

**SAMARA GRACIANE DA COSTA**

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE  $\beta$ -GLICOSIDASES DE  
*Penicillium chrysogenum* E SUA APLICAÇÃO NA SUPLEMENTAÇÃO DE  
COQUETÉIS ENZIMÁTICOS PARA A HIDRÓLISE DE BIOMASSAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e Classificação da  
Biblioteca Central da UFV

T

C837p  
2013  
Costa, Samara Graciane da, 1989-  
Purificação e caracterização bioquímica de  $\beta$ -glicosidases  
de *Penicillium chrysogenum* e sua aplicação na suplementação de  
coquetéis enzimáticos para a hidrólise de biomassas / Samara Graciane  
da Costa. - Viçosa, MG, 2013.  
xvii, 128f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Valéria Monteze Guimarães.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.111-128.

1. Beta-glicosidases. 2. *Penicillium chrysogenum*. I. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 572.7

**SAMARA GRACIANE DA COSTA**

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE  $\beta$ -GLICOSIDASES DE  
*Penicillium chrysogenum* E SUA APLICAÇÃO NA SUPLEMENTAÇÃO DE  
COQUETÉIS ENZIMÁTICOS PARA A HIDRÓLISE DE BIOMASSAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de julho de 2013.

---

Eduardo Basílio de Oliveira

---

Fernando Ariel Genta  
(Coorientador)

---

Valéria Monteze Guimarães  
(Orientadora)

Dedico este trabalho

À Deus

Aos meus pais

Ao meu irmão

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por ter iluminado meus passos e ter me ajudado a superar todos os obstáculos que apareceram em meu caminho.

Ao meu coorientador, Dr<sup>o</sup> Fernando Genta, por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa, por ter confiado no meu trabalho e acreditado em mim. Agradeço pela troca de ideias e pelas discussões científicas que possibilitaram meu engrandecimento e por sempre ter me dado ânimo, quando eu me desesperava achando que não ia conseguir. Obrigada pelos conselhos e toda a atenção dedicada a este trabalho.

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Valéria Monteze Guimarães, pela oportunidade de iniciar na carreira científica, por todo apoio e conhecimento passado durante os anos que participei de seu grupo de pesquisa.

Ao professor Dr<sup>o</sup> Eduardo Basílio de Oliveira por se disponibilizar a me auxiliar nas correções deste trabalho.

Agradeço a todos os professores que passaram por minha vida acadêmica, pelos ensinamentos.

Ao professor, Dr<sup>o</sup> Richard Hemmi Valente, pelas análises de espectrometria de massas. E ao Severino Lucena e ao Irapoã do LABFISI-FIOCRUZ pelo preparo e fornecimento das biomassas coloidais

A minha mãe e a meu pai, Mauren e Antônio, e a meu irmão Marcelo, pelo amor, incentivo e carinho e por terem sempre me apoiado nas minhas decisões. Obrigada, sem vocês eu nada seria, vocês foram meus alicerces nesta caminhada.

Ao Lucas pela paciência, pelo amor, carinho, compreensão e apoio incondicional. Você tornou cada um dos meus dias mais felizes.

Aos colegas do LABIFISI que me acolheram carinhosamente quando cheguei ao Rio de Janeiro e principalmente as colegas que ficavam até tarde no laboratório. A companhia de vocês tornaram as noites de trabalho mais agradáveis.

Aos colegas do LAFIQ pela força e apoio na hora da correria. Agradeço de maneira especial a Carol por me contagiar sempre com sua alegria e me apoiar na hora do desespero me mostrando que de alguma maneira eu ia conseguir que as coisas dessem certo. À Camila que mostrou-se sempre preocupada e solícita me oferecendo ajuda sempre. E ao Léo, amigo sempre presente, me mostrando que a vida não é só correria.

Ao secretário da Pós Graduação em Bioquímica Agrícola, Eduardo Monteiro por ter sido sempre solícito e atencioso, respondendo a todas as minhas dúvidas.

Agradeço a Capes, CNPq, FAPEMIG e FAPERJ pelo suporte financeiro.

Enfim agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivos Específicos.....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
3.1 $\beta$ -glicosidases (EC 3.2.1.21) .....	4
3.2 Características de $\beta$ -glicosidases Fúngicas .....	7
3.3 Estruturas de $\beta$ -glicosidases .....	8
3.4 Mecanismo de Ligação ao substrato e Especificidade.....	9
3.5 Mecanismo de Hidrólise de $\beta$ -glicosidases .....	11
3.6 Aplicações Gerais de $\beta$ -glicosidases.....	13
3.6.1 Biodegradação de Resíduos Lignocelulósicos .....	13
3.6.2 Hidrólise de Isoflavonas.....	15
3.6.3 Doença de Gaucher .....	16
3.6.4 Outras Aplicações Biotecnológicas .....	17
3.7 Degradação de Biomassa e Produção de Enzimas Celulolíticas por Fungos..	19
3.7.1 <i>Penicillium chrysogenum</i> .....	20
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	21
4.1 Reagentes.....	21
4.2 Origem e Manutenção do Microrganismo .....	21
4.3 Indução da Biossíntese de $\beta$ -glicosidases em Meio Líquido.....	22
4.4 Ensaio Enzimáticos.....	22
4.4.1 Atividade enzimática sobre p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo.....	22
4.4.2 Atividade sobre metilumbeliferil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo.....	23
4.4.3 Atividade sobre octil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo e oligossacarídeos .....	23

4.4.4	Atividade sobre Polímeros.....	24
4.5	Quantificação Proteína.....	25
4.5.1	Método BCA Miniaturizado.....	25
4.5.2	Método Prata Coloidal.....	25
4.6	Purificação $\beta$ -glicosidases.....	26
4.6.1	Precipitação com Sulfato de Amônio, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .....	26
4.6.2	Cromatografia de Interação Hidrofóbica.....	26
4.6.3	Cromatografia de exclusão molecular.....	27
4.7	SDS-PAGE e Estimativa de Massa Molecular.....	28
4.8	Zimografia.....	29
4.9	Espectrometria de Massas.....	29
4.10	Estabilização Pc $\beta$ Glu2.....	31
4.11	Determinação da Configuração do Carbono Anomérico dos Produtos de Reação.....	31
4.12	Caracterização Bioquímica das $\beta$ -glicosidases.....	32
4.12.1	Efeito da Temperatura.....	32
4.12.2	Efeito do pH.....	33
4.12.3	Especificidade para o Substrato.....	33
4.12.4	Efeito de Íons.....	34
4.13	Caracterização Cinética.....	34
4.13.1	Determinação Parâmetros Cinéticos.....	34
4.13.2	Determinação de padrões de inibição e constantes de inibição ( $K_i$ ).....	35
4.13.3	Afinidade de Ligação a Resíduos Glicosil em Subsítios no Sítio Ativo.....	36
4.14	Hidrólise Enzimática.....	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1	Indução da produção de $\beta$ -glicosidases por <i>Penicillium chrysogenum</i> em meio líquido.....	40
5.2	Purificação de $\beta$ -glicosidases de <i>P. chrysogenum</i> .....	43
5.3	Caracterização Bioquímica das $\beta$ -glicosidases.....	50
5.3.1	Estimativa da Massa Molecular.....	50
5.3.2	Zimografia.....	54



5.3.3	Estabilização de P $\alpha$ Glu2.....	55
5.3.4	Determinação da Configuração do Carbono Anomérico dos Produtos de Reação 59	
5.3.5	Sequenciamento de $\beta$ -glicosidases por espectrometria de massas.....	63
5.3.6	Efeito da Temperatura.....	65
5.3.7	Efeito do pH.....	71
5.3.8	Efeito de Íons.....	75
5.3.9	Especificidade para o Substrato .....	77
5.4	Caracterização Cinética .....	80
5.4.1	Especificidade frente a diferentes substratos .....	80
5.4.2	Inibição por Celobiose e Glicose .....	87
5.4.3	Afinidade Subsítios.....	95
5.5	Hidrólise Enzimática.....	99
6	CONCLUSÕES.....	109
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	111

## RESUMO

COSTA, Samara Graciane da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **Purificação e caracterização bioquímica de  $\beta$ -glicosidases de *Penicillium chrysogenum* e sua aplicação na suplementação de coquetéis enzimáticos para a hidrólise de biomassas.** Orientadora: Valéria Monteze Guimarães. Coorientador: Fernando Ariel Genta.

$\beta$ -glicosidases tem recebido atenção em vários campos por causa de suas aplicações práticas. Assim, os objetivos deste trabalho foram estabelecer as condições de cultivo de *P. chrysogenum* em meio líquido contendo farelo de trigo como fonte de carbono, purificar e caracterizar as  $\beta$ -glicosidases secretadas. O sobrenadante da cultura foi submetido a precipitação por sulfato de amônio e cromatografia de interação hidrofóbica. Duas  $\beta$ -glicosidases foram encontradas, Pc $\beta$ Glu1 e Pc $\beta$ Glu2. Para melhor purificação Pc $\beta$ Glu2 foi submetida à cromatografia de exclusão molecular. Pc $\beta$ Glu1 demonstrou ser mais estável que Pc $\beta$ Glu2 quando colocada a altas temperaturas e as duas apresentaram atividade ótima em pH 5,0. Pc $\beta$ Glu1 e Pc $\beta$ Glu2 possuem massas moleculares nativas de 241 kDa e 95 kDa, respectivamente. A determinação da configuração do carbono anomérico demonstrou que as enzimas atuam sobre seus substratos pelo mecanismo de retenção de configuração. A atividade de Pc $\beta$ Glu2 foi mais inibida pelos íons Cu<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> e Hg<sup>+</sup> a 10 mM que Pc $\beta$ Glu1. Pc $\beta$ Glu1 demonstrou cinética Micheliana para todos os substratos testados com valores de  $K_M$  variando de 0.09  $\pm$  0.01 (laminarina) a 1.7  $\pm$  0.1 mM (C2). Pc $\beta$ Glu2 demonstrou inibição pelos substratos MU $\beta$ Gli, pNP $\beta$ Gli, celodextrinas (C3, C4 and C5), octil $\beta$ Gli e Lb, com valores de  $K_M$  variando de 0.014  $\pm$  0.001 (MUG $\beta$ Gli) a 0.64  $\pm$  0.06 mM (Cb). As duas enzimas foram inibidas de forma competitiva por glicose e de acordo com um modelo de inibição mista por celobiose quando pNP $\beta$ Gli foi utilizado como substrato, sendo Pc $\beta$ Glu2 mais inibida que Pc $\beta$ Glu1. Pc $\beta$ Glu1 foi identificada com 15% de cobertura como produto codificado pelo gene Pc18g01940 e Pc $\beta$ Glu2 foi identificada como produto codificado pelo gene 20g10170 com 3,5 % de cobertura. As duas enzimas possuem maiores afinidade de ligação para resíduos de glicose nos subsítios -1 e +1. Comparando as duas enzimas, Pc $\beta$ Glu2 possui maior potencial para aplicação em hidrólise de biomassa, visto que foi capaz de hidrolisar biomassas sem a adição de enzimas suplementares.

## ABSTRACT

COSTA, Samara Graciane da, M.Sc., Federal University of Viçosa, July, 2013. **Purification and characterization of  $\beta$ -glucosidases from *Penicillium chrysogenum* and their application in supplementation of enzymatic cocktails for biomass hydrolysis.** Adviser: Valéria Monteze Guimarães. Co-Adviser: Fernando Ariel Genta.

$\beta$ -glucosidases have received attention in many fields, mainly because of their practical applications. The objectives of this work were to establish the best conditions for *P. chrysogenum* cultivation in submerged culture containing wheat bran as carbon source and the purification and characterization of  $\beta$ -glucosidases found. The culture supernatant was subjected to ammonium sulphate precipitation and hydrophobic interaction chromatography. Two  $\beta$ -glucosidases were found, Pc $\beta$ Glu1 and Pc $\beta$ Glu2. For further purification, Pc $\beta$ Glu2 was subjected to gel filtration chromatography. Pc $\beta$ Glu1 was more stable than Pc $\beta$ Glu2 when subjected to high temperatures and both have optimum activity at pH 5.0. Pc $\beta$ Glu1 and Pc $\beta$ Glu2 have respective native molecular masses of 241 kDa and 95 kDa (gel filtration). The determination of anomeric carbon configuration demonstrates that enzymes hydrolyze their substrates with retention of configuration. The Pc $\beta$ Glu2 activity was more inhibited for Cu<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> e Hg<sup>+</sup> at 10 mM than Pc $\beta$ Glu1. Pc $\beta$ Glu1 showed Michaelian-Menten kinetics for all substrates tested with  $K_M$  values ranging from 0.09  $\pm$  0.01 (laminarin) to 1.7  $\pm$  0.1 mM (C2). Pc $\beta$ Glu2 showed substrate inhibition for MU $\beta$ Glu, pNP $\beta$ Glu, cellodextrins (C3, C4 and C5), octil $\beta$ Glu and Lb, with  $K_M$  values ranging from 0.014  $\pm$  0.001 (MU $\beta$ Glu) to 0.64  $\pm$  0.06 mM (Cb). Glucose is competitive inhibitor and celobiose is a mixed-type inhibitor of Pc $\beta$ Glu1 and Pc $\beta$ Glu2 when pNP $\beta$ Glu is used as substrate. Pc $\beta$ Glu2 was more inhibited than Pc $\beta$ Glu1 for both inhibitors. Pc $\beta$ Glu1 was identified with 15% of coverage as the product coded by the gene Pc18g01940 and Pc $\beta$ Glu2 was identified as the product coded by the gene Pc20g10170 with 3,5 % of coverage. The two enzymes bind glucosyl residues with more affinity at -1 and +1 subsites. Comparing the two enzymes Pc $\beta$ Glu2 has more potential to be applied on biomass hydrolysis because it was able to hydrolyse several sources of biomass without addition of supplementary enzymes.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplos de algumas estruturas de substratos de $\beta$ -glicosidases (Cairns; Esen, 2010, traduzido para o português). .....	6
Figura 2: Estruturas de $\beta$ -glicosidases das famílias GH1 ( <i>Zea mays</i> ZmGlu1, código PDB 1E1E) e GH3 ( <i>Hordeum vulgare</i> , Exo1 $\beta$ -glicana glicohidrolase, código PDB 1EX1). As figuras foram coloridas de azul a vermelho a partir da cauda N-terminal (Cairns; Esen, 2010). .....	9
Figura 3: Mecanismo de hidrólise de ligações glicolíticas por $\beta$ -glicosidases, com inversão da configuração do carbono anomérico (Cairns; Esen, 2010, traduzido para o português). .....	11
Figura 4: Mecanismo de hidrólise de ligações glicolíticas por $\beta$ -glicosidases, com retenção da configuração do carbono anomérico (Cairns; Esen, 2010, traduzido para o português). .....	12
Figura 5: Estrutura de isoflavonas encontradas em soja (Rostagno et al., 2005, traduzido para o português). .....	16
Figura 6: Produção de $\beta$ -glicosidase ao longo do tempo, secretada por <i>Penicillium chrysogenum</i> UFV1 quando cultivado em meio líquido contendo farelo trigo como fonte de carbono. ....	42
Figura 7: Adição de sulfato de amônio em diferentes porcentagens de saturação para precipitação de proteínas do extrato de <i>Penicillium chrysogenum</i> . .....	45
Figura 8: Perfil cromatográfico obtido após submeter o sobrenadante do cultivo de <i>Penicillium chrysogenum</i> em meio líquido a precipitação com 50 % de sulfato de amônio e à cromatografia de interação hidrofóbica em coluna de Phenyl Sepharose. Pc $\beta$ Glu1 - frações 12 a 16 e Pc $\beta$ Glu2 - frações 25 a 30. ....	46
Figura 9: Perfil cromatográfico obtido após submeter Pc $\beta$ Glu2 a cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200. Pc $\beta$ Glu2: frações 29 a 32. ....	48
Figura 10: Eletroforese desnaturante (SDS PAGE 7,5 %) corada com prata demonstrando as etapas de purificação. A1: Marcador de peso molecular. A2: Extrato	

bruto. A3: Cromatografia de interação hidrofóbica Phenyl Sepharose, PcβGlu1. A4: Cromatografia de interação hidrofóbica Phenyl Sepharose, PcβGlu2. B1: Marcador de peso molecular. B2: Cromatografia de exclusão molecular Superdex 200, PcβGlu2. ...	50
Figura 11: Determinação da massa molecular das β-glicosidases purificadas de <i>Penicillium chrysogenum</i> por eletroforese desnaturante SDS PAGE (7,5 %).	51
Figura 12: Perfil cromatográfico obtido após submeter PcβGlu1 e PcβGlu2 a cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200, para estimativa de massa molecular da proteína em conformação nativa.	52
Figura 13: Determinação da massa molecular das β-glicosidases de <i>Penicillium chrysogenum</i> por filtração em gel em resina Superdex 200, em FPLC.	53
Figura 14: Eletroforese em gel nativo (PAGE 7,5 %) demonstrando a atividade de β-glicosidase sobre MuβGli. 1: Extrato bruto. 2: Cromatografia de interação hidrofóbica, pico 1 (PcβGlu1). 3: Cromatografia de interação hidrofóbica, pico 2 (PcβGlu2). 4: cromatografia de exclusão molecular de PcβGlu2.	54
Figura 15: Atividade de PcβGlu2 após cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200 e submetida a diversos ciclos de congelamento e descongelamento utilizando nitrogênio líquido.	55
Figura 16: Estabilização após adição de diferentes reagentes a PcβGlu2 após 1 dia de armazenamento a -20 °C.	57
Figura 17: Estabilização após adição de diferentes reagentes a PcβGlu2 após 1 dia de armazenamento a 4 °C.	58
Figura 18: Atividade de PcβGlu2 após adição de albumina 1 mg/mL e armazenada a 4 °C por cinco dias.	59
Figura 19: Identificação da configuração anomérica de D-Glucose, antes e após anomerização (fervura).	61
Figura 20: Identificação enzimática da configuração anomérica da D-glicose liberada por Pcβglu1. Curva A: D-glicose liberada por PcβGlu1. Curva B: D-glicose liberada por PcβGlu1 após anomerização (fervura).	62

Figura 21: Identificação enzimática da configuração anomérica da D-glicose liberada por Pcβglu2. Curva A: D-glicose liberada por PcβGlu2. Curva B: D-glicose liberada por PcβGlu2 após anomerização (fervura).....	62
Figura 22: Sequência da proteína codificada pelo gene Pc18g01940 de <i>P. chrysogenum</i> identificada como PcβGlu1. Os peptídeos em destaque foram identificados por espectrometria de massa a partir da proteína purificada. ....	64
Figura 23: Seqüência da proteína codificada pelo gene Pc20g10170 de <i>P. chrysogenum</i> identificada para PcβGlu2. Os peptídeos em destaque foram identificados por espectrometria de massa a partir da proteína purificada. ....	65
Figura 24: Efeito da temperatura sobre a atividade de PcβGlu1. A atividade relativa foi calculada considerando a atividade da enzima não submetida a incubação como 100 %.....	66
Figura 25: Efeito da temperatura sobre a atividade de PcβGlu1 na ausência ou presença de sulfato de amônio quando incubada a 50 °C. A atividade relativa foi calculada considerando a atividade da enzima não submetida a incubação como 100 %.....	68
Figura 26: Efeito da temperatura sobre a atividade de PcβGlu2. A atividade relativa foi calculada considerando a atividade da enzima não submetida a incubação como 100 %.....	69
Figura 27: Efeito do pH sobre a atividade de PcβGlu1. Determinação da atividade ótima de PcβGlu1 em diferentes valores de pH e efeito do pH sobre a estabilidade de PcβGlu1 quando incubada a 40 °C por 4 h em diferentes valores de pH. ....	72
Figura 28: Efeito do pH sobre a atividade de PcβGlu2. Determinação da atividade ótima de PcβGlu2 em diferentes valores de pH e efeito do pH sobre a estabilidade de PcβGlu2 quando incubada a 40 °C por 4 h em diferentes valores de pH. ....	73
Figura 29: Sistema de equilíbrio utilizado para descrever a inibição pelo substrato. ....	84
Figura 30: Hidrólise de MUβGli por PcβGlu2 em diferentes concentrações de substratos.....	85

