

UNICAMP

# Hidrólise Catalítica de substratos Celulósicos para a Produção de Bioetanol: Um estudo por Dinâmica Molecular

Munir S. Skaf (orientador) e Lucas C. da Silva  
Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Brasil

## Introdução

Produzir etanol de segunda geração de modo eficiente e econômico tornou-se um foco de pesquisa estratégico no campo das energias renováveis. Dois terços da energia da cana-de-açúcar, para citar um tipo de biomassa abundante no Brasil, estocada no bagaço e palha de cana-de-açúcar são utilizados ainda de forma ineficiente com o emprego de processos inadequados e custosos. A produção em larga escala de etanol depende da reação de hidrólise da ligação O-glicosídica de policassacarídeos para a formação de unidades livres de glicose disponíveis para a fermentação alcoólica. Sistemas enzimáticos são conhecidos por sua alta eficácia e especificidade e apresentam, portanto, as características necessárias para o processamento eficiente de celulose e seus correlatos (celodextrinas, celobiose, hemicelulose).

Este trabalho destina-se ao estudo da reação de hidrólise enzimática da ligação O-glicosídica da celotetraose pela  $\beta$ -glucosidase ( $\beta$ glB) presente na bactéria gram-positiva *Paenibacillus polymyxa*.<sup>1</sup> O estudo por Dinâmica Molecular, baseado nas estruturas cristalográficas existentes, permite avaliar a dinâmica do sítio catalítico na presença do substrato a nível atômico. O conhecimento adquirido através do estudo do sistema proposto permite um melhor entendimento do processo completo de hidrólise de polissacarídeos como a celulose. A hidrólise de celodextrinas e celobiose se apresenta como etapa final do processamento de biomassa.

## Metodologia

**Sistema:** Coordenadas cristalográficas (PDB – código 2z1s) para a  $\beta$ glB (b-glucosidase + celotetraose) adquiridas no *RSCB Protein Data Bank*. Foram simulados 4 sistemas: cel, celH, glu, gluH. Onde cel refere-se ao sistema enzima-substrato celotetraose, glu ao sistema enzima-substrato glicose e H indica se o resíduo GLU167 encontra-se ou não protonado. Todos os sistemas foram solvatados (modelo TIP3P para água) e neutralizados com íons Na<sup>+</sup>.

**Simulações:** As simulações foram realizadas com pressão e temperatura constantes (NTP ensemble: 1 bar, 300K) sob condições periódicas de contorno e cutoff de 10.0 Å para as interações de Lennard-Jones. Os parâmetros para os campos de força parm94 e Glycam06 foram utilizados para a enzima e os ligantes, respectivamente. Empregou-se o software Amber 10 em todas as simulações.

