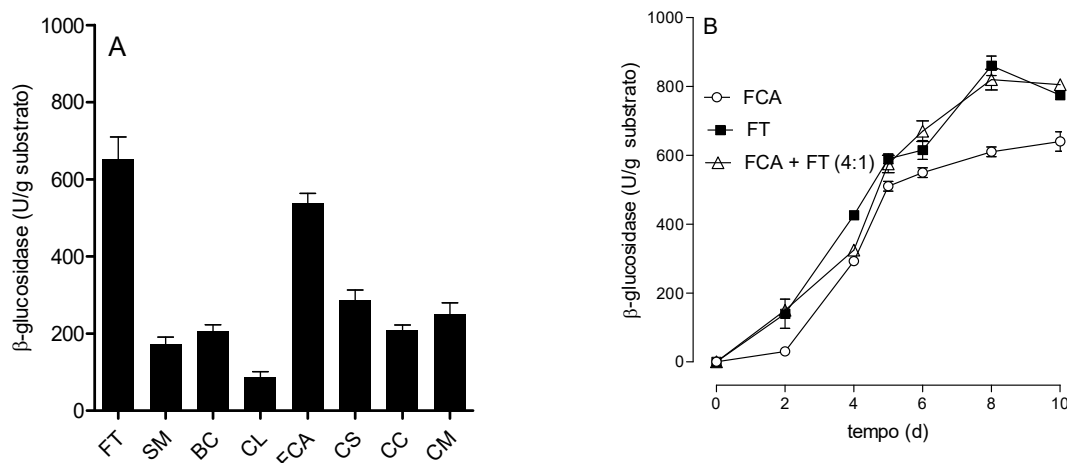
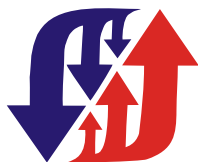


Figura 1. Efeito do substrato (A) e tempo de cultivo (B) na produção de beta-glicosidase por *A. awamori* em cultivos em estado sólido. FT=farelo de trigo; SM=sabugo de milho; BC=bagaço de cana; CL=casca de laranja; FCA=folhas de coroa de abacaxi; CS=casca de soja; CC=casca de café; CM=casca de maracujá. FCA+FT= folha de coroa de abacaxi + farelo de trigo na proporção 4:1

O perfil eletroforético do extrato enzimático bruto de *A. awamori* é apresentado na Fig. 3. Pelo menos 8 bandas proteicas foram detectadas, com massas moleculares entre 180 e 24 kDa foram observadas no gel de poliacrilamida a 10% corado com Coomassie Blue. Utilizando revelação específica para a atividade da beta-glicosidase pode-se observar que uma beta-glicosidase com massa molecular aparente de 180 kDa foi produzida nas condições utilizadas neste trabalho.

Extratos contendo beta-glicosidase de *A. awamori* foram combinados a uma celulase comercial de *T. reesei* para sacarificar celulose microcristalina (Fig. 2B). A liberação de glicose foi significativamente maior quando se utilizou o pool enzimático contendo o extrato de *A. awamori* associado à celulase comercial de *T. reesei*. Diversos estudos evidenciam que a utilização do complexo enzimático de *T. reesei* leva a acúmulo de celobiose, indicando a baixa atividade da beta-glicosidase contida neste extrato multienzimático (Gottschalk et al. 2010). Como as leveduras são incapazes de fermentar a celobiose, os processos de sacarificação de celulose visando posterior fermentação para obtenção de etanol de segunda geração devem favorecer a hidrólise completa até glicose, o que só é obtido pela adição da beta-glicosidase (Singhania et al. 2013).



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

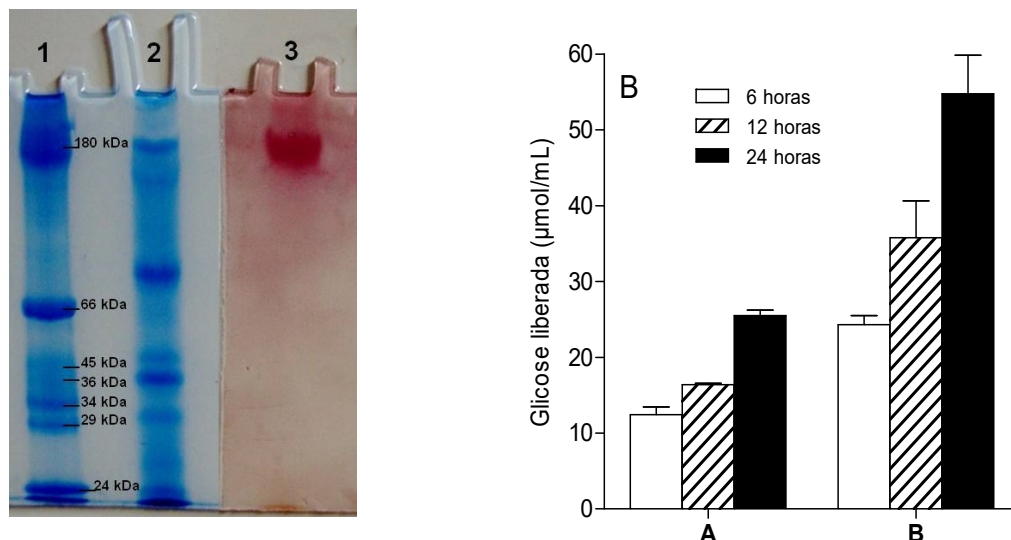


Figura 2. Eletroforese sob condições não desnaturantes em gel de poliacrilamida a 10% da  $\beta$ -glicosidase de *Aspergillus awamori*. 1) Padrões moleculares corados com Coomassie Blue R; 2); extratos de *A. awamori* cultivado em meio sólido contendo folhas de coroa de abacaxi e farelo de trigo na proporção 80:20 corados com Coomassie Blue R; 3); Zimograma extratos de *A. awamori* cultivado em meio sólido contendo folhas de coroa de abacaxi e farelo de trigo na proporção 4:1. Em B: Liberação de açúcares redutores e glicose no processo de sacarificação enzimática da celulose microcristalina. A) somente celulase comercial; B) Celulase comercial com suplementação de 100  $\mu$ L de extrato de *A. awamori* contendo  $\beta$ -glicosidase. O meio reacional continha 0,5 g de celulose microcristalina em 10 mL de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5,0.

### CONCLUSÕES

Neste trabalho, avaliamos a possibilidade de utilização das folhas de coroa de abacaxi como substrato para a produção de beta-glicosidase de *A. awamori* em cultivos em estado sólido. Uma única enzima, com massa molar de 180 kDa foi produzida nesta condição. Tal enzima, associada às celulases comerciais de *T. reesei*, aumentou em 2,2 vezes a glicose liberada após 24 h de hidrólise da celulose microcristalina.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gottschalk LMF, Oliveira RA, Bon EP, Da S. 2010. Cellulases, xylanases,  $\beta$ -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. *Biochemical Engineering Journal* 51:72–78
- Peralta RM, Terenzi HF, Jorge JA. 1990. Beta-D-glycosidase activities of *Hemicola grisea*: biochemical and kinetic characterization of a multifunctional enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta* 3:243–249
- Singhania RR, Patel AK, Sukumaran RK, Larroche C, Pandey A. 2013. Role and significance of beta-glicosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technology* 127:500–507