Figura 31: Plote de Lineweaver–Burk para inibição de PcβGlu1 por glicose utilizando pNPβGli como substrato. Para determinação de $K_i$ a concentração de glicose variou de 0 a 5 mM. ....	88
Figura 32: Plote de inclinações obtido a partir do plote de Lineweaver-Burk para determinação de $K_i$ de PcβGlu1 por glicose. ....	89
Figura 33: Plote de Lineweaver–Burk para inibição de PcβGlu2 por glicose utilizando pNPβGli como substrato. Para determinação de $K_i$ a concentração de glicose variou de 0 a 10 mM. ....	89
Figura 34: Plote de inclinações obtido a partir do plote de Lineweaver-Burk para determinação de $K_i$ de PcβGlu2 por glicose. ....	90
Figura 35: Plote de Lineweaver–Burk para inibição de PcβGlu1 por celbiose utilizando pNPβGli como substrato. Para determinação de $K_i$ a concentração de celbiose variou de 0 a 18 mM. ....	91
Figura 36: Plote dos parâmetros da reta obtidos a partir do plote de Lineweaver-Burk para determinação de $K_i$ e $\alpha$ para inibição de PcβGlu1 por celbiose. ....	92
Figura 37: Plote de Lineweaver–Burk para inibição de PcβGlu2 por celbiose utilizando pNPβGli como substrato. Para determinação de $K_i$ a concentração de celbiose variou de 0 a 5 mM. ....	92
Figura 38: Plote dos parâmetros da reta obtidos a partir do plote de Lineweaver-Burk para determinação de $K_i$ e $\alpha$ para inibição de PcβGlu2 por celbiose. ....	93
Figura 39: Histograma demonstrando afinidade de subsítios de PcβGlu1 de <i>P. chrysogenum</i> por resíduos glicosil em oligocelodextrinas. A seta indica a posição da ligação glicosídica hidrolisada. ....	96
Figura 40: Histogramas demonstrando afinidade de subsítios de PcβGlu2 de <i>P. chrysogenum</i> por resíduos glicosil em oligocelodextrinas. ....	98
Figura 41: Hidrólise de bagaço de cana coloidal ao longo do tempo, utilizando enzimas de <i>T. reesei</i> 7 CBU/g de biomassa e PcβGlu1 10 CBU/g de biomassa. O controle não apresentou adição de enzimas. ....	101

Figura 42: Hidrólise de bagaço de cana coloidal ao longo do tempo, utilizando enzimas de <i>T. reesei</i> 7 CBU/g de biomassa e Pc $\beta$ Glu2 10 CBU/g de biomassa. O controle não apresentou adição de enzimas. ....	102
Figura 43: Hidrólise de folha de bananeira coloidal ao longo do tempo, utilizando enzimas de <i>T. reesei</i> 7 CBU/g de biomassa e Pc $\beta$ Glu1 10 CBU/g de biomassa. O controle não apresentou adição de enzimas.....	103
Figura 44: Hidrólise de folha de bananeira coloidal ao longo do tempo, utilizando enzimas de <i>T. reesei</i> 7 CBU/g de biomassa e Pc $\beta$ Glu2 10 CBU/g de biomassa. O controle não apresentou adição de enzimas.....	104
Figura 45: Hidrólise de fibra de coco coloidal ao longo do tempo, utilizando enzimas de <i>T. reesei</i> 7 CBU/g de biomassa e Pc $\beta$ Glu1 10 CBU/g de biomassa. O controle não apresentou adição de enzimas. ....	105
Figura 46: Hidrólise de fibra de coco coloidal ao longo do tempo, utilizando enzimas de <i>T. reesei</i> 7 CBU/g de biomassa e Pc $\beta$ Glu2 10 CBU/g de biomassa. O controle não apresentou adição de enzimas. ....	106



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela de purificação obtida para $\beta$ -glicosidases de <i>P. chrysogenum</i> utilizando o substrato fluorescente Mu $\beta$ Gli para identificação da atividade. ....	49
Tabela 2: Efeito da adição de estabilizantes na atividade de Pc $\beta$ Glu2 antes e após submeter a proteína a -20 ou 4 °C. ....	56
Tabela 3: Constante de terminativação ( $k_d$ ) e meia vida ( $T_{1/2}$ ) para Pc $\beta$ Glu1 na presença de sulfato de amônio e Pc $\beta$ Glu2 na presença de BSA, quando incubadas em diferentes temperaturas, obtidas a partir do plot log da atividade relativa contra tempo de incubação. ....	70
Tabela 4: Efeito de diferentes ions sobre a atividade de Pc $\beta$ Glu1 e Pc $\beta$ Glu2 após incubação a 40 °C por 30 min. ....	76
Tabela 5: Atividades de Pc $\beta$ Glu1 e Pc $\beta$ Glu2 purificadas de <i>Penicillium chrysogenum</i> sobre substratos sintéticos, naturais e polissacarídeos. ....	78
Tabela 6: Parâmetros cinéticos determinados a partir da hidrólise de diversos substratos por Pc $\beta$ Glu1. ....	81
Tabela 7: Parâmetros cinéticos determinados a partir da hidrólise de diversos substratos por Pc $\beta$ Glu2. ....	82
Tabela 8: Parâmetros e tipos de inibição determinada quando glicose e celobiose são utilizadas como inibidores de Pc $\beta$ Glu1 e Pc $\beta$ Glu2, utilizando pNP $\beta$ Gli como substrato. ....	93
Tabela 9: Valores de afinidades para resíduos glicosil de subsítios $A_i$ e $k_{int}$ para Pc $\beta$ Glu1 a 40 °C e pH 5,0, usando oligocelodextrinas como substratos. ....	96
Tabela 10: Comparação entre parâmetros experimentais e teóricos de Pc $\beta$ Glu1 de <i>P. chrysogenum</i> . ....	97
Tabela 11: Valores de afinidades de subsítios $A_i$ para Pc $\beta$ Glu2 a 40 °C e pH 5,0, utilizando oligocelodextrinas como substrato. ....	98
Tabela 12: Efeito da utilização de enzimas secretadas por <i>T. reesei</i> e <i>P. chrysogenum</i>	

sobre hidrólise dos substratos colidais, bagaço de cana, folha de bananeira e fibra de  
coco..... 107

## LISTA ABREVIATURAS

**AMPSO:** Ácido N-(1,1-Dimetil-2-hidroxietil)-3-amino-2-hidroxiopropanosulfônico

**BCA:** Ácido bicinconínico

**BDA:** Batata dextrose ágar

**C2:** Celobiose

**C3:** Celotriose

**C4:** Celotetraose

**C5:** Celopentaose

**CAPS:** Ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfônico

**CMC:** Carboximetilcelulose

**DIMBOA:** 2,4-dihidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona

**EPPS:** Ácido 4-(2-Hidroxietil)-1-piperazinapropanosulfônico

**GH1:** Glicosil hidrolases família 1

**GH3:** Glicosil hidrolases família 3

**HCA:** Análise de *Clusters* Hidrofóbicos

**Lb:** Laminaribiose

**MU $\beta$ Gli:** 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo

**MU $\beta$ Man:** Metilumbeliferil- $\beta$ -D-manopiranosídeo

**MOPS:** Ácido 4-morfolinopropanosulfônico

**pNP $\beta$ Gli:** p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo

**Octil $\beta$ Gli:** N-octil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo

**pNP $\beta$ gal:** p-Nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

**SDS:** Dodecil sulfato de sódio

**SDS-PAGE:** Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida

**TCA:** Ácido tricloroacético

**TEMED:** N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamino de sódio

**Tris:** Tris(hidroximetil)aminometano

# 1 INTRODUÇÃO

$\beta$ -glicosidases ou  $\beta$ -D-glicosídeo glicohidrolases (3.2.1.21) fazem parte de um grupo de enzimas biologicamente importantes responsáveis pela hidrólise de ligações  $\beta$ -glicosídicas terminais. Estas catalisam a hidrólise principalmente de aril, amino ou alquil- $\beta$ -D-glicosídios, glicosídios cianogênicos, oligossacarídeos de cadeia curta e dissacarídeos.  $\beta$ -glicosidases estão amplamente difundidas na natureza e podem ser encontradas por bactérias, fungos, leveduras, insetos, plantas e mamíferos. Possuem diversas funções dependendo de sua origem e possuem ampla especificidade podendo catalisar a hidrólise de glicosídeos com diferentes partes não sacarídicas (aglicones). Estas enzimas constituem um grupo majoritário entre as glicosídeo hidrolases e têm sido largamente estudadas devido a possibilidade de utilização em diversos processos biotecnológicos.

A atividade de  $\beta$ -glicosidases é fundamental para diversos processos bioquímicos e fisiológicos, como degradação de polissacarídeos da dieta para liberar unidades de monossacarídeos, que são então capazes de serem metabolicamente absorvidos e utilizados pelos organismos. Elas são importantes para o catabolismo de glicoconjugados lisossomais, processamento de glicoproteínas e na biossíntese de unidades de oligossacarídeos em glicoproteínas e glicolipídeos (Melo et al., 2006).  $\beta$ -glicosidases participam da hidrólise da parede celular de plantas por fungos para estabelecer relações de simbiose ou relações patogênicas com plantas (Kubicek et al., 1993). Elas atuam no mecanismo de defesa de plantas (Xu et al., 2004), e em insetos podem possuir funções digestivas (Zalgrabely et al., 2008). Em termos de aplicações biotecnológicas podem ser utilizadas na hidrólise de isoflavonas de soja, metabolismo de glicosídeos cianogênicos, hidrólise de biomassa para produção de bioetanol, aprimoramento do *flavor* em alimentos e bebidas, entre outras.

No entanto a aplicação de  $\beta$ -glicosidases requer a produção em larga escala e um conhecimento detalhado sobre o seu mecanismo de reação. Atualmente, diversas pesquisas têm sido realizadas para entender a base molecular da ampla especificidade de substrato destas enzimas. A identificação dos aminoácidos que constituem o sítio

ativo destas enzimas é de grande importância para entender a relação estrutura-função assim como estabelecer as bases para o desenho de enzimas mutantes com características melhoradas. Vários trabalhos têm sido realizados para a clonagem de genes de diferentes microrganismos e plantas em sistemas de expressão mesofílicos com alto rendimento, como *E. coli* e *S. cerevisiae* e em alguns casos em fungos filamentosos (Bhatia et al., 2002).

Dentre os diversos organismos do quais essas enzimas podem ser obtidas, os fungos são bons produtores de  $\beta$ -glicosidases, pois na natureza necessitam hidrolisar lignocelulose como fonte de carbono. A indução da expressão destas enzimas em fungos pode ocorrer principalmente pela utilização de celobiose, soforose e celulose, entre outras fontes de carbono (Suto;Tomita, 2001). Diversos fungos foram descritos na literatura como bons produtores de  $\beta$ -glicosidases como, por exemplo, *Aspergillus niger* (Jung et al., 2012).

*Penicillium chrysogenum* é um fungo filamentosos, ascomiceto, mesofílico e a maioria dos estudos relacionados a este microrganismo estão baseados na capacidade deste em produzir e sintetizar penicilina e antibióticos relacionados a  $\beta$ -lactama em adição a outros metabólitos secundários (García-Rico et al., 2008). No entanto trabalhos anteriores já relataram o uso deste fungo para produção de celulases utilizando farelo de trigo como fonte de carbono (Nefisa et al., 1992). Apenas recentemente estudos têm voltado sua atenção para a capacidade de produção de enzimas do complexo celulolítico por este fungo, baseados na utilização de diversas fontes de carbono, como bagaço de cana, farelo de trigo e soja (Buaban et al., 2010).

$\beta$ -glicosidases portanto podem ser aplicadas em diversos setores da economia como medicina, indústria e alimentação. Nesse contexto, a produção e purificação de  $\beta$ -glicosidases de *Penicillium chrysogenum* e sua caracterização são importantes ferramentas para demonstrar o seu potencial e direcionar a aplicação destas enzimas em diferentes processos.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a produção, purificar e caracterizar  $\beta$ -glicosidases secretadas por *Penicillium chrysogenum* quando cultivado em meio líquido contendo farelo de trigo como fonte de carbono e avaliar a ocorrência de efeito sinérgico na utilização destas enzimas na suplementação do coquetel enzimático de enzimas de *T. reesei* no processo sacarificação de diferentes fontes de biomassa.

### 2.1 Objetivos Específicos

- Determinar as condições ótimas de cultivo do fungo *P. chrysogenum* em meio líquido contendo farelo de trigo como fonte de carbono para produção de  $\beta$ -glicosidase extracelular.
- Purificar as  $\beta$ -glicosidases produzidas.
- Estimar a massa molecular das enzimas purificadas por eletroforese em gel e por cromatografia de exclusão molecular.
- Determinar a configuração anomérica dos carbonos dos produtos de reação.
- Caracterizar a atividade hidrolítica, avaliando o efeito da temperatura, do pH e de íons sobre a atividade enzimática.
- Avaliar a especificidade da enzima sobre diferentes substratos.
- Determinar parâmetros cinéticos ( $K_M$  e  $k_{cat}$ ) utilizando diferentes substratos e parâmetros de inibição (tipo de inibição e  $K_I$ ) utilizando glicose e celobiose como inibidores.
- Fazer o mapeamento da energia de ligações a resíduos de glicose nos subsítios do sítio ativo das duas enzimas, utilizando os parâmetros cinéticos obtidos para a hidrólise de celooligossacarídeos.
- Utilizar o sequenciamento shotgun de proteínas por espectrometria de massas para identificar as atividades enzimáticas purificadas .
- Avaliar o efeito da adição das enzimas purificadas ao coquetel enzimático de *T. reesei* no processo de hidrólise enzimática de biomassas, utilizando bagaço de cana, folha de bananeira e fibra de coco.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 $\beta$ -glicosidases (EC 3.2.1.21)

Glicosidases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas em oligossacarídeos ou glicoconjugados. As glicosidases são específicas para a clivagem de ligações glicosídicas dependendo do número, posição ou configuração dos grupos hidroxilas na molécula de açúcar (Melo et al., 2006). Assim,  $\beta$ -glicosidases ou  $\beta$ -D-glicosil glicohidrolases constituem um grupo de enzimas bem caracterizado e biologicamente importante, que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas do tipo beta com a liberação de um resíduo glicosil terminal de aril, amino ou alquil- $\beta$ -D-glicosídeos, glicosídeos cianogênicos, oligossacarídeos de cadeia pequena e dissacarídeos. A síntese de ligações glicosídicas também pode ocorrer, sendo por transglicosilação ou hidrólise reversa (Bathia et al, 2002). A reação de transglicosilação está sob controle cinético, neste caso um doador glicosídico pré-formado é primeiro hidrolisado pela enzima com a formação de um intermediário enzima-glicosídeo. Este intermediário sofre ataque de um nucleófilo (sem ser uma molécula de água), para formar um novo produto de cadeia mais alongada. No caso da hidrólise reversa o mecanismo está sobre controle termodinâmico e ocorre devido a modificações nas condições de reação levando a alteração do equilíbrio de reação e síntese (Bathia et al., 2002).

Henrissat et al. (1996) propuseram uma forma de classificar glicosídeo hidrolases em famílias baseando-se na sequência e nas similaridades de dobramento entre as enzimas (HCA – Análise de *Clusters* Hidrofóbicos). HCA de várias glicosidases demonstraram que  $\alpha$ -hélices e folhas- $\beta$  são localizadas em posições similares na conformação enovelada em uma mesma família de enzimas, e um grande número de aminoácidos conservados é agrupado perto do sítio ativo. Neste método as glicosídeo hidrolases tem sido classificadas em 132 famílias diferentes.

As  $\beta$ -glicosidases já foram encontradas nas famílias 1, 3, 5, 9, 30 e 116 das glicosídeo hidrolases, sendo as mais comuns pertencentes as famílias 1 e 3. As famílias 1 e 3 possuem enzimas que hidrolisam seus substratos pelo mecanismo de

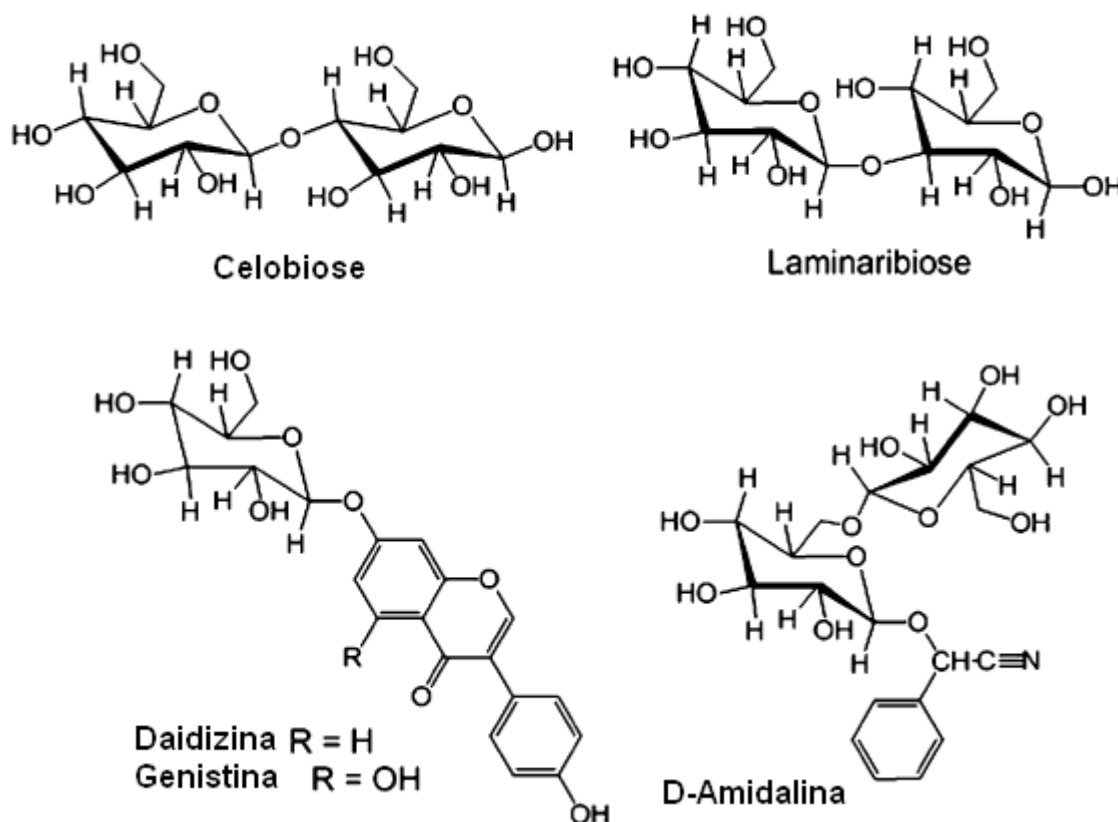
retenção da configuração anomérica. A família 1 inclui  $\beta$ -glicosidases de bactérias, plantas e mamíferos que possuem atividade de galactosidase, em adição a atividade de  $\beta$ -glicosidase. Estas atividades são encontradas no mesmo sítio catalítico com valores de  $k_{cat}$  similares, mas com valores de  $K_M$  mais altos para galactosídeos. As  $\beta$ -glicosidases da família GH1 se dobram em uma estrutura de barril TIM e utilizam dois glutamatos no sítio catalítico, um como nucleófilo e outro como ácido base/catalítico. A família 3 inclui  $\beta$ -glicosidases,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases,  $\beta$ -D-xilopiranosidases and N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidases de bactérias e leveduras, entre outros microorganismos. Há poucas estruturas de  $\beta$ -glicosidases GH3 resolvidas e essas utilizam um aspartato no ataque nucleofílico e um glutamato como doador de prótons (Cantarel et al., 2009).

$\beta$ -glicosidases podem ser encontradas em todos os grupos biológicos, de bactérias a mamíferos possuindo várias funções nesses organismos. Dentre as funções podemos destacar hidrólise de celooligossacarídeos em bactérias e fungos e quebra da parede celular para estabelecer relações de simbiose ou relações patogênicas com plantas (Kubicek et al., 1993). No caso de bactérias as  $\beta$ -glicosidases fazem parte de um grande complexo chamado celulosomo. Em plantas tem-se encontrado diversas funções biológicas de  $\beta$ -glicosidases, incluindo defesa, simbiose, catabolismo da parede celular e lignificação, sinalização e metabolismo secundário. Alguns genes de  $\beta$ -glicosidases têm se mostrado induzidos por estresse biótico ou abiótico. Foram encontradas 40  $\beta$ -glicosidases pertencentes a GH1 expressas em plantas, muitas expressas no mesmo tecido. O papel destas enzimas é determinado por sua especificidade de substrato, tecido e localização subcelular (Xu et al., 2004). Em alguns insetos como *Drosophila melanogaster*, apenas um gene GH1 foi encontrado sugerindo que certos insetos podem não ter expandido esta família gênica durante sua evolução. Outros insetos, no entanto, adaptaram-se a glicosídeos tóxicos de plantas, os quais são produzidos para propósitos de proteção, através da produção de múltiplas isoformas de  $\beta$ -glicosidases.  $\beta$ -glicosidases digestivas da família GH1 com diferentes especificidades foram isoladas de algumas larvas de insetos que se alimentam de plantas (Zalgrabelny et al., 2008). Mamíferos contém várias  $\beta$ -glicosidases, incluindo as  $\beta$ -glicosidases da família GH1, lactase-floridizina hidrolase,  $\beta$ -glicosidases citoplasmáticas e uma  $\beta$ -glicosidase lisossomal ácida (GBA1),



pertencente a GH3. Estas enzimas possuem papel no metabolismo de glicolípídeos e glicosídeos da dieta, e algumas estão relacionadas a papéis de sinalização. Dentre estas a GBA1 é a mais estudada, sendo responsável pela hidrólise de glicosilceramidas (Cairns;Esen, 2010).