## Resultados

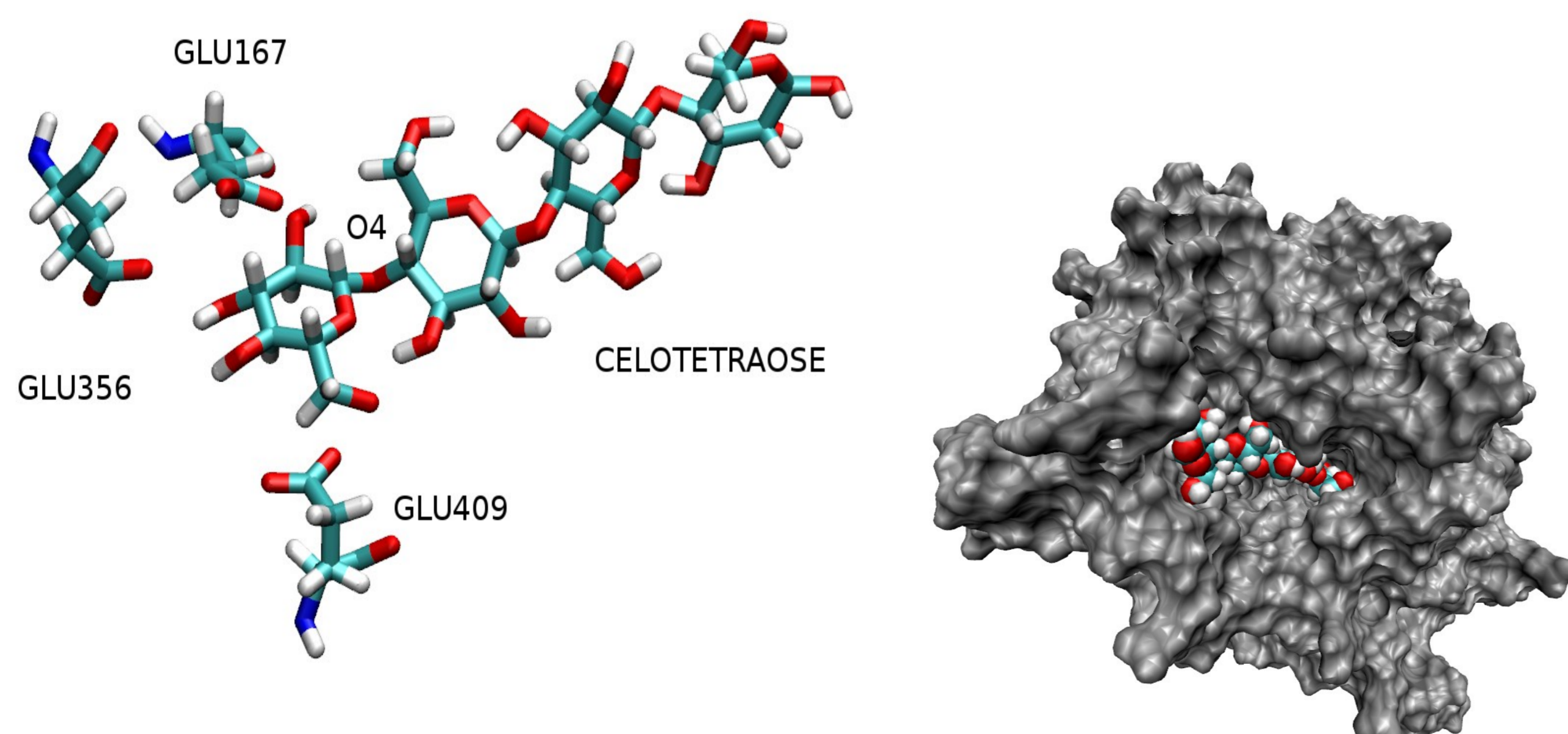
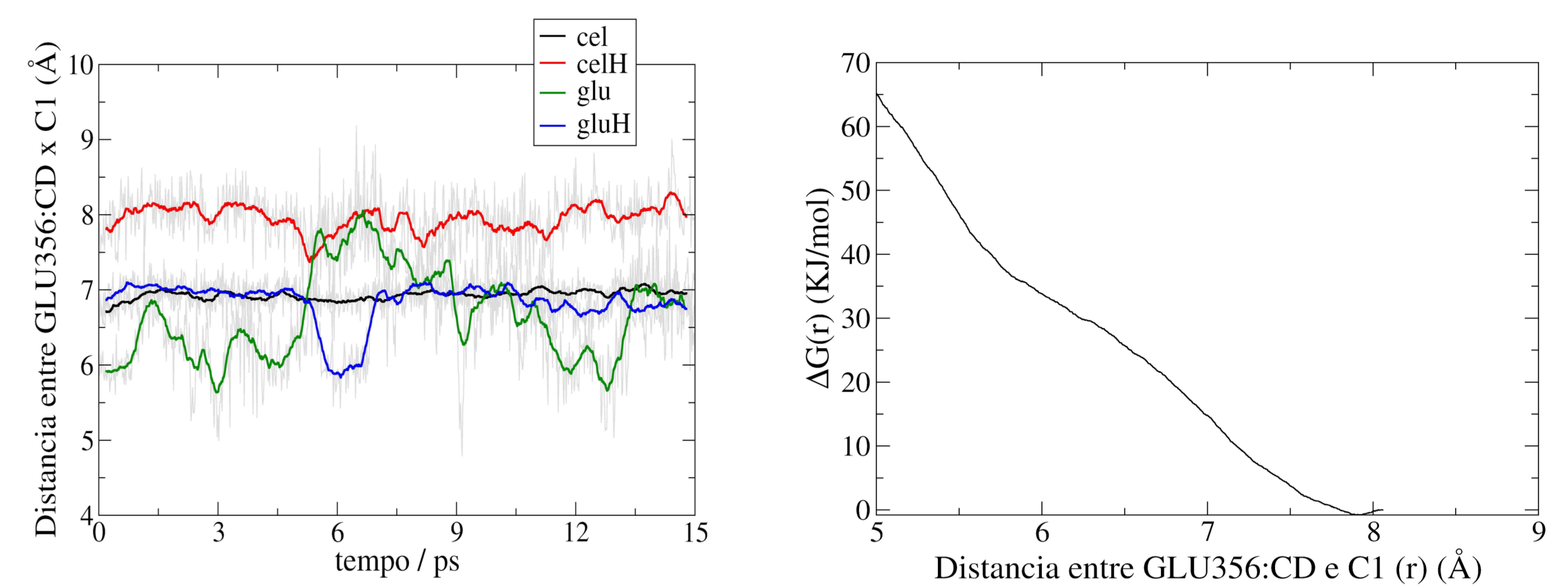