Em geral  $\beta$ -glicosidases de diferentes grupos biológicos parecem diferir quanto a sua especificidade em relação a parte aglicona do substrato ligada ao grupo glicosídico. Baseado na especificidade de substrato as  $\beta$ -glicosidases podem ser classificadas em três grupos, I - Aril- $\beta$ -glicosidases, que possuem alta afinidade por aril- $\beta$ -glicosídeos, II – celobiasas, que hidrolisam somente oligossacarídeos e III -  $\beta$ -glicosidases de amplo espectro, que exibem atividade em vários tipos de substrato, sendo estas as mais comuns (Rojas et al., 1995). A maioria das  $\beta$ -glicosidases caracterizadas até hoje pertencem a esta última categoria.



**Figura 1:** Exemplos de algumas estruturas de substratos de  $\beta$ -glicosidases (Cairns; Esen, 2010, traduzido para o português).

### 3.2 Características de $\beta$ -glicosidases Fúngicas

Vários estudos têm sido feitos com  $\beta$ -glicosidases de microorganismos, mas a maioria está focada na aplicação dessas enzimas e não na sua função endógena. As mais estudadas no seu contexto natural estão envolvidas no processo de bioconversão para produzir glicose a partir de biomassa ou na quebra de paredes celulares de plantas para estabelecer relações simbióticas ou patogênicas. O fungo *P. chrysosporium* possui  $\beta$ -glicosidases citoplasmáticas e exoglucanases extracelulares que agem no metabolismo da parede celular do próprio microrganismo em adição ao metabolismo da parede celular da planta (Glibert et al., 2008).

Em termos de aplicação,  $\beta$ -glicosidases foram isoladas de diferentes espécies de fungos, incluindo ascomicetos como *T. reesei* e basidiomicetos como fungos de podridão branca.  $\beta$ -glicosidases mostram variabilidade em relação a outras enzimas celulolíticas, devido à sua estrutura e localização. Quanto a estrutura,  $\beta$ -glicosidases já foram descritas com estrutura monomérica simples com massa molecular de cerca de 35 kDa (por exemplo, de *Pleurotus ostreatus*), com estruturas diméricas (por exemplo, *Sporobolomyces singularis* com 146 kDa) ou mesmo triméricas com mais de 450 kDa (por exemplo, de *Pisolithus tinctorius*) (Cao et al., 1993). Além disso, a maioria das  $\beta$ -glicosidases são glicosiladas e em alguns casos, como na  $\beta$ -glicosidase monomérica de 300 kDa de *Trametes versicolor*, o grau de glicosilação é de até 90%. Quanto à localização, podem ser agrupadas em três formas diferentes incluindo intracelular, associadas à parede celular e extracelular (Evans C.S., 1985). Não surpreendentemente, valores de pH ótimo para esta enzima variam de acordo com sua localização. Em *T. reesei*, por exemplo, duas  $\beta$ -glicosidases (BGLI/Cel3A & BGLII/Cel1A) foram isoladas de sobrenadantes de cultura, mas as enzimas foram encontradas primeiramente ligadas à parede celular. Além disso, a produção de  $\beta$ -glicosidase por *T. reesei* é muito baixa quando comparada com outros fungos celulolíticos como *Aspergillus niger* (Jung et al., 2012). Tentativas com algum sucesso têm sido feitas para melhorar a atividade de  $\beta$ -glicosidase em *T. reesei*. Mais recentemente, a produção de  $\beta$ -glicosidase por *T. reesei* foi reforçada por

recombinação homóloga utilizando promotores de xilanase (*xyn3*) e celulase (*egl3*) que melhoraria a atividade de  $\beta$ -glicosidase de 4,0 e 7,5 vezes em relação ao original, respectivamente (Rahman et al., 2009). Complementação do sistema celulolítico de *T. reesei* com  $\beta$ -glicosidases de *A. niger* também tem sido descrita, mas o processo encarece muito o processo de bioconversão (Jung et al., 2012). Em casos de deficiência de  $\beta$ -glicosidases estas enzimas podem ser imobilizadas em microesferas magnéticas de quitosana (Zheng et al., 2013) ou em sílica gel por adsorção ou ligação covalente, com economia de custos devido a facilidade de reciclagem da enzima em múltiplos ciclos de fermentação, pois facilita a separação da enzima do líquido de reação (Jung et al., 2012).

Várias metodologias de purificação foram desenvolvidas com o intuito de detalhar características bioquímicas de  $\beta$ -glicosidases produzidas por fungos. Isso se deve principalmente ao fato de que essas enzimas muitas vezes são um fator limitante em processos de hidrólise enzimática, sendo muito sensíveis a glicose, o que limita sua atividade (Karnchanatat et al., 2007).  $\beta$ -glicosidases intracelulares e extracelulares de diversos fungos, principalmente de alguns menos estudados, *Daldinia eschscholzii* (Karnchanatat et al., 2007), *Monascus purpureus* (Daroit et al., 2008), *Termitomyces clypeatus* (Pal et al., 2010) já foram purificadas com o objetivo de entender as características dessas enzimas.

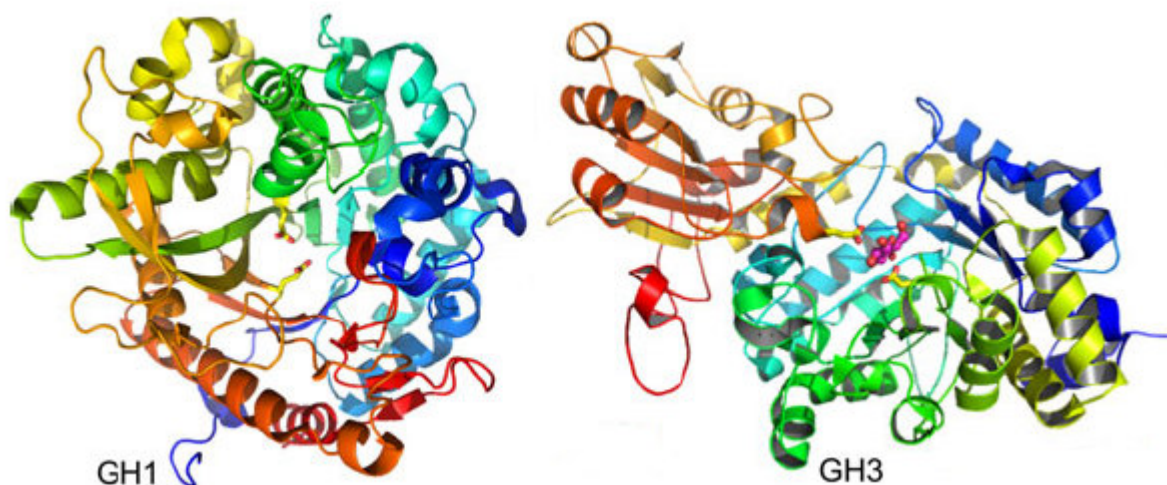
### 3.3 Estruturas de $\beta$ -glicosidases

As  $\beta$ -glicosidases podem se dobrar de diversas maneiras e existem diversas estruturas tridimensionais desvendadas. A estrutura em geral do sítio catalítico é a mesma encontrada para todas as famílias de glicosídeo hidrolases. As famílias GH1, GH5 e GH30 pertencem ao clã GHA e possuem um domínio barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> (barril TIM) que contém o sítio ativo. Enzimas pertencentes a família GH3 possuem dois domínios que contribuem para a formação do sítio ativo (Cairns; Esen, 2010).

As enzimas GHA possuem dois resíduos de ácido carboxílico conservados nas folhas  $\beta$  4 e 7, servindo como o ácido/base catalítico e como nucleófilo respectivamente (Henrissat et al., 1995). O tamanho e a massa das subunidades de  $\beta$ -glicosidases da

família GH1 variam consideravelmente, dependendo da presença de domínios auxiliares e estas enzimas possuem duas sequências consenso altamente conservadas TL/FNEP e I/VTENG. O domínio catalítico destas enzimas varia de 440 a 550 resíduos, dependendo do tamanho dos loops variáveis presentes nas extremidades c-terminal das folhas  $\beta$  do TIM barril (Sanz-Aparicio et al., 1998).

$\beta$ -glicosidases pertencentes a família GH3 possuem uma estrutura com dois domínios, um barril TIM seguido por uma estrutura tipo sanduíche  $\alpha/\beta$ . Esta estrutura compreende 6 folhas  $\beta$  em conformação estendida entre 3  $\alpha$ -hélices de cada lado. O sítio ativo destas enzimas está situado entre os domínios  $(\beta/\alpha)_8$  e  $(\alpha/\beta)_6$ , cada domínio contribui com um resíduo de ácido carboxílico catalítico. O nucleófilo catalítico para a ExoI de cevada é o resíduo de aspartato D285, que está localizado no loop após a sétima folha  $\beta$  do barril  $(\beta/\alpha)_8$ , enquanto o resíduo ácido/base catalítico é o glutamato E491, localizado em um grande loop que se estende do domínio  $(\alpha/\beta)_6$  (Varghese et al., 1999).



**Figura 2:** Estruturas de  $\beta$ -glicosidases das famílias GH1 (*Zea mays*ZmGlu1, código PDB 1E1E) e GH3 (*Hordeum vulgare*, ExoI  $\beta$ -glicana glicohidrolase, código PDB 1EX1). As figuras foram coloridas de azul a vermelho a partir da cauda N-terminal (Cairns; Esen, 2010).

### 3.4 Mecanismo de Ligação ao substrato e Especificidade

Os resíduos responsáveis pela catálise são bem caracterizados, no entanto pouco se sabe como as  $\beta$ -glicosidases reconhecem e interagem com seus substratos, o que

determina as diversas funções desta proteína. Diversas estruturas de  $\beta$ -glicosidases da família GH1 foram desvendadas e os complexos de várias destas enzimas com seus substratos, inibidores e intermediários covalentes estão disponíveis, permitindo análise dos resíduos críticos para ligação dos substratos e do estado de transição. Experimentos de mutagênese sítio dirigida destas  $\beta$ -glicosidases têm sido realizados para determinar o papel de vários resíduos de aminoácidos na função dessas enzimas.  $\beta$ -glicosidases da família GH1 possuem ampla especificidade para diferentes gliconas, como  $\beta$ -glicosídeos,  $\beta$ -fucosídeos,  $\beta$ -galactosídeos ou podem ser específicas para poucas gliconas (Cairns; Esen, 2010).

Marana et al. (2006) estudaram a especificidade de glicosídeo hidrolases da família 1 e concluíram que um resíduo conservado de glutamato que liga os grupos hidroxilas 4 e 6 da glicona à enzima com atividade de  $\beta$ -glicosidase e  $\beta$ -galactosidase e que não está presente em 6-fosfoglicosidases, é crítico para distinção entre essas enzimas. Ainda não está claro como uma enzima possui atividade de  $\beta$ -glicosidase ou  $\beta$ -manosidase ou demonstra diferentes especificidades frente ao substrato, considerando que elas se ligam aos açúcares com os mesmos resíduos conservados (Verdoucq et al., 2003). A ligação da aglicona ao sítio ativo pode afetar a posição de ligação da parte glicona, assim resíduos distantes do sítio catalítico podem possuir papéis importantes na especificidade da enzima pela parte glicona.

Estudos realizados por Czjzek et al. (2000) com glicosídeo hidrolases de milho (ZmGlu1) e sorgo (SbDhr1) demonstraram que os resíduos F198, F205, F466 e W378 são responsáveis pela ligação da parte aglicona do substrato DIMBOA ao sítio ativo. Todos estes resíduos, exceto W378, são variáveis entre algumas  $\beta$ -glicosidases estudadas que diferem em sua especificidade de substrato. No entanto investigações estruturais de ZmGlu1 e estruturas de outras  $\beta$ -glicosidases da família GH1 indicaram que os resíduos de aminoácidos variáveis sozinhos não podem designar a especificidade de substrato. Enquanto isso o resíduo W378 é pouco variável, pois quando mutado em algumas enzimas GH1 de plantas mostra-se crítico para hidrólise dos substratos naturais.

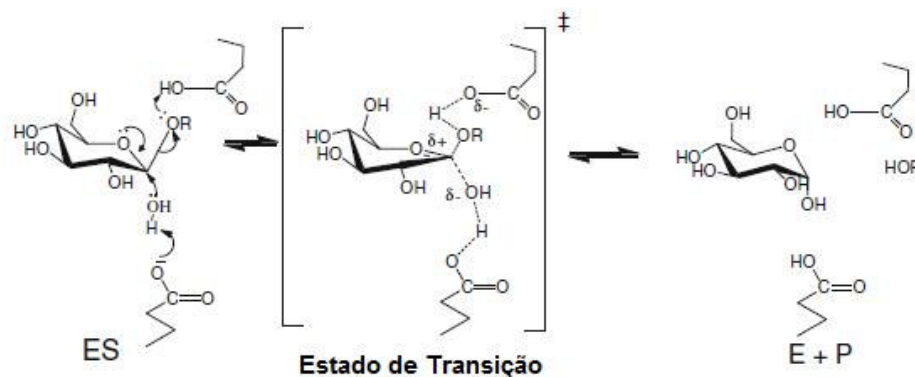
Assim resíduos variados fazem parte do sítio ativo de forma a interagir com a parte não sacarídica do substrato nas  $\beta$ -glicosidases da família GH1 estudadas, em

contraste com os resíduos conservados que se encontram no sítio de ligação a parte glicona.

### 3.5 Mecanismo de Hidrólise de $\beta$ -glicosidases

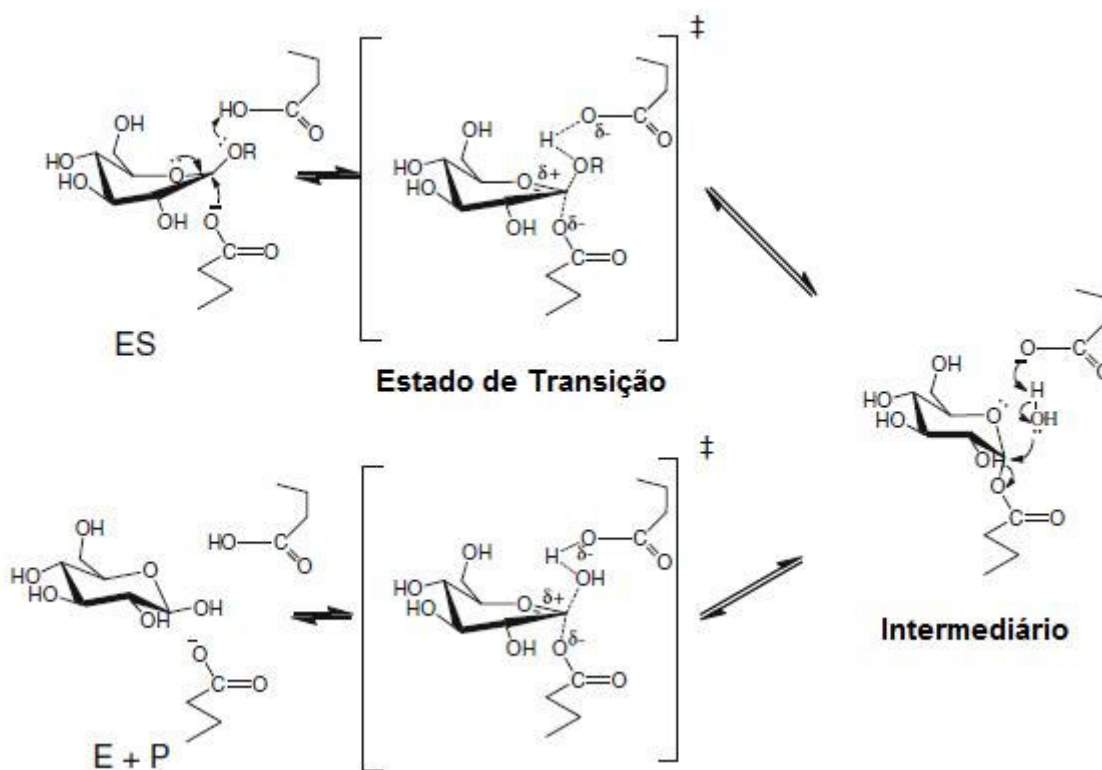
$\beta$ -glicosidases atuam sobre seu substrato basicamente por dois mecanismos de reação descritos por Koshland, (1953): os mecanismos de retenção (mecanismo clássico) ou de inversão. Os dois mecanismos utilizam um par de resíduos nucleofílicos e ácidos, geralmente ácidos carboxílicos, em cada lado da molécula de açúcar, afastados 5 Å no mecanismo de retenção e 10 Å no mecanismo de inversão. Neste caso uma molécula de água precisa entrar entre a base catalítica e o substrato.

No mecanismo de inversão ocorre a inversão da configuração anomérica do glicosídeo liberado em uma única etapa.  $\beta$ -glicosidases da família 9 (GH9) utilizam o mecanismo de inversão, em que uma molécula de água ativada faz o ataque nucleofílico no carbono anomérico para liberar a parte aglicona do substrato em uma única etapa (Withers et al., 2001). A base catalítica retira um próton da molécula de água enquanto o ácido catalítico protona o grupo de saída (parte aglicona). As reações ocorrem com a assistência ácido/básica da cadeia lateral de dois aminoácidos, geralmente aspartato ou glutamato (Cantarel et al., 2009).



**Figura 3:** Mecanismo de hidrólise de ligações glicolíticas por  $\beta$ -glicosidases, com inversão da configuração do carbono anomérico (Cairns; Esen, 2010, traduzido para o português).

O mecanismo de hidrólise com retenção de configuração ocorre em duas etapas, sendo conhecido como mecanismo de deslocamento duplo e envolve um intermediário covalente enzima-glicosídeo. Várias  $\beta$ -glicosidases caracterizadas são retentoras e catalisam a reação em duas etapas, glicosilação e deglicosilação. Na glicosilação, a porção aglicona da molécula de substrato é liberada com a doação de um próton do ácido/base catalítico e ataque nucleofílico do nucleófilo catalítico no carbono anomérico o que leva a um intermediário enzima-glicosídeo ligado covalentemente por ligação  $\alpha$ . Na etapa de deglicosilação, o processo é revertido, e uma molécula de água ataca com a assistência básica do ácido/base catalítico para liberar o nucleófilo catalítico da molécula de glicose. As duas etapas deste mecanismo passam por um estado de transição com a formação de íon tipo oxocarbênio (Cairns; Esen, 2010).



**Figura 4:** Mecanismo de hidrólise de ligações glicolíticas por  $\beta$ -glicosidases, com retenção da configuração do carbono anomérico (Cairns; Esen, 2010, traduzido para o português).

Como descrito acima,  $\beta$ -glicosidases utilizam um glutamato/aspartato em seu sítio catalítico para o mecanismo de catálise. Análises realizando modificações químicas na estrutura da proteína ou mais especificamente em seu sítio catalítico permitem saber a natureza dos grupos que participam do processo de catálise.

### **3.6 Aplicações Gerais de $\beta$ -glicosidases**

As enzimas são utilizadas em diversas aplicações industriais e a demanda por enzimas mais estáveis, altamente ativas e específicas vem crescendo rapidamente (Bhat et al., 2000). Os principais impedimentos para exploração comercial de enzimas são o seu baixo rendimento, baixa estabilidade, especificidade e alto custo de produção. Assim  $\beta$ -glicosidases com características bioquímicas, físicas e químicas desejáveis e com baixo custo de produção devem ser o foco da prospecção de novas enzimas (Bhat e Bhat, 1997).

A aplicação de  $\beta$ -glicosidases requer a produção destas enzimas em larga escala, bem como o estudo de seus mecanismos de reação (Bhatia et al., 2002). A clonagem molecular de genes codificantes de  $\beta$ -glicosidases tem sido estudada para este fim além de oferecer a possibilidade de aplicação de métodos de engenharia de proteínas na análise da atividade enzimática e no melhoramento de suas funções, como mutagênese (Li; Lee, 1999).

#### **3.6.1 Biodegradação de Resíduos Lignocelulósicos**

A necessidade de substituição de combustíveis fósseis, seu efeito na economia global e no ambiente têm acelerado as pesquisas em fontes alternativas de energia como bioetanol. O etanol celulósico tem sido avaliado como uma alternativa potencial de combustível, pois a matéria bruta para a produção deste é a celulose, que é o componente principal da parede celular de plantas, sendo uma fonte renovável, abundante e ubíqua (Lynd et al., 2002). A biomassa pode ser enzimaticamente hidrolisada para produzir glicose, a qual pode ser convertida em combustível.



Atualmente a conversão de biomassa celulósica para produção de bioetanol possui grandes desafios econômicos e tecnológicos, e o sucesso deste processo depende do desenvolvimento de um processo de hidrólise altamente eficiente.

A conversão efetiva de celulose em açúcares fermentáveis requer ação de um complexo multi-enzimático, constituído por três classes de enzimas, as endoglucanases (EC 3.2.1.4) que clivam a cadeia de celulose randomicamente gerando celooligossacarídeos, exoglucanases (EC 3.2.1.91) que atuam exoliticamente na extremidade redutora ou não-redutora da cadeia de celulose liberando celobiose e  $\beta$ -glicosidases (EC 3.2.1.21) que hidrolisam celobiose e celooligossacarídeos a glicose (Ng et al., 2013).

Celulases de *T. reesei* tem recebido muita atenção devido à sua capacidade de hidrolisar celulose microcristalina eficientemente. O sistema enzimático celulolítico deste fungo, contem duas exoglucanases ou celobiohidrolases (CBH1 e CBH2), pelo menos quatro endoglucanases (EG1, EG2, EG3, EG5) e uma  $\beta$ -glicosidase, sendo esta muito sensível a glicose. Assim, este fungo secreta diversas celulases, no entanto o coquetel é deficiente em atividade de  $\beta$ -glicosidase, requerida para hidrólise eficiente da biomassa (Kumar et al., 2008). A atividade de  $\beta$ -glicosidase no processo de conversão é de extrema importância para retirada de celobiose do meio, pois esta pode inibir a atividade de endoglucanases e exoglucanases, inviabilizando o processo (Ng et al., 2011).

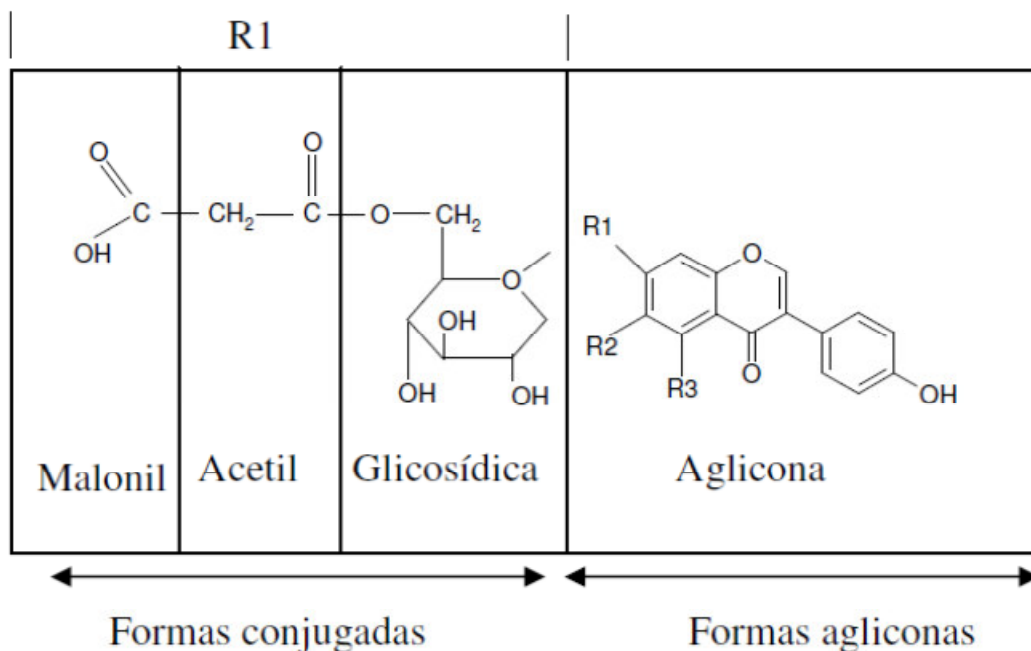
Dessa maneira, para eficientemente hidrolisar celulose a açúcares fermentáveis, é desejável a construção de cepas modificadas geneticamente de *T. reesei* para produção de  $\beta$ -glicosidases. Estas devem ter características desejáveis para atuar com os outros componentes em quantidades ótimas. Outra alternativa é a complementação do coquetel de *T. reesei* com  $\beta$ -glicosidases secretadas por outros microrganismos, com o objetivo de obter um efeito sinérgico entre as enzimas. As  $\beta$ -glicosidases, portanto, são um dos gargalos para o desenvolvimento da tecnologia de produção de bioetanol através de rotas enzimáticas (Singhania et al., 2013).

### **3.6.2 Hidrólise de Isoflavonas**

$\beta$ -Glicosidases podem ainda ser utilizadas na hidrólise de isoflavonas de soja. As isoflavonas, compostos estruturalmente homólogos ao estrogênio humano, são um dos componentes mais benéficos e abundantes encontrados na soja. As isoflavonas são compostos pertencentes ao grupo dos flavonoides, que possuem três anéis de benzeno em suas estruturas (Setchell; Cole, 2003). Os diferentes radicais ligados a esses anéis dão origem a 12 diferentes formas de isoflavonas divididas em 4 grupos: os glicosídeos daidzina, genistina e glicitina, as formas malonil (parte aglicona ligada a 6-O-malonilglicosídeo) malonildaizina, malonilgenistina e malonilglicitina, as formas acetil (parte aglicona ligada a 6-O-acetilglicosídeo) acetildaizina, acetilgenistina e acetilglicitina e as formas agliconas, daidzeína, genisteína e gliceteína (Park et al., 2001).

As isoflavonas têm sido associadas com a prevenção de certas doenças como câncer, distúrbios cardiovasculares, sintomas pós-menopausa e atividades antioxidantes. Em sua forma aglicona, após os glicosídeos de isoflavonas serem hidrolisados por  $\beta$ -glicosidase, são altamente bioativas devido a sua absorção efetiva no corpo humano. Ao contrário, quando as isoflavonas são consumidas em sua forma glicosilada estas não conseguem ser efetivamente absorvidas pelo organismo. A forma química desta molécula é de grande importância visto que influencia a atividade biológica, biodisponibilidade e a contribuição fisiológica das isoflavonas (Ismail; Hayes, 2005, Kaya et al., 2008).

Estas descobertas geram muito interesse na indústria de alimentos para o mercado de produtos baseados em soja, como tofu, leite de soja ou outros alimentos contendo soja como, iogurte e fórmulas infantis.



Isoflavonas	R1	R2	R3
Genisteína	OH	H	OH
Daidzeína	OH	H	H
Gliciteína	OH	OCH <sub>3</sub>	H
Genistina	C <sub>6</sub> O <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	H	OH
Daidzina	C <sub>6</sub> O <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	H	H
Glicitina	C <sub>6</sub> O <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
Acetil-genistina	C <sub>6</sub> O <sub>5</sub> H <sub>11</sub> +COCH <sub>3</sub>	H	OH
Acetil-daidzina	C <sub>6</sub> O <sub>5</sub> H <sub>11</sub> +COCH <sub>3</sub>	H	H
Acetil-glicitina	C <sub>6</sub> O <sub>5</sub> H <sub>11</sub> +COCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
Malonil-genistina	C <sub>6</sub> O <sub>5</sub> H <sub>11</sub> +COCH <sub>2</sub> COOH	H	OH
Malonil-daidzina	C <sub>6</sub> O <sub>5</sub> H <sub>11</sub> +COCH <sub>2</sub> COOH	H	H
Malonil-glicitina	C <sub>6</sub> O <sub>5</sub> H <sub>11</sub> +COCH <sub>2</sub> COOH	OCH <sub>3</sub>	H

**Figura 5:** Estrutura de isoflavonas encontradas em soja (Rostagno et al., 2005, traduzido para o português).

### 3.6.3 Doença de Gaucher

$\beta$ -glicosidases são estudadas cinética e molecularmente devido a sua gama de aplicações, mas outro fato relacionado aos estudos, é que esta enzima está envolvida no aparecimento de diversas condições patológicas em humanos. Sua deficiência ou superexpressão está associada a diversos tipos de câncer e desordens metabólicas. A

principal condição humana associada à deficiência desta enzima é a doença de Gaucher.

A doença de Gaucher é uma desordem metabólica prevalente. Trata-se de uma doença genética causada pela deficiência de uma  $\beta$ -glicosidase lisossomal ácida devido a mutações no gene GBA. A  $\beta$ -glicosidase lisossomal humana é uma enzima associada a membrana que cliva as ligações  $\beta$ -glicosídicas de glicosilceramidas (glicocerebrosídeos) (Grabowski et al., 1990).

A doença pode se manifestar através de uma grande variedade de sintomas, afetando o esqueleto e os sistemas nervoso e hematológico. Existem três tipos clínicos de Doença de Gaucher (GD), baseados na presença e progressão das manifestações neurológicas. Células Gaucher características, macrófagos carregados de glicosilceramidas, resultam do acúmulo desses compostos e o acúmulo pode ser observado em diversos órgãos como medula óssea (principalmente), fígado, baço e parênquima dos linfonodos. O acúmulo de células Gaucher causa esplenomegalia e aumento do baço.

O tratamento para GD consiste apenas em medidas paliativas como esplenectomia. O desenvolvimento em 1991 da terapia de substituição enzimática (ERT), tem mudado o fenótipo em casos do tipo I (não neuropática) da doença em que o sistema nervoso central não é afetado. Estudos tem demonstrado que a terapia tem melhorado ou resolvido o aspecto visceral da doença. Em contraste com ERT que visa remover o acúmulo de material estocado dentro do lisossomo, a terapia de redução de substrato (SRT) tem como alvo o ciclo de biossíntese e reduz parcialmente a carga de influxo do substrato para o lisossoma, que já é catabolicamente comprometida. Assim diversos estudos têm sido realizados de forma a facilitar o diagnóstico e a progressão desta doença (Goker-Alpan, 2011).

#### **3.6.4 Outras Aplicações Biotecnológicas**

Além das aplicações citadas acima,  $\beta$ -glicosidases podem ser aplicadas na agricultura, na indústria de alimentos (Kim et al., 2004; Wen et al. 2004), indústrias químicas, farmacêuticas e têxteis (Bhat; Bhat, 1997).

Existem vários precursores  $\beta$ -glicosídicos flavorizantes em plantas. A hidrólise desses precursores aumenta a qualidade de bebidas e alimentos produzidos a partir dessas plantas.  $\beta$ -glicosidases presentes nos tecidos destas plantas podem hidrolisar os precursores para liberar a parte aglicona de interesse. Enzimas de plantas e de outras fontes podem ser adicionadas aos alimentos e bebidas antes, durante ou após o processamento para aumentar a qualidade do alimento. Estas enzimas são largamente utilizadas na indústria vinícola.  $\beta$ -glicosidases produzidas por alguns fungos são capazes de hidrolisar compostos não voláteis a terpenos voláteis, incrementando o aroma de vinhos. Elas são ainda utilizadas para clareamento de sucos de frutas e para extração de ágar a partir de algas (Beguin et al., 1993). Na indústria de cerveja são utilizadas para catalisar a clivagem das ligações  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,4 de glicanas presentes em cevadas de baixa qualidade, ajudando no processo de filtração (Bhat; Bhat, 1997).

Além do aumento do *flavor*, alimentos, rações e bebidas podem ser enriquecidas nutricionalmente pela liberação de vitaminas antioxidantes e outros compostos benéficos (Esen, 2003).

Na indústria têxtil são aplicadas para retirada de corantes de tecidos jeans, retirada de microfibrilas ou para restaurar o brilho em tecidos de algodão (Coughlan et al., 1985).

$\beta$ -Glicosidases são especialmente aplicáveis em processos como detoxificação de glicosídeos cianogênicos. Sistemas de defesa encontrados em tecidos de vegetais como raízes e folhas de mandioca, feijão, semente de linho e folhas de trevo produzem HCN quando o tecido é macerado durante a preparação do alimento ou por mastigação. A mandioca é altamente consumida em partes da Ásia, África e América do Sul, e contém o glicosídeo cianogênico linamarina e a  $\beta$ -glicosidase linamarase. Quando estes alimentos são consumidos crus o envenenamento por cianeto pode ocorrer, com sintomas de dificuldade em respirar, paralisia, convulsões, coma e até a morte (Esen, 2003).

$\beta$ -glicosidases ainda podem participar da síntese de  $\beta$ -glicosídeos por transglicosilação como oligossacarídeos, alquilglicosídeos e glicoconjugados (Yang et al., 2008).

Existe também grande interesse na utilização de enzimas extracelulares como indicadores biológicos da qualidade do solo, devido a relação destas com características do solo como matéria orgânica, propriedades físicas, atividade microbiológica e biomassa presente. A atividade de  $\beta$ -glicosidase é largamente utilizada para monitoramento da qualidade do solo devido a seu papel central na degradação de celulose que está envolvida no ciclo da matéria orgânica (Moscatelli et al., 2012). Pode ser utilizada também para monitorar a presença de compostos fenólicos glicosídicos em óleo de oliva virgem, para indicar a qualidade do azeite. Estes compostos fenólicos possuem benefícios para o organismo como redução de dano oxidativo, perfil protrombótico e inflamação sistêmica (Romero-Segura et al., 2012).

Alguns estudos recentes demonstraram a utilização de vetores de clonagem contendo  $\beta$ -glicosidase como indicador de clones recombinantes (Cheong et al., 2012), ao invés do sistema Lac Z ou de um sistema contendo GFP.

### **3.7 Degradação de Biomassa e Produção de Enzimas Celulolíticas por Fungos**

Os fungos contribuem significativamente para o decaimento dos resíduos lignocelulósicos na natureza, produzindo diferentes enzimas lignocelulolíticas. A maioria dos fungos produz enzimas diferentes em grandes quantidades que são liberadas no ambiente e atuam em sinergia (Zhou et al., 2000). A capacidade de degradar a lignocelulose eficientemente é associada com o crescimento micelial que permite que o fungo transporte nutrientes escassos, como o nitrogênio e o ferro, até o substrato lignocelulósico pobre, que constitui a sua fonte de carbono (Hammel, 1997).

Celulases fúngicas são produzidas apenas na presença de celulose como substrato. Sabe-se que, devido a insolubilidade da celulose, esta não é capaz de induzir celulases diretamente. Assim um nível basal de celulases expressas constitutivamente deve degradar a celulose em celooligossacarídeos solúveis, permitindo a entrada destes sacarídeos na célula para serem convertidos em indutores (Suto; Tomita, 2001).

Os fungos produtores de enzimas celulolíticas em alta quantidade incluem as espécies dos ascomicetos (por exemplo, *Trichoderma reesei*), basidiomicetos, incluindo fungos da podridão branca (por exemplo, *Penicillium chrysosporium*), fungos “brown-

rot” (por exemplo, *Fomitopsis palustris*) e, finalmente, algumas espécies anaeróbias (por exemplo, *Orpinomyces* sp.) que degradam celulose no trato gastrointestinal de animais ruminantes (Yoon et al., 2007).

### **3.7.1 *Penicillium chrysogenum***

*Penicillium chrysogenum* é um fungo filamentosos, ascomiceto e a maioria dos estudos relacionados a este microrganismo estão baseados na capacidade deste em produzir e sintetizar penicilina e antibióticos relacionados a  $\beta$ -lactama, em adição a outros metabólitos secundários (García-Rico et al., 2008). As linhagens industriais são derivadas da linhagem *P. chrysogenum* NRRL1951, isolada de melão (Van de Berg et al., 2008).

Este fungo também produz pequenas proteínas antifúngicas (PFAs), utilizadas para combate de fungos toxigênicos de alimentos, devido ao perigo das micotoxinas para o organismo (Rodriguez-Martin et al., 2010). Trabalhos anteriores já relataram o uso deste fungo para produção de celulases utilizando farelo de trigo como fonte de carbono, como Nefisa et al. (1992), que encontraram alta atividade de  $\beta$ -glicosidase extracelular, carboximetil celulases e FPases. Este fungo ainda é capaz de crescer em xilana como única fonte de carbono produzindo xilanases em altas quantidades (Haas et al., 1992 e 1993). Mais recentemente, estudos tem voltado sua atenção para capacidade de produção de enzimas do complexo celulolítico por este fungo, baseada na utilização de diversas fontes de carbono, como bagaço de cana, farelo de trigo e soja (Buaban et al., 2010).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologia Bioquímica da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, e no Laboratório de Bioquímica de Insetos do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

### 4.1 Reagentes

Os reagentes  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D- glicopiranosídeo ( $\rho$ NP $\beta$ Gli), metilumbeliferil- $\beta$ -D- glicopiranosídeo (MU $\beta$ Gli), octil- $\beta$ -glicopiranosídeo (octil $\beta$ Gli), gentiobiose, laminaribiose, celobiose, celotriose, celotetraose, celopentaose, celulose microcristalina (Avicel®, Cat 11365) e carboximetilcelulose de baixa viscosidade (CMC, Cat C5678),  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo ( $\rho$ NP $\beta$ gal), metilumbeliferil- $\beta$ -D-manopiranosídeo (MU $\beta$ Man),  $\rho$ -nitrofenol, metilumbeliferona, glicose, ovoalbumina, BSA, EPPS, AMPSO, CAPS, MOPS, TEMED, DMSO, glucono- $\delta$ -lactona, acrilamida, N,N-metileno bisacrilamida, glicerol, tween 20, ácido deoxicólico, tiosulfato de sódio, dodecil sulfato de sódio, azul de bromofenol,  $\beta$ -mercaptoetanol, glutaraldeído, iodoacetamida foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). A enzima tripsina e as celulases de *T. reesei* também foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA), assim como os padrões utilizados para estimativa da massa molecular, citocromo C, anidrase carbônica, albumina, álcool desidrogenase,  $\beta$ -amilase e blue dextran.

A enzima glicose oxidase foi adquirida da Bioclin (Minas Gerais, Brasil)

Os demais reagentes utilizados para realização deste trabalho apresentavam procedência e grau de pureza analíticos.

### 4.2 Origem e Manutenção do Microrganismo

O fungo *Penicillium chrysogenum* UFV1, pertence a coleção de fungos do Laboratório de Tecnologia Bioquímica – UFV. O fungo foi mantido em meio sólido de BDA, sob refrigeração a 4 °C. Para esporulação, o fungo foi transferido para novas



placas de BDA com auxílio de uma alça de platina e incubado em estufa (Nova Ética, São Paulo, Brasil), por 7 dias a 28 °C.

### **4.3 Indução da Biossíntese de $\beta$ -glicosidases em Meio Líquido**

Após esporulação a superfície das placas foi lavada com solução de tween 20, 5 % (v/v) para contagem de esporos. A contagem foi realizada utilizando microscópio óptico (Leica DMLS - Leica Microsystems, Alemanha) e câmara de Neubauer. A suspensão de esporos do fungo *P. chrysogenum* UFV1 foi transferida, assepticamente, para Erlenmeyers de 1000 mL contendo 400 mL de meio mineral mínimo, em uma concentração de  $10^7$  esporos/mL. O meio mineral mínimo é composto por 1,05 % (p/v) de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,3 % (p/v)  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,015 % (p/v)  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,15 % (p/v)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e 0,09 % (p/v) extrato de levedura (Mandels; Weber, 1969). Após inoculação os frascos foram colocados em um agitador orbital (INOVA 4230 – New Brunswick Scientific, Nova Jersey, Estados Unidos), sob temperatura de 28 °C e rotação de 180 rpm, durante 240 h. Alíquotas coletadas diariamente foram filtradas em filtro de *nylon* e centrifugadas a 14500 rpm (Legend Micro 21 R - Thermo Scientific, Rockford, Estados Unidos) por 15 min a 4 °C. As amostras foram analisadas para identificação de atividade de  $\beta$ -glicosidase conforme descrito no item 4.3.1 e armazenadas a -20 °C em freezer.

### **4.4 Ensaio Enzimáticos**

A atividade de  $\beta$ -glicosidase foi determinada identificando a liberação de açúcares redutores, glicose, compostos fluorescentes ou *p*-nitrofenol a partir dos substratos hidrolisados.

#### **4.4.1 Atividade enzimática sobre *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo**

A mistura de reação de 0,1 mL, contendo 0,5 mM de *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (pNP $\beta$ Gli) em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 e a enzima em uma diluição apropriada, foi incubada a 40 °C em banho termostático (M.S. Mistura, Rio de Janeiro, Brasil). Após diferentes intervalos de tempo de incubação, a reação foi

paralisada pela adição de 0,25 M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e a quantidade de p-nitrofenol liberado foi determinada em 410 nm no leitor de placa Spectra Max 190 (Molecular Devices, Califórnia, USA). Os valores de absorvância a 410 nm obtidos foram transformados em nmoles de pNP, utilizando uma curva analítica ( $Y = 0,032 X + 0,116$ ,  $R^2 = 0,99$ ). A curva analítica foi construída utilizando de 0-80 nmoles de pNP.