Figura 1- Esquerda: Estrutura do sítio catalítico da  $\beta$ glB com celotetraose. Direita: Representação tridimensional da enzima com o substrato ligado (PDB 2z1s).

Os dois glutamatos (GLU356 e GLU167, **Figura 1**), segundo o mecanismo proposto por Koshland, deveriam atuar em conjunto. A reação de hidrólise proposta envolveria a doação de um próton do GLU167 para O4 glicosídico e o ataque nucleofílico do GLU356 ao carbono anomérico (C1). O produto imediato da reação, suportado por cristalografia, é uma unidade de glicose ligada covalentemente à enzima pelo GLU356, liberando o restante do substrato.



Gráficos 1 e 2 – Gráfico 1 (esquerda): Distâncias entre os átomos GLU356:CD (carbono da carbonila) e o carbono anomérico da unidade de glicose (C1). Gráfico 2: Resultado para SMD (Steered Molecular Dynamics) para o sistema celH.

As distâncias entre GLU356:CD e C1 são grandes para as simulações cel e celH (**Gráfico 1**), o que dificultaria o mecanismo tipo Koshland. Já as simulações dos sistemas glu e gluH apresentam picos de aproximação entre os dois átomos analisados, resultado da aproximação entre a glicose e o GLU356. Ambas as aproximações da glicose são guiadas pelo GLU409 e TYR298 através de ligações de H e interações de van der Waals, respectivamente (**Figura 2**). Interessante notar como a aproximação projeta C1 em direção aos oxigênios do GLU356 – tornando possível um ataque nucleofílico.