Uma unidade de  $\beta$ -glicosidase (U), foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de p-nitrofenol por min.

#### **4.4.2 Atividade sobre metilumbeliferil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo**

A mistura de reação de 0,035 mL, contendo 0,014 mM de metilumbeliferil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (MU $\beta$ Gli) em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 e a enzima em uma diluição apropriada, foi incubada em banho termostático (M.S. Mistura, Rio de Janeiro, Brasil) a 40 °C. Após diferentes intervalos de tempo de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 0,4 M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. A fluorescência da metilumbeliferol ou metilumbeliferona (MU) liberada foi detectada em fluorímetro Spectra Max Gemini XPS (Molecular Devices, Califórnia, USA) em 355 nm excitação, 460 nm emissão e *cut off* de 455 nm. Os valores de fluorescência obtidos foram transformados em nmoles de MU, utilizando uma curva analítica ( $Y = 12213,044 X + 29,615$ ,  $R^2 = 0,99$ ). A curva analítica foi construída utilizando entre 0-0,035 nmoles de MU.

Uma unidade de  $\beta$ -glicosidase (U), foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de metilumbeliferol por min.

#### **4.4.3 Atividade sobre octil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo e oligossacarídeos**

Os substratos octil $\beta$ Gli, gentiobiose, laminaribiose, celobiose, celotriose, celotetraose e celopentaose foram colocados na mistura de reação (0,05 mL) na concentração de 0,5 mM em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0. A reação foi incubada em banho termostático (M.S. Mistura, Rio de Janeiro, Brasil) a 40 °C e paralisada por diferentes intervalos de tempo, fervendo as alíquotas a 99 °C por 5 min em termociclador (Applied Biosystems, Singapura). Após o tempo de incubação o

volume presente na placa de PCR foi transferido para microplaca de 96 poços e foi adicionado 50 µL de glicose oxidase (Bioclin, Minas Gerais, Brasil) (Raabo;Terkildsen, 1960). A mistura foi incubada a 37 °C por 15 min e a glicose liberada foi detectada em 505 nm no leitor de placa Spectra Max 190 (Molecular Devices, Califórnia, USA). Os valores de absorbância a 505 nm obtidos foram transformados em nmoles de glicose, utilizando uma curva analítica ( $Y= 0,012 X + 0,045$ ,  $R^2 0,99$ ). A curva analítica foi construída utilizando entre 0 - 10 nmoles de glicose.

Uma unidade de β-glicosidase (U), foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de glicose por min.

#### **4.4.4 Atividade sobre Polímeros**

Os polímeros laminarina, celulose microcristalina (Avicel®) e carboximetilcelulose de baixa viscosidade (CMC) foram colocados na mistura de reação (0,05 mL) na concentração de 0,25 % (p/v) em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0. A reação foi incubada em banho termostático (M.S. Mistura, Rio de Janeiro, Brasil) a 40 °C e paralisada por diferentes intervalos de tempo, fervendo as alíquotas a 99 °C por 5 min em termociclador (Applied Biosystems, Singapura) e adicionada de 50 µL do reagente BCA (ácido bicinconínico) (Fox; Robyt, 1991). A mistura foi deixada a 80 °C por 25 min em termociclador (Applied Biosystems, Singapura) e o volume presente na placa de PCR foi transferido para microplaca de 96 poços. Os açúcares redutores foram detectados a 565 nm no leitor de placa Spectra Max 190 (Molecular Devices, Califórnia, USA) (Lucena et al., 2013). Os valores de absorbância a 565 nm obtidos foram transformados em nmoles de açúcar redutor, utilizando uma curva analítica ( $Y= 0,142 X + 0,255$ ,  $R^2 0,99$ ). A curva analítica foi construída utilizando entre 0 - 10 nmoles de glicose.

Uma unidade de β-glicosidase (U), foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de açúcar redutor por min.

## 4.5 Quantificação Proteína

Devido a pequena quantidade de proteína presente nas amostras obtidas após as etapas de purificação, a quantificação foi realizada por dois métodos diferentes, descritos nas seções subsequentes.

### 4.5.1 Método BCA Miniaturizado

A mistura de reação continha 0 - 10  $\mu\text{L}$  de amostra e 40  $\mu\text{L}$  do reagente BCA (Pierce® BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Rockford, United States) (Smith *et al.*, 1985). A reação foi incubada em termociclador (Applied Biosystems, Singapura), por 25 min a 80 °C. Após o tempo de incubação, 40  $\mu\text{L}$  do volume presente nas placas de PCR foi transferido para microplaca de 96 poços e a absorbância foi determinada a 562 nm no leitor de placa Spectra max 190 (Molecular Devices, Califórnia, USA). Os valores de absorbância a 562 nm obtidos foram transformados em  $\mu\text{g}$  de proteína, utilizando uma curva analítica ( $Y = 0,273 X + 0,474$ ,  $R^2 0,99$ ). A curva analítica foi construída utilizando entre 0 - 2  $\mu\text{g}$  de ovoalbumina.

### 4.5.2 Método Prata Coloidal

Este método foi utilizado para amostras obtidas após as etapas de purificação.

As amostras foram dialisadas contra tampão A (tris 10 mM,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10 mM, tween 20 0,75%, p/v), durante 6 horas, fazendo-se uma troca do tampão da diálise após 3 horas e inversões a cada 30 min. Após a diálise, mediu-se o volume presente nos microtubos.

A mistura de reação continha entre 0 - 100  $\mu\text{L}$  de amostra, 900  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ , glutaraldeído 0,04 % (p/v) e 200  $\mu\text{L}$  do reagente de prata (NaOH 1,4 % (p/v),  $\text{AgNO}_3$  0,2 % (p/v), 200  $\mu\text{L}$   $\text{NH}_4\text{OH}$  25 % ,v/v). Após 10 min, adicionou-se 40  $\mu\text{L}$  de tiosulfato de sódio 30 mg/mL, para paralização da reação (Krystal *et al.*, 1985). Após paralização da reação, 100  $\mu\text{L}$  do volume presente nos microtubos foi transferido para microplaca de 96 poços e a absorbância foi determinada a 420 nm no leitor Spectra Max 190 (Molecular Devices, Califórnia, USA). Os valores de absorbância a 420 nm obtidos foram transformados em ng de proteína, utilizando uma curva analítica ( $Y =$

0,000215 X + 0,341, R<sup>2</sup> 0,99). A curva analítica foi construída utilizando entre 10 - 2000 ng de ovoalbumina.

## **4.6 Purificação $\beta$ -glicosidases**

A purificação das  $\beta$ -glicosidases secretadas por *P. chrysogenum* foi realizada utilizando precipitação com sulfato de amônio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, cromatografia de interação hidrofóbica para Pc $\beta$ Glu1 e Pc $\beta$ Glu2 e ainda cromatografia de exclusão molecular para Pc $\beta$ Glu2.

### **4.6.1 Precipitação com Sulfato de Amônio, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**

O extrato centrifugado foi descongelado e em 10 mL de amostra foram feitos testes de precipitação com sulfato de amônio nas saturações de 20, 40, 50 e 60 %. Este teste foi conduzido na temperatura de 4 °C, adicionando vagorosamente ao extrato a quantidade de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, previamente macerado, necessária para atingir a saturação. A mistura foi deixada sob agitação por 30 min e centrifugada a 14500 rpm (Legend Micro 21 R - Thermo Scientific, Rockford, Estados Unidos) durante 15 min. O precipitado foi ressuspenso em 3 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. Após cada precipitação, para cálculo de atividade específica, a atividade de  $\beta$ -glicosidase foi determinada conforme descrito no item 4.4.1 e a quantidade de proteína total foi quantificada de acordo com o item 4.5.1. Neste caso a proteína foi submetida a tratamento com ácido deoxicólico para retirada de interferentes de acordo com Rhoderick et al.(1989).

### **4.6.2 Cromatografia de Interação Hidrofóbica**

O sobrenadante obtido da precipitação com 50 % sulfato de amônio foi submetido à cromatografia de interação hidrofóbica, em coluna HiTrap Phenyl FF (2,5 cm x 1,6 cm) (GE, Uppsala, Sweden), com fluxo de 2 mL/min. A separação foi conduzida em Akta Prime Plus (GE, Uppsala, Sweden). A coluna foi previamente

equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, contendo 2,2 M de sulfato de amônio (50 % de saturação) (Tampão A). Após injeção de 5 mL de amostra, a eluição de proteínas não aderidas a coluna foi realizada com 25 mL de tampão A. Para eluição de proteínas aderidas, foi utilizado gradiente decrescente de sal (2,2 a 0 M), utilizando mistura de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e tampão A em diferentes proporções, durante 50 min. Para eluição do restante das proteínas a coluna foi lavada com mais 25 mL de tampão acetato de sódio pH 5,0 50 mM. Frações de 5 mL foram coletadas e a atividade de  $\beta$ -glicosidase determinada de acordo com o item 4.4.2. Frações com maior atividade foram reunidas em uma única fração e estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.6.3 Cromatografia de exclusão molecular**

Duas  $\beta$ -glicosidases foram encontradas após a cromatografia de interação hidrofóbica do item 4.6.2, Pc $\beta$ Glu1 and Pc $\beta$ Glu2. Para purificação adicional de Pc $\beta$ Glu2 foi realizada um gel filtração. A amostra foi aplicada (0,5 mL) em uma coluna Superdex 200 10/300 GL (1,0 cm x 30 cm) (GE, Uppsala, Sweden), previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 contendo 100 mM de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . A eluição foi realizada com 35 mL do mesmo tampão em um fluxo de 0,5 mL/min. Frações de 0,5 mL foram coletadas e a atividade de MU- $\beta$ -glicosidase foi quantificada de acordo com o item 4.4.2. Frações com maior atividade foram reunidas em uma única fração, adicionadas de albumina bovina na concentração de 1 mg/mL (ver item 4.9) e estocadas a  $4^{\circ}\text{C}$ . A separação cromatográfica foi conduzida utilizando Akta FPLC (GE, Uppsala, Sweden).

Esta técnica também foi utilizada para estimativa da massa molecular nativa das duas proteínas purificadas utilizando coluna Superdex 200 10/300 GL (1,0 cm x 30 cm) (GE, Uppsala, Sweden). Após injeção das amostras (0,5 mL) a coluna foi eluída com tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 em um fluxo de 0,5 mL/min. A atividade de MU- $\beta$ -glicosidase foi identificada nas frações coletadas (0,5 mL). O volume vazio da coluna foi determinado utilizando blue dextran.

A massa molecular das  $\beta$ -glicosidases foi estimada correlacionando-se, por meio

da curva de calibração da coluna, as constantes de eluição das proteínas padrão (relação entre o volume de eluição da proteína e o volume vazio da coluna) com as massas moleculares das respectivas proteínas.

Para construção da curva de calibração foram utilizadas as proteínas citocromo C (12,4 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), albumina (66 kDa), álcool desidrogenase (150 kDa) e  $\beta$ -amilase (200 kDa). Os padrões utilizados foram obtidos da Sigma Aldrich Company.

#### **4.7 SDS-PAGE e Estimativa de Massa Molecular**

Amostras do extrato bruto e das etapas de purificação foram precipitadas com TCA 12 % (p/v), sendo deixadas no gelo por 40 min (Yvon *et al.*, 1989). As amostras foram então centrifugadas por 15 min a 14500 rpm (Legend Micro 21 R - Thermo Scientific, Rockford, Estados Unidos). O pellet foi lavado com 1 mL de acetona e centrifugado por 10 min a 14500 rpm (Legend Micro 21 R - Thermo Scientific, Rockford, Estados Unidos). Este procedimento foi realizado por 3 vezes.

As amostras concentradas foram ressuspensas em 20  $\mu$ L de tampão de amostra 3x (glicerol 10 % (v/v), SDS 0,75 % (p/v), 0,05 % (p/v) azul de bromofenol, 5 % (v/v)  $\beta$ -mercaptoetanol, 0,19 M Tris/HCl pH 6,8) , fervidas por 4 min e submetidas a eletroforese em gel desnaturante de poli(acrilamida) (SDS-PAGE, 7,5 %, p/v) (Laemmli U.K., 1970). A corrida foi realizada a temperatura ambiente e 120 V.

Os minigéis, foram preparados a partir de solução estoque de acrilamida/ N,N-metileno bisacrilamida 30 % (p/v), Tris/HCl 1,5 M pH 8,6 para o gel separador e Tris/HCl 0,5 M pH 6,8 para o gel empilhador, persulfato de amônio 10 % (p/v) , SDS 10 % (p/v) e TEMED.

Após o tempo de corrida, o gel foi corado por impregnação por nitrato de prata (Morrissey J.H., 1981). O gel foi deixado durante a noite em solução fixadora (50 % (v/v) metanol, 12 % (v/v) ácido acético glacial), lavado três vezes com etanol 50 % (v/v) por 10 min, 1 vez com solução de tiosulfato de sódio 0,02 % (p/v) por 1 min e incubado por 30 min em solução contendo 0,013 % (v/v) de formaldeído e 0,2 % (p/v) de nitrato de prata. A solução foi descartada e o gel foi lavado com água. Para

revelação das bandas o gel foi incubado em solução de carbonato de sódio 0,37 M, formaldeído 0,0185 % (v/v) e tiosulfato de sódio 0,0004 % (p/v). Para cálculo da massa molecular relativa das proteínas purificadas, a distância percorrida por estas proteínas em centímetros foram transformados em kDa, utilizando uma curva analítica. A curva foi construída correlacionando-se a distância percorrida em centímetros por proteínas padrões com o logaritmo de suas massas moleculares. Para tal foi utilizado o marcador de massa molecular Precision Plus Protein™ Kaleidoscope Standarts (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, Estados Unidos).

#### **4.8 Zimografia**

Para identificação de atividade de  $\beta$ -glicosidase em gel, foi realizada uma eletroforese não desnaturante (PAGE). As amostras foram dialisadas contra tampão acetato de sódio 10 mM pH 5,0 para retirada do sal e concentradas em concentrador Centricon com *cut off* de 30 kDa (Millipore Corporation, Massachusetts, Estados Unidos). Após concentração, as amostras foram ressuspensas em tampão de amostra 3x (sem SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol) e submetidas a eletroforese como descrito no item 4.6. Neste caso os minigéis não continham SDS. A eletroforese foi conduzida a 4 °C e 120 V.

Após o tempo de corrida a atividade de  $\beta$ -glicosidase foi revelada utilizando o substrato fluorescente MU $\beta$ Gli. O gel foi equilibrado com tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 durante 5 min, este procedimento foi realizado 3 x, incubado com MU $\beta$ Gli 4 mM por 15 min a 40 °C em banho termostático (M.S. Mistura, Rio de Janeiro, Brasil) . As bandas foram visualizadas em luz ultravioleta para identificação de atividade com o aparelho E-gel imager (Life Technologies, Israel). O local de atividade é identificado pela presença do composto fluorescente metilumbeliferol liberado pela ação das enzimas. O procedimento foi realizado de acordo com Badhan et al.(2007).

#### **4.9 Espectrometria de Massas**

As amostras foram dialisadas contra tampão acetato de sódio 10 mM pH 5,0 para retirada de sal e concentradas em um concentrador 5301 (Eppendorf, Hamburg,



Germany). Estas foram então adicionadas de 20 µL de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0,4 M / Uréia 8 M e 5 µL de ditioneitol 100 mM e incubadas por 3 h a 37 °C em banho termostático (M.S. Mistura, Rio de Janeiro, Brasil), para desnaturação das proteínas. As amostras foram esfriadas a temperatura ambiente e 5 µL de iodoacetamida 400 mM foram adicionados e deixados para reagir por 15 min no escuro. Decorrido o tempo, 130 µL de água foram adicionados para diluir a uréia e a tripisinização foi realizada adicionando-se tripisina (Promega Corporation, Wiscosin, Estados Unidos) na proporção de 1/50 (m/m) de enzima/substrato e deixando reagir por 24 h a 37 °C em banho termostático (M.S. Mistura, Rio de Janeiro, Brasil) (Rappsilber et al., 2007). A digestão foi paralisada pela adição de 1% (v/v) de ácido fórmico.

Para retirada do restante de sal presente, a amostra foi submetida a um ZipTip C18 (Millipore Corporation, Massachusetts, Estados Unidos). A resina foi ativada com acetoneitrila 100 % e equilibrada com ácido trifluoroacético (TFA) 0,1 % (v/v). A amostra foi aspirada para a coluna e peptídeos não ligados foram eluídos com TFA 0,1 % (v/v). Para eluição de peptídeos aderidos foi utilizada uma solução de TFA 0,1 % (v/v) em acetoneitrila 50 % (v/v). As amostras foram novamente secas em um concentrador 5301 (Eppendorf, Hamburg, Germany), ressuspendidas em ácido fórmico 1 % (v/v), colocadas em banho ultrassônico (Branson ultrasonics Corporation, Connecticut, Estados Unidos) por 10 min e submetidas a análise MS/MS utilizando LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific, EUA). A identificação foi realizada utilizando a ferramenta de busca MASCOT (MASCOT version\_1.9.05, Matrix Science, Londres, Reino Unido). Peptídeos com escores de íons individuais menores que 30 foram descartados.

O programa Scaffold (version 4.0.4, Proteome Software Inc., Portland, OR, USA - <http://www.proteomesoftware.com/products/scaffold/download>) foi utilizado para validar as identificações de peptídeos e proteínas. Como especificado pelo algoritmo Peptide Prophet, os peptídeos foram aceitos apenas se eles tinham probabilidade maior que 95 % de terem sido identificados corretamente, assim como as proteínas. No caso, estas também devem conter pelo menos um peptídeo único identificado.

#### **4.10 Estabilização PcβGlu2**

Após purificação de PcβGlu2 por cromatografia de exclusão molecular, a enzima mostrou-se instável a ciclos de congelamento e descongelamento, quando armazenada em freezer a -20 °C. Testes foram realizados com etapas sucessivas de congelamento e descongelamento utilizando nitrogênio líquido, para confirmação.

Estabilizantes foram testados em diferentes concentrações e condições. Foram adicionados a diferentes alíquotas de proteína purificada, glicerol 20 % (v/v), NaCl 1 M e DMSO 40 % (v/v) (concentrações finais). Alíquotas foram retiradas e a atividade de β-glicosidase determinada de acordo com o item 4.4.2. As amostras foram então congeladas com nitrogênio líquido e armazenadas a -20 °C por um dia. Após descongelamento a atividade residual foi novamente quantificada.

A estabilidade foi testada a 4 °C, adicionando glicerol 10 % (v/v), octilβGli nas concentrações de 5 mM e 100 mM, Tween 20 0,05 mM e 0,5 mM, ovoalbumina 1 mg/mL, BSA 1 mg/mL, glicose 200 mM e celobiose 10 mM (concentrações finais). No caso dos detergentes, as duas concentrações escolhidas correspondem a uma condição abaixo ou acima da concentração micelar crítica (CMC). A atividade residual foi quantificada após adição dos estabilizantes e após um dia de armazenamento em geladeira, conforme descrito no item 4.4.2. A atividade enzimática relativa foi determinada pela correlação com a atividade da enzima não submetida aos tratamentos, a qual foi considerada como sendo 100 % de atividade enzimática.

#### **4.11 Determinação da Configuração do Carbono Anomérico dos Produtos de Reação**

Este método foi desenvolvido por Semenza et al. (1968). A mistura de reação de 0,05 mL, contendo 10 mM de celobiose em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 e a enzima em uma diluição apropriada, foi incubada a 40 °C em banho termostático (M.S. Mistura, Rio de Janeiro, Brasil), por 30 min para Pcβglu1 e por 120 min para PcβGlu2. A reação foi paralisada adicionando-se 100 mM do inibidor glucono-δ-lactona ou incubando a reação por 5 min a 99 °C em termociclador (Applied Biosystems, Singapura), e adicionando glucono-δ-lactona posteriormente. O volume presente nas

placas de PCR foi transferido para microplacas de 96 poços e adicionado de 100  $\mu$ L de glicose oxidase (Bioclin, Minas Gerais, Brasil) (Raabo;Terkildsen, 1960). Leituras foram realizadas a 505 nm no leitor de placa Spectra Max 190 (Molecular Devices, Califórnia, USA) a cada 1 min por 20 min a 37  $^{\circ}$ C.

Como controles, foram utilizadas soluções de  $\alpha$ -glicose incubada a 99  $^{\circ}$ C por 5 min em termociclador (Applied Biosystems, Singapura) e não fervida, preparadas na hora. Na alíquota de 100  $\mu$ L contendo 24 nmol de glicose foi adicionado 100  $\mu$ L de glicose monoreagente (Bioclin, Minas Gerais, Brasil). As amostras foram transferidas para microplacas de 96 poços e leituras foram realizadas a cada 1 min a 505 nm no leitor de placa Spectra Max 190 (Molecular Devices, Califórnia, USA) a 37  $^{\circ}$ C por 20 min.

## **4.12 Caracterização Bioquímica das $\beta$ -glicosidases**

### **4.12.1 Efeito da Temperatura**

A estabilidade térmica das enzimas purificadas foi avaliada incubando 500  $\mu$ L das proteínas em banho termostático (M.S. Mistura, Rio de Janeiro, Brasil) durante 4 h nas temperaturas de 40, 50, 60, 70 ou 80  $^{\circ}$ C, para Pc $\beta$ Glu1 e 30, 40, 50, 60 ou 70  $^{\circ}$ C para Pc $\beta$ Glu2. No caso de Pc $\beta$ Glu2 foram feitos testes de estabilidade na presença e ausência de BSA 1 mg/mL. Pc $\beta$ Glu1 foi incubada na temperatura de 50  $^{\circ}$ C na presença e ausência de sulfato de amônio. Alíquotas foram retiradas em diferentes intervalos de tempo. A atividade residual foi determinada conforme descrito no item 4.4.2 A atividade enzimática relativa foi determinada pela correlação com a atividade da enzima não submetida a incubação, a qual foi considerada como sendo 100 % de atividade enzimática.

A partir dos resultados encontrados foi possível calcular a constante de desnaturação ( $k_d$ ) das proteínas e a meia vida ( $t_{1/2}$ ), que seria o tempo no qual a enzima perde 50 % de sua atividade.

Foram utilizadas as seguintes equações:

$$\frac{E}{E_0} = e^{-k_d t}$$

$$T_{1/2} = \frac{\ln 0,5}{-k_d}$$

Sendo  $E_0$  a atividade da enzima no tempo 0 e E a atividade da enzima no tempo t.

#### **4.12.2 Efeito do pH**

Para determinação do pH ótimo de atividade das enzimas, o ensaio enzimático foi realizado em diferentes valores de pH. Diversos tampões foram testados de forma a identificar os que não inibiam a atividade das enzimas. Para Pc $\beta$ Glu1 foram utilizados os tampões citrato/fosfato (pH 3 a 7), EPPS (pH 7 a 9), AMPSO (pH 9 e 10) e CAPS (pH 10 e 11) e para Pc $\beta$ Glu2 foram utilizados os tampões acetato de sódio/ácido acético (pH 3,7 a 6), MOPS (pH 6 a 8), EPPS (pH 7 a 9) e AMPSO (pH 9 e 10). A determinação de atividade foi realizada como descrito no item 4.3.2, porém o tampão acetato foi substituído pelos tampões citados acima.

A estabilidade em diferentes valores de pH foi avaliada pré-incubando as enzimas por 4 h a 40 °C em banho termostático (M.S. Mistura, Rio de Janeiro, Brasil), nos mesmos tampões utilizados para pH ótimo. A mistura de reação de 0,1 mL, continha 20  $\mu$ L de amostra e 100 mM de tampão. Após 4 h de incubação alíquotas foram retiradas e a atividade residual de  $\beta$ -glicosidase foi determinada de acordo com o item 4.4.2, no entanto foi utilizado tampão acetato de sódio 200 mM (concentração final), para garantir que a atividade residual seja medida em pH 5. A atividade enzimática relativa foi determinada pela correlação com a atividade da enzima não submetida aos tratamentos, a qual foi considerada como sendo 100 % de atividade enzimática.

#### **4.12.3 Especificidade para o Substrato**

Com o objetivo de determinar a especificidade das enzimas purificadas, ensaios enzimáticos foram realizados com substratos naturais, sintéticos e poliméricos.

Além da determinação da atividade de  $\beta$ -glicosidase sobre os substratos sintéticos pNP $\beta$ Gli e MU $\beta$ Gli, a atividade foi também determinada sobre pNP $\beta$ gal, octil $\beta$ Gli, MU $\beta$ Man, os substratos gentiobiose, laminaribiose, celobiose, celotriose, celotetraose, celopentaose e os polímeros laminarina, carboximetilcelulose (CMC) e celulose microcristalina (Avicel®).

A atividade de  $\beta$ -glicosidase foi determinada identificando a liberação de açúcares redutores, glicose, compostos fluorescentes ou p-nitrofenol. A atividade sobre pNP $\beta$ gal, foi identificada conforme descrito no item 4.4.1 e para MU $\beta$ Man a atividade foi identificada conforme descrito no item 4.4.2.

A atividade sobre os substratos octil $\beta$ gli, gentiobiose, laminaribiose, C2, C3, C4 e C5 foi identificada conforme descrito no item 4.4.3 e sobre os polímeros laminarina, celulose microcristalina e CMC, foi identificada conforme descrito no item 4.4.4.

#### **4.12.4 Efeito de Íons**

O efeito de íons na atividade de Pc $\beta$ Glu1 e Pc $\beta$ Glu2 foi determinado incubando as enzimas em banho termostático (M.S. Mistura, Rio de Janeiro, Brasil), na presença de 100 mM dos íons testados, a 40 °C por 30 min. A atividade residual foi determinada, conforme descrito no item 4.3.2. Foram utilizados os seguintes íons: NaCl, NaNO<sub>3</sub>, KCl, NH<sub>4</sub>Cl, Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, BaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>, HgCl, CuSO<sub>4</sub>.

A atividade enzimática residual foi determinada pela correlação com a atividade da enzima não submetida aos tratamentos, a qual foi considerada como sendo 100 % de atividade enzimática.

### **4.13 Caracterização Cinética**

#### **4.13.1 Determinação Parâmetros Cinéticos**

Os valores da Constante de Michaelis ( $K_M$ ) e Velocidade Máxima ( $V_{max}$ ) foram

determinados sobre diversos substratos, incubando as enzimas com concentrações crescentes destes substratos. O ensaio foi realizado a 40 °C em banho termostático (M.S. Mistura, Rio de Janeiro, Brasil) e o tempo de incubação variou com o substrato utilizado. Os ensaios foram realizados de acordo com o item 4.4, dependendo do substrato utilizado.

Foram utilizados os seguintes substratos: pNPβGli, MUβGli, OctilβGli, gentiobiose, laminaribiose, celobiose, celotriose, celotetraose, celopentaose e laminarina.

Os valores foram determinados a partir da curva de velocidade em função da concentração de substrato (Plote de Michaelis-Menten), e pelo gráfico Duplo-Recíproco (Plote de Lineweaver-Burk), obtidos no programa GraFit (GraFit version\_7.0.3, Erithacus Software Limited- [http://www.erithacus.com/grafit/Software\\_Updates.htm](http://www.erithacus.com/grafit/Software_Updates.htm)).

A partir destes resultados e dos resultados de quantificação de proteína e de estimativa da massa molecular das proteínas purificadas, foi possível o cálculo da constante catalítica ( $k_{cat}$ ), a partir da equação:

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[\text{Enzima Total}]}$$

#### **4.13.2 Determinação de padrões de inibição e constantes de inibição ( $K_i$ )**

A inibição das β-glicosidases por glicose e celobiose foi determinada utilizando pNPβGli como substrato. A enzima PcβGlu1 foi incubada em banho termostático (M.S. Mistura, Rio de Janeiro, Brasil) a 40 °C por 30 min com o substrato pNPβGli em concentrações de 0,1 a 3 mM em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 e glicose nas concentrações de 0, 0,25, 0,5, 1,5, 5 e 15 mM ou celobiose nas concentrações de 0, 2,5, 5, 10, 15 e 18 mM. PcβGlu2 foi incubada em banho termostático (M.S. Mistura, Rio de Janeiro, Brasil) a 40 °C por 120 min com o substrato pNPβGli em concentrações de 0,02 a 0,5 mM em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 e glicose nas concentrações de 0, 0,5, 1, 2,5, 5 e 10 mM ou celobiose nas concentrações de 0, 0,5, 1, 2,5, 5, e 10 mM. A atividade foi determinada de acordo o item 4.4.1.

Os valores de  $K_i$  foram determinados utilizando o gráfico Duplo-Recíproco ou

Plote de Dixon obtidos pelo programa GraFit (GraFit version\_7.0.3).

#### 4.13.3 Afinidade de Ligação a Resíduos Glicosil em Subsítios no Sítio Ativo

Segundo Hiromi *et al.* (1973) o valor de  $k_{cat}/K_M$  pode ser utilizado para determinar a afinidade de subsítios utilizando substratos lineares com diferentes graus de polimerização. Os valores de afinidade de subsítios ( $A_i$ ) e da Constante da taxa intrínseca de hidrólise ( $k_{int}$ ) que é a taxa de hidrólise das ligações do substrato independente do seu grau de polimerização, podem ser obtidos a partir das equações descritas abaixo. Existem duas formas de nomenclatura de subsítios, de acordo com Davies *et al.* (1997) os subsítios que ligam resíduos presentes na extremidade não-redutora em relação ao restante do substrato são numerados como -1, -2 e etc., a partir do sítio de hidrólise (ligação posicionada entre os resíduos de glicose nos subsítios -1 e +1). Aqueles subsítios colocados na direção da extremidade redutora são chamados +1, +2 e assim por diante. De acordo com a teoria de Hiromi *et al.* (1973) os subsítios são numerados a partir do sítio ao qual se liga a extremidade não redutora dos substratos e  $A_i$  para  $i > 2$  pode ser obtido por,

$$A_{n+1} = RT \left\{ \ln \left( \frac{k_{cat}}{K_M} \right)_{n+1} - \ln \left( \frac{k_{cat}}{K_M} \right)_n \right\}$$

sendo R a constante dos gases ideais e T a temperatura em kelvin.

$A_{-1}$  e  $k_{int}$  podem ser calculados a partir de um gráfico de  $\exp(A_{n+1}/RT) \times (1/k_{cat})$ , pois  $k_{cat}$  é proporcional a fração produtiva dos complexos de ligação enzima-substrato.

$$\exp\left(\frac{A_{n+1}}{RT}\right) = \exp\left(\frac{\left(\frac{A_1}{RT}\right) k_{int}}{(k_{cat})_n}\right) - \exp\left(\frac{A_1}{RT}\right)$$

No caso das  $\beta$ -glicosidases purificadas os valores de  $k_{cat}/K_M$  obtidos para os substratos celobiose, celotriose, celotetraose e celopentaose foram utilizados.

$A_2$  pode então ser calculado a partir da equação:

$$\left(\frac{k_{cat}}{K_M}\right)_n = k_{int} 0,018 \exp\left\{\frac{(A_1+A_2+A_3+A_4+\dots)}{RT}\right\}$$

A validade dos cálculos pode ser confirmada comparando os dados experimentais com os dados teóricos obtidos. Os valores teóricos foram obtidos pela equação:

$$\left(\frac{k_{cat}}{K_M}\right)_n = k_{int} 0,018 \exp\left(\sum_{i=1}^n \frac{A_i}{RT}\right)$$

De acordo com Hiromi et al. (1973), os dados experimentais e teóricos não devem possuir desvio maior que 20 %, para confirmar a validade da teoria de que  $k_{int}$  é independente de n e de que os valores de  $A_i$  são aditivos.

Para o cálculo das afinidades dos sítios  $A_1$  e  $A_2$  ou  $A_{-1}$  e  $A_{+1}$  de Pc $\beta$ Glu2 foram utilizados os valores das constantes de afinidade de ligação molecular da celotetraose,  $B_{1,C4}$  e de celobiose,  $B_{1,C2}$  e as afinidades dos subsítios 3 e 4( +2 e +3), utilizando as seguintes equações:

$$B_{C4,app} = A_1 + A_2 + A_3 + A_4 = RT \ln \left(\frac{1}{K_{M c4}}\right) + 2,4$$

$$B_{C4,app} - A_3 - A_4 = B_{1,C2}$$

$$B_{C2,app} = A_1 + A_2 = RT \ln \left(\frac{1}{K_{M c2}}\right) + 2,4$$

Sendo 2,4 kcal/mol o valor de entropia livre da água a 25 °C.

#### 4.14 Hidrólise Enzimática

Para testar a capacidade de hidrólise de substratos complexos e para determinar a existência de sinergismo entre as enzimas purificadas e enzimas de um coquetel de *Trichoderma reesei*, foram realizados testes de hidrólise utilizando bagaço de cana



coloidal, fibra de coco coloidal e folha de bananeira coloidal como substratos.

Os ensaios foram realizados da seguinte maneira:

- (1) 2,5 % (p/v) de substrato + tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0+ 0,01 % (p/v) de azida sódica – CONTROLE
- (2) 2,5 % (p/v) de substrato + tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0+ 0,01 % (p/v) de azida sódica + 10 CBU/g de biomassa de P $\alpha$ βGlu1 ou P $\alpha$ βGlu2.
- (3) 2,5 % (p/v) de substrato + tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 + 0,01 % (p/v) de azida sódica + 7 CBU/g de biomassa de coquetel *T. reesei*.
- (4) 2,5 % (p/v) de substrato + tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 + 0,01 % (p/v) de azida sódica + 7 CBU/g de biomassa de coquetel *T. reesei* + 10 CBU/g de biomassa de P $\alpha$ βGlu1 ou P $\alpha$ βGlu2 pH5,0.

1 CBU é definido como a quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu$ mol de glicose por min a partir de celobiose nas condições de ensaio.

Os ensaios (3 mL) foram realizados em criotubos e deixados em agitador orbital (INOVA 4230 – New Brunswick Scientific, Nova Jersey, Estados Unidos) sob temperatura de 40 °C e 150 rpm durante 24 h. Alíquotas de 150  $\mu$ L foram retiradas em diferentes intervalos de tempo e incubadas a 99 °C por 5 min em termociclador (Applied Biosystems, Singapura). As amostras foram então centrifugadas por 5 min a 14500 rpm (Legend Micro 21 R - Thermo Scientific, Rockford, Estados Unidos), para precipitação do substrato insolúvel. O sobrenadante foi recolhido para determinação de açúcares.

A presença de açúcares redutores no sobrenadante (açúcares solúveis) foi quantificada de acordo com o método de Miller (1959). A mistura reacional contendo 20  $\mu$ L de sobrenadante foi adicionada de 40  $\mu$ L do reagente de DNS e incubada por 5 min a 99 °C em termociclador (Applied Biosystems, Singapura). A absorbância final da reação foi determinada a 550 nm no leitor Spectra Max 190 (Molecular Devices, Califórnia, USA). Os valores de absorbância a 550 nm obtidos foram transformados em  $\mu$ mol de açúcar redutor, utilizando uma curva analítica ( $Y = 1,556 X + 0,036$ ,  $R^2 = 0,99$ ). A curva analítica foi construída utilizando de 0 a 0,20  $\mu$ mol de glicose.

A determinação de açúcares totais presentes nos substratos, necessária para o cálculo da porcentagem de hidrólise, foi realizada de acordo com Dubois et al., (1956).

Os substratos foram diluídos em concentrações apropriadas e em 400 uL foram adicionados 400 µL de fenol 5 % (p/v) e 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 96 % (p/v). Após 5 min de reação a absorbância foi determinada a 490 nm no leitor Spectra Max 190 (Molecular Devices, Califórnia, USA). Os valores de absorbância a 490 nm obtidos foram transformados em µg de açúcar, utilizando uma curva analítica ( $Y = 0,0023 X + 0,073$ ,  $R^2 0,99$ ). A curva analítica foi construída utilizando de 0 a 200 µg de glicose.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Indução da produção de $\beta$ -glicosidases por *Penicillium chrysogenum* em meio líquido

Fungos filamentosos são conhecidos como bons produtores de  $\beta$ -glicosidases e um grande número de  $\beta$ -glicosidases da família GH1 e GH3 tem sido purificado e caracterizado a partir desses organismos. A habilidade destes fungos em crescer em substratos de baixo custo, faz deles fontes potenciais de enzimas para aplicações industriais (Wang et al., 2005). Existem vários dados disponíveis para produção de  $\beta$ -glicosidases por fungos filamentosos como *Penicillium brasilianum* (Krogh et al., 2010), *P. decumbens* (Chen et al., 2010), *Phanerochaete chrysosporium* (Tsukada et al.2006), *Paecilomyces sp.*, (Yang et al., 2009), entre outras espécies de *Penicillium* que apresentam alta atividade de enzimas lignocelulolíticas.

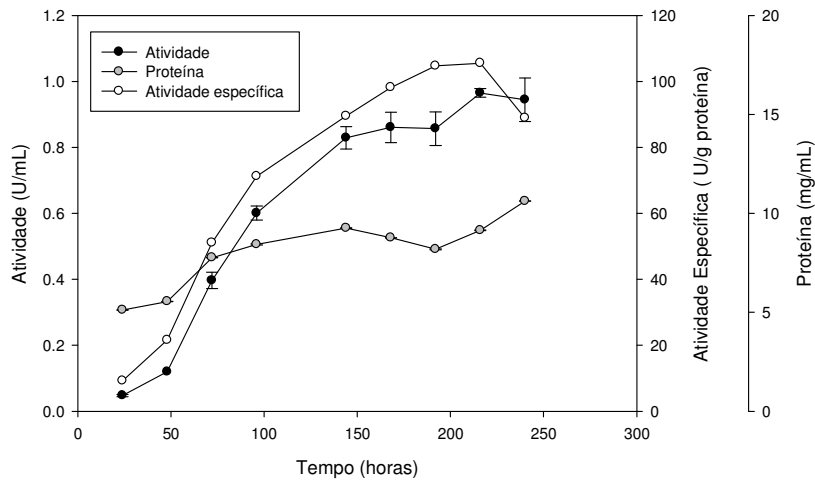
O fungo mesofílico *Penicillium chrysogenum* é largamente conhecido, devido a seu uso para produção de penicilinas. As linhagens industriais são derivadas da linhagem *P. chrysogenum* NRRL1951, isolada de melão (Van de Berg et al., 2008). Trabalhos anteriores já relataram o uso deste fungo para produção de celulases utilizando farelo de trigo como fonte de carbono, como Nefisa et al., (1992), que encontraram alta atividade de  $\beta$ -glicosidase extracelular, carboximetil celulases e FPases. Este fungo ainda é capaz de crescer em xilana como única fonte de carbono produzindo xilanases em altas quantidades (Haas et al., 1992 e 1993).

A utilização de resíduos agroindustriais para produção destas enzimas tem atraído muito interesse visto que isso pode contribuir para a diminuição dos custos de produção destas enzimas e também para diminuição da poluição ambiental causada pelo acúmulo destes resíduos no ambiente. O farelo de trigo é um produto secundário produzido por diversas indústrias e uma fonte de carbono largamente disponível. Possui um baixo conteúdo de lignina (< 20 % p/p), sendo uma fonte rica em carboidratos (30 % celulose e 50 % hemiceluloses) (Zilliox et al., 1998). Além da presença de componentes nutricionais importantes, características físicas do farelo de trigo também desempenham um papel vital no processo de fermentação, pois o farelo tem a capacidade de manter alto teor de umidade no meio. Esta habilidade promove o

crescimento do fungo, se assemelhando às condições ambientais naturais. Como demonstrado em trabalhos anteriores o farelo de trigo é uma fonte de carbono adequada para produção de enzimas do complexo celulolítico (Javed et al., 2011, Soarse et al., 2010, Assareh et al., 2012).

O fungo *P. chrysogenum* UFV1, isolado de bagaço de cana e utilizado neste trabalho, mostrou-se um eficiente produtor de enzimas lignocelulolíticas quando cultivado em meio líquido contendo farelo de trigo como fonte de carbono. De acordo com a figura 6 o farelo de trigo foi capaz de induzir a produção de  $\beta$ -glicosidase.

Tem sido reportado que a atividade de celulasas é regulada por proteínas conhecidas como CreA, CreB e CreC, que participam do processo de repressão por catabólito, o que faz com que a célula passe a expressar genes que codificam proteínas para utilização da fonte de carbono mais disponível no ambiente em que se encontram (Mach et al., 2003). Assim, quando cultivado em meio contendo uma fonte de carbono disponível, no caso farelo de trigo, o fungo inicia a produção de celulasas e hemicelulasas para utilização desta fonte. Em fungos, a expressão dos genes que codificam para enzimas do complexo lignocelulolítico ocorre de forma constitutiva basal, assim a celulose pode ser hidrolisada a pequenas quantidades de celobiose e esta pode por exemplo ser absorvida pela célula e estimular a secreção de outras celulasas (Suto; Tomita, 2001). De acordo com Jorgensen et al. (2004), o crescimento de *Penicillium* em meio mineral contendo glicose reprime a produção de enzimas, e somente após a exaustão de glicose os microorganismos iniciam a produção de  $\beta$ -glicosidasas.



**Figura 6:** Produção de  $\beta$ -glicosidase ao longo do tempo, secretada por *Penicillium chrysogenum* UFV1 quando cultivado em meio líquido contendo farelo trigo como fonte de carbono.