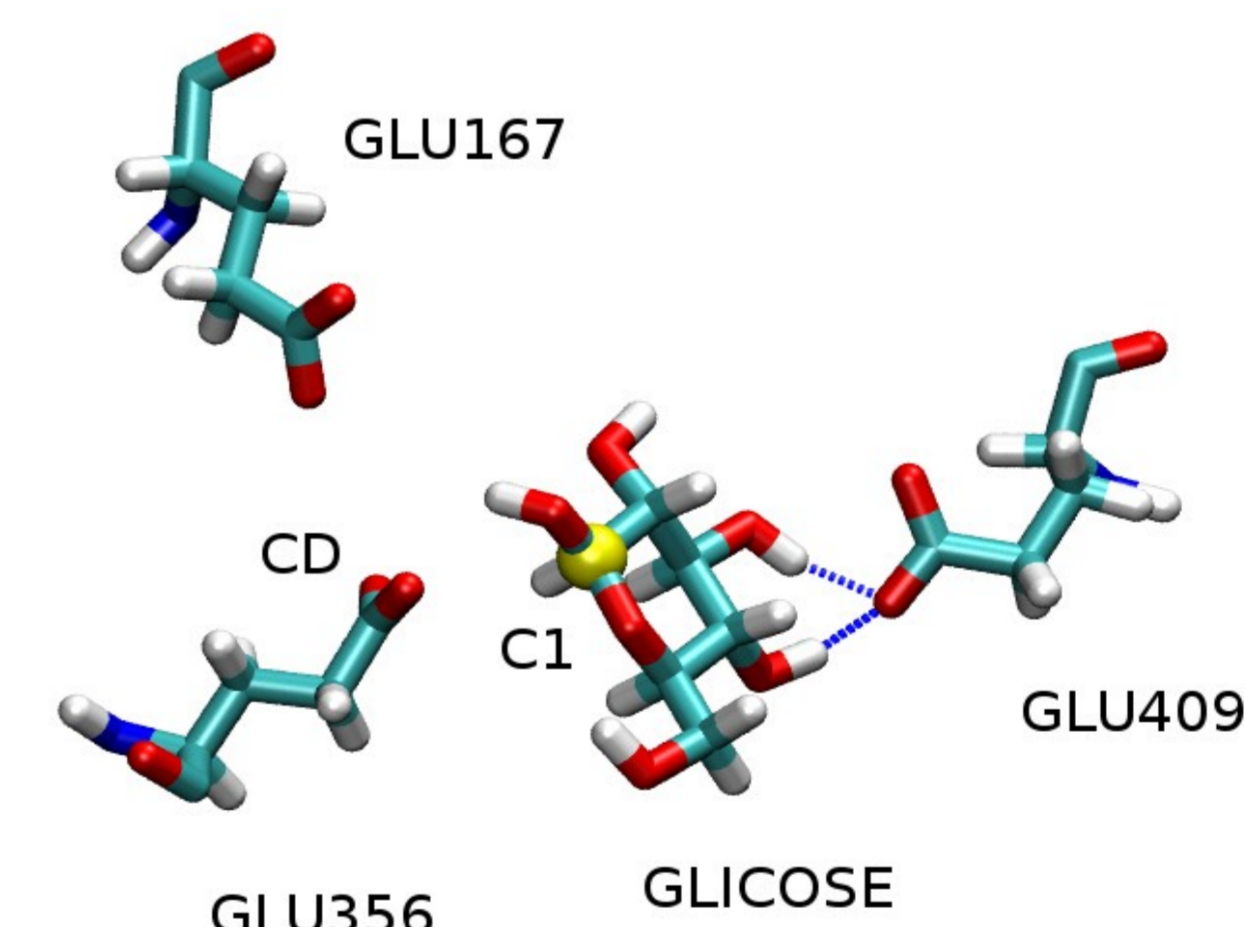


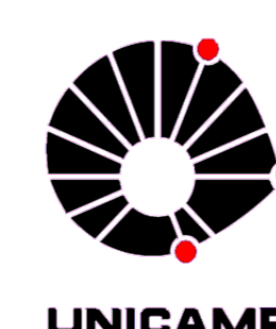
Figura 2- Estrutura do sítio catalítico após a aproximação entre GLU356:CD e C1 (em amarelo) nos sistemas glu e gluH.

Simulações SMD (Steered Molecular Dynamics) indicaram que aproximar o substrato como um todo do resíduo GLU356 é energeticamente desfavorável: há uma barreira de aproximadamente 60 KJ.mol<sup>-1</sup> para aproximar o carbono anomérico C1 3 Å em relação ao GLU356 (**Gráfico 2**).

## Conclusão

As evidências mostram que um mecanismo do tipo Koshland pode não se aplicar à  $\beta$ glB. Resíduos importantes como o GLU409 indicam que o sítio catalítico está preparado para direcionar uma unidade de glicose livre para o ataque nucleofílico pelo GLU356, supondo que a hidrólise da ligação O-glicosídica ocorra separadamente ao ataque nucleofílico. Estudos posteriores devem indicar se a hipótese de um mecanismo onde GLU167 e GLU356 agem separadamente é viável.

## Agradecimentos



(1) Isorna, P., Polaina, J., LatorreGarcia, L., Canada, F.J., Gonzalez, B., and SanzAparicio, J. Crystal structures of Paenibacillus polymyxa betaglycosidase B complexes reveal the molecular basis of substrate specificity and give new insights into the catalytic machinery of family I glycosidases, *J. Mol. Biol.* **371**, 1204-1218, (2007).