As alíquotas coletadas diariamente durante o cultivo de *P. chrysogenum* UFV1 em farelo de trigo foram analisadas para atividade de  $\beta$ -glicosidase (figura 6). A atividade foi identificada após 48 h de inoculação. No entanto as maiores atividades foram encontradas após 9 e 10 dias, com produção de 1 U/mL e 0,94 U/mL, respectivamente. Observando a figura 6 nota-se que a produção de  $\beta$ -glicosidase permanece elevada entre o sexto e décimo dias. Decker et al. (2000) encontraram valores de 81,1 U/mL para *Aspergillus japonicus* e 122,4 U/mL para *Aspergillus aculeatus* utilizando arabinosilana de trigo como fonte de carbono, após 168 h de fermentação. Elyas et al. (2010), testaram diversas fontes para produção de  $\beta$ -glicosidase por *Aspergillus*-SA 58, os resultados mais significativos foram encontrados após 96 h de incubação quando pectina foi utilizada como fonte de carbono (80 U/mL) e os piores resultados foram encontrados quando utilizou-se glicose como fonte de carbono. Kovacs et al. (2008) descreveram a produção de  $\beta$ -glicosidase por mutantes de *T. artroviride* e compararam com produção por *T. reesei*, utilizando folhas de salgueiro como fonte de carbono. Foram encontrados valores de 4,7 U/mL a 11,7 U/mL para os mutantes de *T. artroviride* e valores de 0,05 U/mL e 0,07 U/mL para mutantes de *T. reesei* Rut C30.

Em termos de atividade específica, neste trabalho, nos oitavo e nono dias foram encontrados 104,7 e 105,6 U/g de proteína, respectivamente. Falkoski et al. (2013), também encontraram atividades de  $\beta$ -glicosidases mais elevadas após 8 dias de fermentação utilizando farelo de trigo como fonte de carbono para *Chrysosporthe cubensis*, mas a atividade específica (21,5 U/g proteína) foi menor que a encontrada neste trabalho. Pal et al. (2010), demonstraram a produção de  $\beta$ -glicosidase intra e extracelular em meio contendo 2-deoxy-D-glucose e celobiose, após 3 dias de cultivo, com atividade específica de 40 U/mg de proteína para a enzima intracelular. Liu et al. (2006), utilizaram fermentação em estado sólido para a produção de  $\beta$ -glicosidase e após 3 dias obteve atividade específica de 0,52 U/g proteína para *Thricoderma viride* utilizando palha e farelo de arroz como fontes de carbono. Em outros trabalhos foram encontrados valores de 0,01 U/g proteína para *Aspergillus Niger* utilizando forragem de amendoim (Chandra et al., 2007) e 9,45 U/g proteína para *Aspergillus oryzae* utilizando farelo de trigo e casca de soja (Brijwani et al., 2010).

Visando a purificação da enzima, que busca aumentar atividade específica da enzima retirando proteínas contaminantes, o extrato obtido após 192 h de inoculação do fungo foi utilizado para as etapas posteriores.

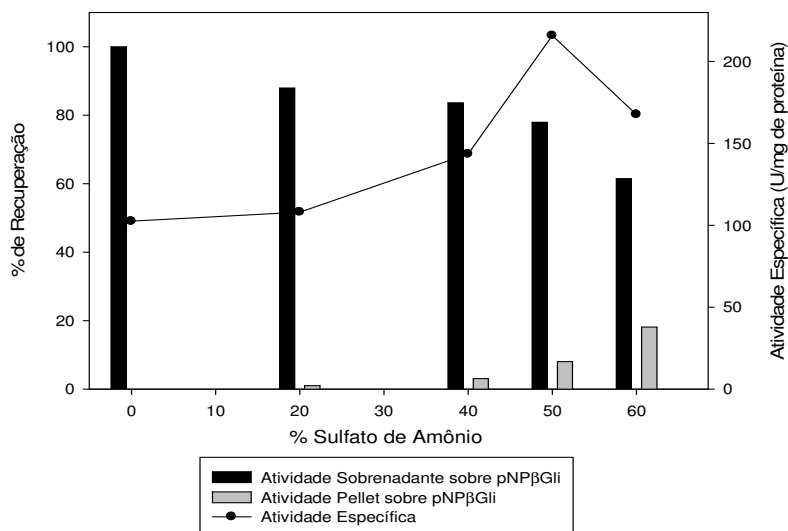
## **5.2 Purificação de $\beta$ - glicosidases de *P. chrysogenum***

O processo de purificação visa a retirada de proteínas indesejadas do meio aumentando a concentração da proteína de interesse. A pureza das proteínas é um pré-requisito para o estudo de suas estrutura, função e potenciais aplicações. No entanto, para aplicações na indústria de alimentos ou para produção de detergentes domésticos, por exemplo, baixo ou moderado grau de pureza é aceitável (Queiroz et al., 2001). Assim o nível de purificação requerido depende do uso final da enzima.

O cultivo obtido de *P. chrysogenum* em meio líquido por 8 dias foi submetido a quatro etapas para purificação de duas  $\beta$ -glicosidases secretadas. O meio foi centrifugado e o sobrenadante submetido a precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de interação hidrofóbica e cromatografia de exclusão molecular.

A precipitação por sulfato de amônio é uma técnica que pode ser utilizada antes da cromatografia de interação hidrofóbica, pois diminui a interação das proteínas com a água e aumenta a hidrofobicidade do meio, ajudando no processo de ligação das regiões periféricas hidrofóbicas das proteínas aos grupamentos imobilizados na resina hidrofóbica. Com o intuito de acoplar as duas técnicas no processo de purificação da  $\beta$ -glicosidase de *Penicillium chrysogenum*, foram feitos testes de precipitação de proteínas em concentrações de 20, 40, 50 e 60 % de sulfato de amônio. De acordo com a figura 7, observamos o aumento da atividade específica no sobrenadante quando uma quantidade maior de sulfato de amônio foi adicionada no meio. Em baixas concentrações a presença de sal no meio pode estabilizar proteínas através de interações eletrostáticas não específicas, dependentes da força iônica do meio. Com o aumento de sal no meio, no caso sulfato de amônio, o sal compete com as proteínas pelo solvente, retirando a capa de solvatação das proteínas e favorecendo a formação de agregados proteicos, que precipitam (Arakawa; Timasheff, 1984). Com adição de 20, 40 e 50 % de sal a recuperação de atividade enzimática no sobrenadante foi de 88, 83 e 77 % respectivamente. Após adição de 60 % de sulfato de amônio, apenas 61 % da atividade foi recuperada. O cálculo de atividade específica é dificultado nesta etapa devido a grande quantidade de sal presente na amostra, pois o sulfato de amônio é interferente em diversos métodos de quantificação de proteína. Para minimizar o erro provocado pela presença de sal, as amostras do sobrenadante foram precipitadas com ácido deoxicólico como descrito no item 4.6.1. De acordo com os valores obtidos, a atividade específica no sobrenadante aumentou com a adição de sal até a saturação de 50 %, apresentando atividade específica de 215 U/g de proteína e incremento de 2,1 vezes. Com a adição de 60 % de sal a atividade específica cai para 168 U/g de proteína, demonstrando a precipitação de  $\beta$ -glicosidase. Portanto para as etapas posteriores foi utilizado o sobrenadante saturado com 50 % de sulfato de amônio. Bhiri et al. (2008) também utilizaram fracionamento com sulfato de amônio para purificação de  $\beta$ -glicosidase de *P. occitanis*, conseguindo um incremento de 1,09 vezes na atividade específica saturando o meio com 50 % de sal. Souza et al. (2010) utilizaram 75 % de saturação do meio com sulfato de amônio para purificação de  $\beta$ -glicosidase de *Humicola Insolens* com incremento 1,5 vezes na atividade específica e recuperação de

95 %. Walleca e Mishra (2003) submetem a proteína a concentrações entre 40 e 80 % de sulfato de amônio e obteve fator de purificação de 3,3 vezes para esta etapa da purificação com 80 % de recuperação da atividade de  $\beta$ -glicosidase para a levedura *Pichia etchellsii*.



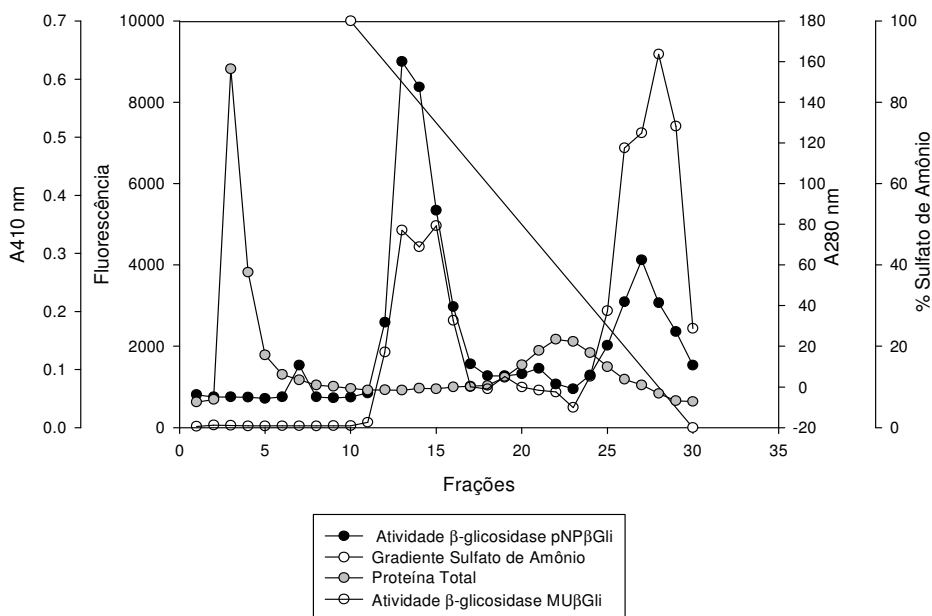
**Figura 7:** Adição de sulfato de amônio em diferentes porcentagens de saturação para precipitação de proteínas do extrato de *Penicillium chrysogenum*.

A cromatografia de interação hidrofóbica faz a separação de proteínas através da interação de regiões periféricas não-polares das proteínas com ligantes hidrofóbicos imobilizados na resina. Na presença de alta concentração de sais as proteínas tem seu caráter hidrofóbico ressaltado e passam a interagir menos com água, ou seja, a hidrofobicidade do meio é aumentada, facilitando a interação das proteínas com a resina. Assim neste tipo de cromatografia a coluna é equilibrada com tampão contendo alta concentração de sal, no caso sulfato de amônio, a amostra é aplicada e a eluição ocorre aplicando-se gradiente decrescente da concentração de sal.

O sobrenadante obtido da precipitação com 50 % de saturação de sulfato de amônio foi submetido a cromatografia de interação hidrofóbica em resina de Phenil Sepharose previamente equilibrada em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 contendo 2,2 M de sulfato de amônio (mesma concentração de sal presente na amostra). Foram coletadas 30 amostras com 5 mL cada e a atividade sobre pNPβGli e



MU $\beta$ Gli foi determinada em cada amostra. Foi observado no perfil cromatográfico, a separação de dois picos proteicos com atividade enzimática sobre os dois substratos nas frações 12 a 16 e 25 a 30, sugerindo que duas isoformas da enzima foram secretadas por *Penicillium chrysogenum* nas condições de fermentação a que foi submetido (Figura 8). Neste caso os picos proteicos com maior absorção a 280 nm, não correspondem as proteínas de interesse, o que é interessante, pois demonstra a retirada de grande parte das proteínas contaminantes com esta etapa de purificação.



**Figura 8:** Perfil cromatográfico obtido após submeter o sobrenadante do cultivo de *Penicillium chrysogenum* em meio líquido a precipitação com 50 % de sulfato de amônio e à cromatografia de interação hidrofóbica em coluna de Phenyl Sepharose. Pc $\beta$ Glu1 - frações 12 a 16 e Pc $\beta$ Glu2 - frações 25 a 30.

As frações com atividade de  $\beta$ -glicosidase obtidas após a cromatografia de interação hidrofóbica foram identificadas como Pc $\beta$ Glu1 e Pc $\beta$ Glu2. Grande parte das proteínas presentes no extrato foram eluídas antes do gradiente decrescente de sal, ou seja, grande parte das proteínas não ficou aderida a coluna na condição utilizada. Pc $\beta$ Glu1 foi eluída no início do gradiente decrescente de sal e Pc $\beta$ Glu2 foi eluída no fim do gradiente, demonstrando que Pc $\beta$ Glu1 possui menos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos periféricos capazes de interagir com a resina que Pc $\beta$ Glu2. Como pode

ser observado na figura acima, Pc $\beta$ Glu1 apresentou maior atividade sobre o substrato pNP $\beta$ Gli enquanto Pc $\beta$ Glu2 apresentou maior atividade sobre MU $\beta$ Gli. Nesta etapa de purificação foi obtido fator de purificação de 3,9 X com recuperação de 9,9 % para Pc $\beta$ Glu1 e de 3,3 X com recuperação de 15,8 % para Pc $\beta$ Glu2.

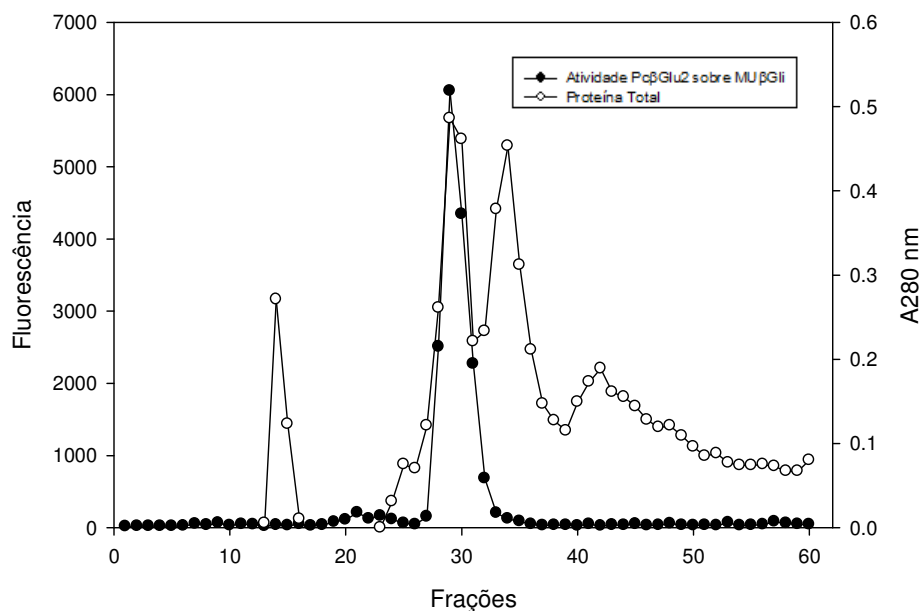
Após a cromatografia de interação hidrofóbica as frações correspondentes a Pc $\beta$ Glu1 e Pc $\beta$ Glu2 foram reunidas, sendo parte precipitada e submetida a eletroforese (SDS PAGE, 7,5%). O perfil de migração está apresentado na figura 10. A análise eletroforética das amostras demonstrou a purificação de Pc $\beta$ Glu1, e a presença de duas bandas contaminantes para Pc $\beta$ Glu2, estando esta apenas parcialmente purificada.

Para purificação adicional de Pc $\beta$ Glu2 esta foi submetida a cromatografia de exclusão molecular. A cromatografia de exclusão molecular separa moléculas de acordo com seu tamanho e forma, sendo que moléculas maiores são eluídas antes das moléculas menores, que possuem um caminho médio livre maior a ser percorrido. A resina utilizada para este tipo de cromatografia possui poros e no caso, moléculas menores tem acesso a uma quantidade maior de poros e possuem uma velocidade menor de migração. As moléculas são eluídas com a utilização do tampão de equilíbrio da coluna, no caso tampão acetato de sódio 50 mM pH 5 contendo 100 mM de sulfato de amônio. Não é necessário aplicar gradiente neste caso. Devido a baixa estabilidade de Pc $\beta$ Glu2 foi necessário saturar a coluna com 100 mM de sulfato de amônio para que a amostra não fosse dessalinizada.

O material obtido da cromatografia de interação hidrofóbica foi aplicado em resina Superdex 200, tendo sido coletadas 60 amostras com volume de 0,5 mL cada. A atividade de  $\beta$ -glicosidase foi determinada com a utilização do substrato fluorescente Mu $\beta$ Gli. Pc $\beta$ Glu2 foi identificada nas frações de 29 a 32 como pode ser visto no perfil cromatográfico demonstrado na Figura 9. A maioria das proteínas contaminantes foram eluídas após o pico de Pc $\beta$ Glu2 como esperado, pois de acordo com a figura 10, os contaminantes apresentam menor massa molecular que a proteína de interesse.

O resumo do processo de purificação está apresentado na Tabela 1.

A amostra obtida foi precipitada e submetida a eletroforese em gel desnaturante (SDS PAGE 7,5 %), Figura 10B. O perfil eletroforético demonstra a presença de apenas uma banda proteica e, assim, a purificação de PcβGlu2.



**Figura 9:** Perfil cromatográfico obtido após submeter PcβGlu2 a cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200. PcβGlu2: frações 29 a 32.

Após esta etapa de purificação foi obtido uma recuperação de 3,2 % final para esta proteína e fator de purificação de 3,4 vezes, como demonstrado na tabela 1.

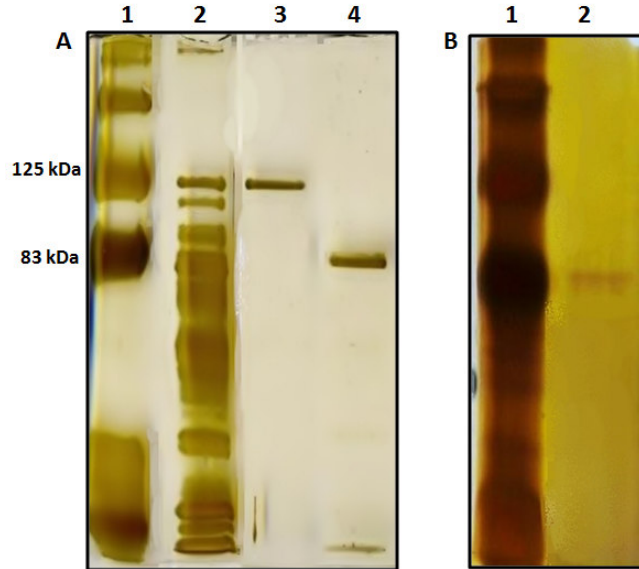
Ao final do processo de purificação, PcβGlu1 apresentou atividade específica de 398,3 U/g de proteína e PcβGlu2 atividade específica de 349,2 U/g de proteína. Podemos observar pelos resultados que não houve incremento significativo no fator de purificação da proteína, este fato ocorre devido a baixa concentração de proteína secretada pelo fungo nas condições impostas, o que leva a uma alta atividade específica inicial e a perda de atividade durante as etapas de purificação. Além disso, a quantificação de proteína pode ser subestimada devido a presença de sulfato de amônio no meio, que interfere nos métodos de quantificação, dificultando a determinação do fator de purificação das proteínas. A recuperação final das proteínas purificadas foi baixa, mas esse baixo rendimento já foi relatado por alguns autores.

Nguyen et al., (2010) purificaram a  $\beta$ -glicosidase de *S. hirsutum* com apenas uma etapa de gel filtração em Superdex 200 e com fator de purificação de 208 vezes, mas apenas 6,4 % de recuperação.

**Tabela 1:** Tabela de purificação obtida para  $\beta$ -glicosidases de *P. chrysogenum* utilizando o substrato fluorescente Mu $\beta$ Gli para identificação da atividade.

Amostra		Atividade Total (mU)	Proteína Total (mg)	Atividade Específica (mU/mg of proteína)	Fator de Purificação (X)	Recuperação (%)
Extrato Bruto		3464.1	34.2	101.4	1.0	100.0
50% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		2666.0	12.9	205.9	2.0	77.0
Phenyl Sefarose	Pc $\beta$ Glu1	341.6	0.9	398.3	3.9	9.9
	Pc $\beta$ Glu2	547.2	1.6	338.1	3.3	15.8
Superdex 200	Pc $\beta$ Glu2	111.1	0.3	349.2	3.4	3.2

Pal et al. (2010) purificaram uma  $\beta$ -glicosidase de *Termitomyces clypeatus* com utilização de três etapas de purificação e obteve rendimento final de 6,5 %. Daroit et al., (2008) utilizaram precipitação com acetona, gel filtração e interação hidrofóbica para purificação de  $\beta$ -glicosidase de *Monascus purpúreos*, com rendimento final de 23 %, fator de purificação de 92 vezes e atividade específica de 84 U/mg de proteína. Souza et al. (2010), purificaram uma  $\beta$ -glicosidase de *Humicola insolens* através da utilização de precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e exclusão molecular, neste caso obtiveram um rendimento de 44 %, fator de purificação de 21 vezes e atividade específica de 18 U/mg de proteína. Bhiri et al. (2008), encontraram duas  $\beta$ -glicosidases de *P. occitanis* no processo de purificação, ambas foram purificadas após etapas de precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de exclusão molecular e troca iônica. Foram obtidas atividades específicas de 102,5 e 173 U/g de proteína e fator de purificação de 4,45 vezes e 7,5 vezes para as  $\beta$ -glicosidases encontradas. O rendimento do processo não foi relatado pelos autores.



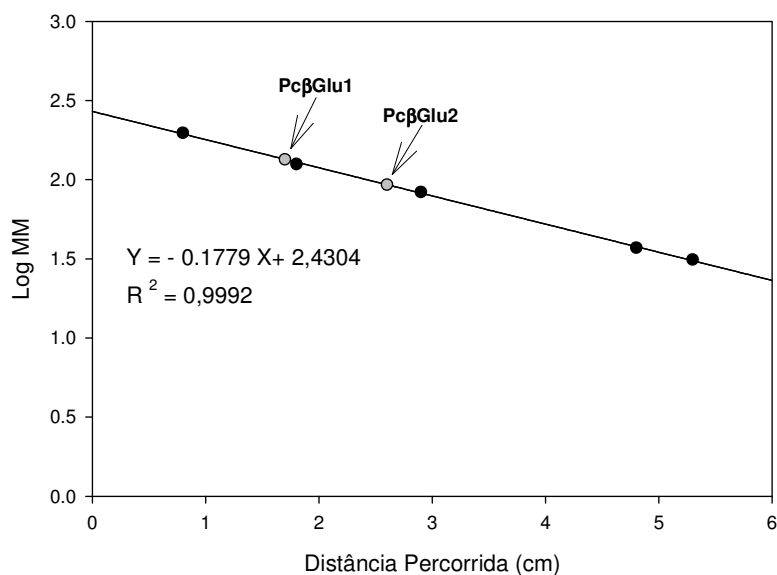
**Figura 10:** Eletroforese desnaturante (SDS PAGE 7,5 %) corada com prata demonstrando as etapas de purificação. **A1:** Marcador de peso molecular. **A2:** Extrato bruto. **A3:** Cromatografia de interação hidrofóbica Phenyl Sepharose, Pc $\beta$ Glu1. **A4:** Cromatografia de interação hidrofóbica Phenyl Sepharose, Pc $\beta$ Glu2. **B1:** Marcador de peso molecular. **B2:** Cromatografia de exclusão molecular Superdex 200, Pc $\beta$ Glu2.

### 5.3 Caracterização Bioquímica das $\beta$ -glicosidases

#### 5.3.1 Estimativa da Massa Molecular

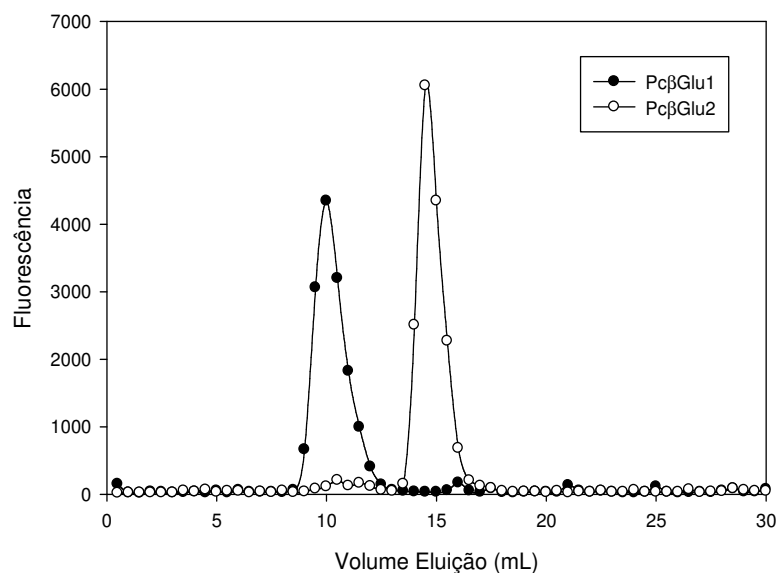
Após obtenção das proteínas purificadas, a massa molecular das proteínas purificadas foi estimada a partir de regressão linear obtida pela correlação do logaritmo da massa molecular de proteínas padrão com a distância percorrida no gel de SDS PAGE em centímetros. A curva padrão obtida está representada na Figura 11.

A massa molecular das enzimas purificadas foi estimada em 134 kDa e 98 kDa para Pc $\beta$ Glu1 e Pc $\beta$ Glu2 respectivamente.



**Figura 11:** Determinação da massa molecular das  $\beta$ -glicosidases purificadas de *Penicillium chrysogenum* por eletroforese desnaturante SDS PAGE (7,5 %).

A estimativa da massa molecular das  $\beta$ -glicosidases em sua conformação nativa foi determinada por cromatografia de exclusão molecular em coluna superdex 200 a partir do volume de eluição das  $\beta$ -glicosidases. De acordo com a Figura 12 podemos observar que PcβGlu1 possui volume de eluição menor que PcβGlu2 e que portanto percorre um caminho menor dentro da resina de gel filtração, o que confirma que esta possui uma massa molecular maior que PcβGlu2. Os volumes de eluição para PcβGlu1 e PcβGlu2, foram 10,8 mL e 15,1 mL respectivamente.

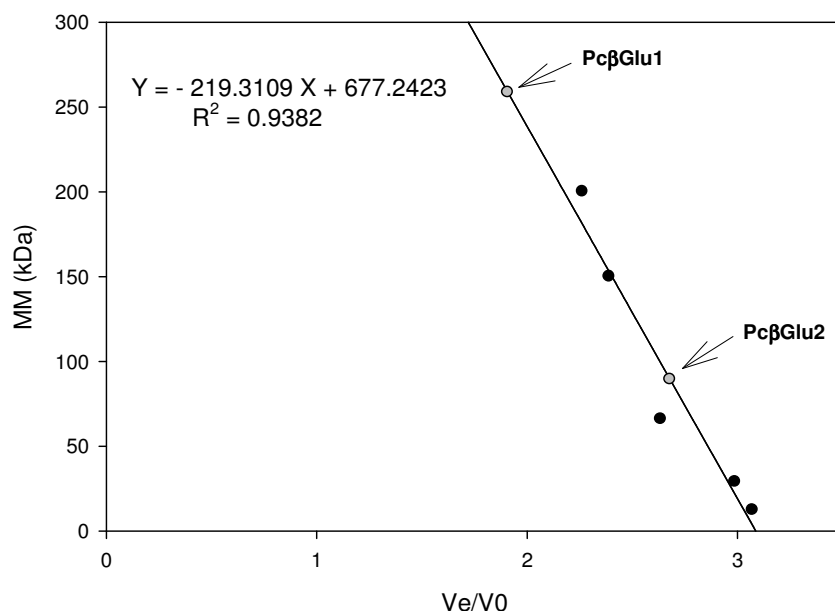


**Figura 12:** Perfil cromatográfico obtido após submeter PcβGlu1 e PcβGlu2 a cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200, para estimativa de massa molecular da proteína em conformação nativa.

A Figura 13, representa a curva padrão obtida a partir do volume de eluição de proteínas com massas moleculares conhecidas. Neste caso podemos observar que o coeficiente de correlação da curva padrão é mais baixo que o encontrado para a curva estimativa de massa molecular a partir da distância percorrida no gel, isto ocorre porque na filtração em gel além do tamanho as proteínas migram também de acordo com sua forma.

As massas moleculares de PcβGlu1 e PcβGlu2 foram estimadas em 258 kDa e 98 kDa, respectivamente. Os valores encontrados para as proteínas na sua forma nativa demonstram que PcβGlu1 é provavelmente um homodímero, pois em condições desnaturantes a massa estimada foi de aproximadamente 134 kDa e que PcβGlu2 é um monômero apresentando apenas uma subunidade.

De acordo com a literatura enzimas que possuem subunidade com massa molecular entre 40-60 kDa são geralmente monoméricas, enquanto subunidades com massas moleculares de 70-120 kDa são observadas como multiméricas (Zanoelo et al., 2004). Segundo Wood et al. (1982) a massa molecular de β-glicosidases produzidas por fungos aeróbios possuem em geral de 40 a 480 kDa.



**Figura 13:** Determinação da massa molecular das  $\beta$ -glicosidases de *Penicillium chrysogenum* por filtração em gel em resina Superdex 200, em FPLC.

Resultado semelhante ao encontrado neste trabalho foi descrito por Souza et al. (2010), que purificaram uma  $\beta$ -glicosidase de *Humicola Insolens* com massa molecular nativa de 94 kDa enquanto a massa estimada em SDS PAGE foi de 55 kDa, indicando que esta enzima também é um homodímero. Yang et al. (2008) também purificaram uma  $\beta$ -glicosidase de *Paecilomyces thermophila* com características de homodímero, com massa molecular nativa de 197 kDa e a massa estimada em SDS PAGE de 116 kDa. Chen et al., (2010) purificaram uma  $\beta$ -glicosidase de *P. decumbens* com massa molecular de 120 kDa e Joo et al., (2010) também encontraram uma  $\beta$ -glicosidase na forma de monômero ativo de 120 kDa para *P. pinophilum*. Os dados presentes na literatura demonstram que  $\beta$ -glicosidases podem variar muito em relação a sua massa molecular e em sua homogeneidade de subunidades principalmente devido as modificações pós-traducionais, pois algumas  $\beta$ -glicosidases são altamente glicosiladas. Parry et al. (2001) identificaram uma  $\beta$ -glicosidase trimérica de *Thermosascus aurantiacus*, a enzima apresentou massa molecular desnaturada de 120 kDa e massa molecular nativa de 350 kDa.

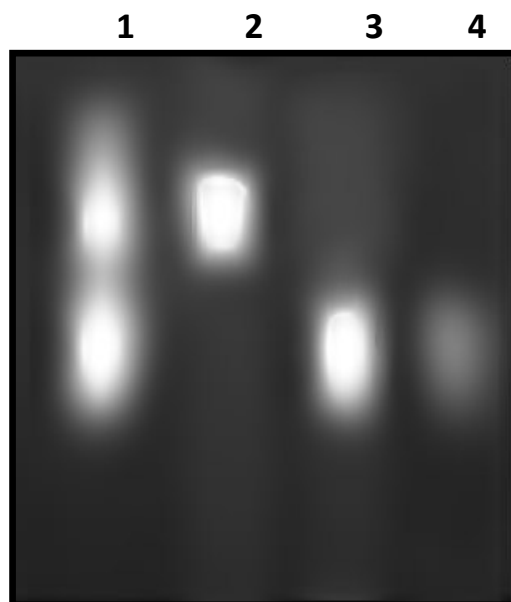


### 5.3.2 Zimografia

Amostras do extrato bruto e das etapas de purificação foram submetidas a eletroforese não desnaturante em gel de poliacrilamida (PAGE) para verificar a atividade das proteínas em gel. A atividade beta-glicosidásica foi identificada no gel através da utilização do substrato fluorescente Mu $\beta$ Gli como pode ser observado na Figura 14.

Como confirmado pela técnica, apenas duas bandas aparecem no extrato bruto com atividade de  $\beta$ -glicosidase, confirmando que o fungo secretou apenas duas  $\beta$ -glicosidases nas condições de fermentação a que foi submetido. Van de Berg et al., (2008) identificaram a presença de vários genes de  $\beta$ -glicosidase no genoma de *P. chrysogenum*.

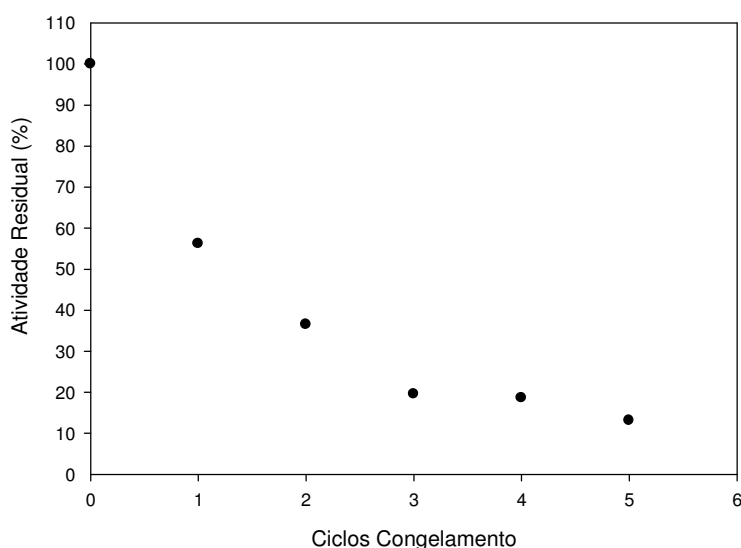
Das amostras obtidas durante as etapas de purificação, percebe-se que não existe contaminação de Pc $\beta$ Glu1 na fração de Pc $\beta$ Glu2 e vice versa. Além disso, podemos confirmar que as proteínas existentes nas frações obtidas no processo de purificação correspondem as proteínas com atividade  $\beta$ -glicolítica presente no extrato bruto de *P. chrysogenum*.



**Figura 14:** Eletroforese em gel nativo (PAGE 7,5 %) demonstrando a atividade de  $\beta$ -glicosidase sobre Mu $\beta$ Gli. 1: Extrato bruto. 2: Cromatografia de interação hidrofóbica, pico 1 (Pc $\beta$ Glu1). 3: Cromatografia de interação hidrofóbica, pico 2 (Pc $\beta$ Glu2). 4: cromatografia de exclusão molecular de Pc $\beta$ Glu2.

### 5.3.3 Estabilização de PcβGlu2

Após a etapa de gel filtração utilizada para purificação de PcβGlu2, percebemos que a retirada de sal causada pelo processo cromatográfico desestabilizou a proteína. Para que a enzima não perdesse totalmente a atividade após a cromatografia de exclusão molecular, saturamos a coluna com 100 mM de sulfato de amônio. O sal não foi suficiente para manter a estabilidade da enzima submetida aos processos de congelamento e descongelamento quando armazenada a -20 °C como podemos observar na Figura 15.



**Figura 15:** Atividade de PcβGlu2 após cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200 e submetida a diversos ciclos de congelamento e descongelamento utilizando nitrogênio líquido.

A atividade da enzima foi medida logo após o processo de purificação e esta foi submetida ao congelamento rápido utilizando nitrogênio líquido e armazenada a -20 °C. Após 1 ciclo de congelamento e descongelamento a enzima perdeu mais de 50 % de atividade e após 5 ciclos de congelamento e descongelamento a enzima possuía apenas 10 % de atividade remanescente.

A estabilização desta proteína pela adição de substratos, açúcares, detergentes e proteínas, foi testada a -20 e 4 °C.

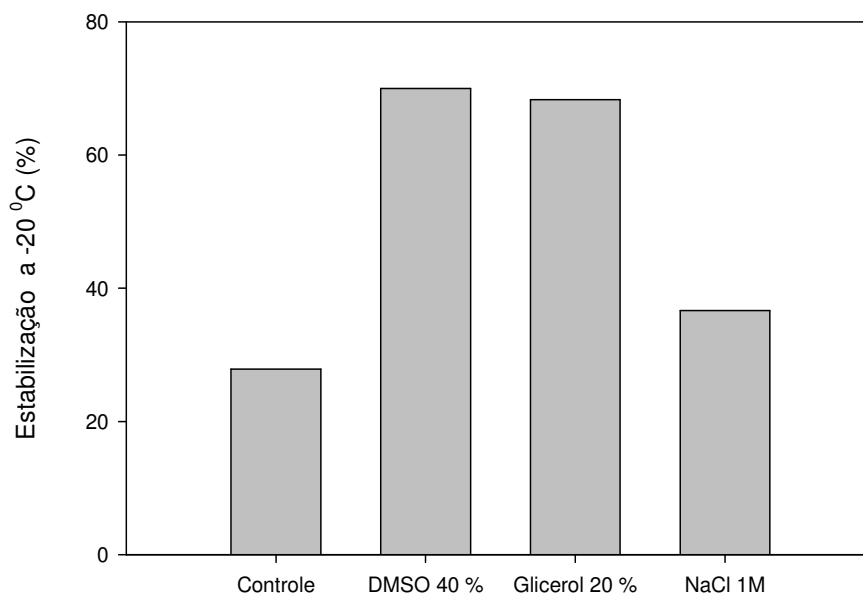
**Tabela 2:** Efeito da adição de estabilizantes na atividade de Pc $\beta$ Glu2 antes e após submeter a proteína a -20 ou 4 °C.

Temperatura (°C)	Estabilizantes	Atividade após adição estabilizante( %)	Atividade Residual após 1 dia (%)
-20	Controle	100.0	27.8
	DMSO 40 %	121.7	85.1
	Glicerol 20 %	93.0	63.6
	NaCl 1M	98.2	36.0
4	Controle	100.0	3.8
	Glicerol 10 %	100.5	5.5
	Octil- $\beta$ -glic 5 mM	6.2	5.9
	Octil- $\beta$ -glic 100 mM	0.4	0.5
	Tween 20 0,05 mM	176.1	138.7
	Tween 20 0,5 mM	178.1	133.4
	Ovoalbumina 1 mg/mL	141.8	99.6
	BSA 1 mg/mL	139.2	113.7
	Glicose 200 mM	2.1	1.6
Celobiose 10 mM	29.3	0.4	

Testamos a adição de DMSO 40 %, Glicerol 20 % e NaCl 1 M, para estabilização a - 20 °C, os dois primeiros atuam como crioprotetores impedindo a formação de cristais de gelo. A adição de DMSO 40 % aumentou a atividade da enzima, no entanto após 1 dia de armazenamento e descongelamento da amostra a atividade foi reduzida a 85,1 % em relação ao controle, e ocorreu estabilização de apenas 70 % do inicial, demonstrando a perda de atividade após 1 dia de armazenamento.

A adição de glicerol 20 % e NaCl 1 M não afetou a atividade da enzima, mas os reagentes não foram capazes de estabilizar a enzima, de acordo com a Tabela 2, observamos a perda de atividade após um dia de armazenamento. Glicerol 20 % manteve apenas 63,6 % da atividade e NaCl apenas 36 %, com 68 e 37 % de estabilização. O glicerol pode atuar também como um estabilizante osmótico, pois é polihidroxilado podendo formar ligações de hidrogênio com a proteína. O NaCl é um sal e pode estabilizar a proteína através de interações eletrostáticas não específicas, protegendo as cargas superficiais da proteína.

Portanto dos estabilizantes testados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , nenhum foi efetivo em estabilizar a enzima 100 % após um dia de congelamento (Figura 16).

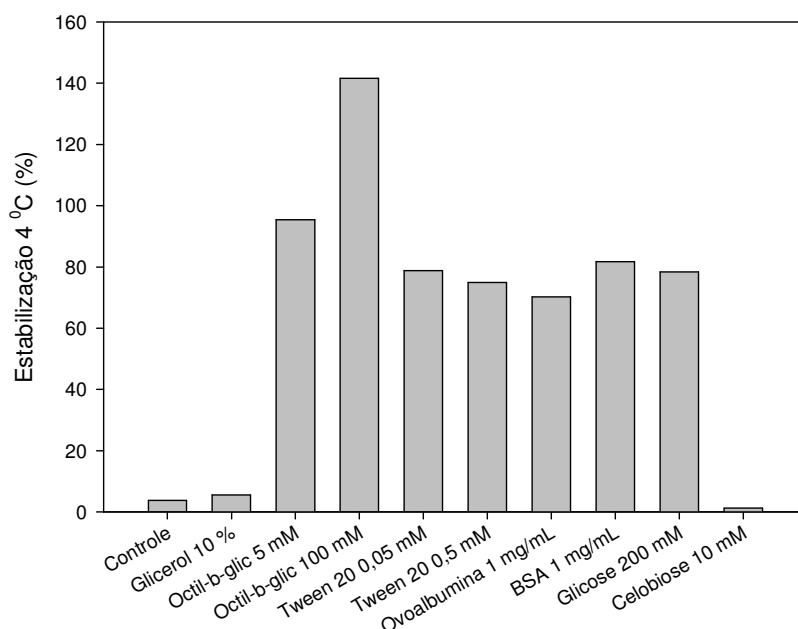


**Figura 16:** Estabilização após adição de diferentes reagentes a Pc $\beta$ Glu2 após 1 dia de armazenamento a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

A estabilização a  $4^{\circ}\text{C}$  foi testada, utilizando glicerol 10 %, octil $\beta$ Gli, Tween, ovoalbumina, BSA, glicose e celobiose. A adição de glicerol 10 % não afetou a atividade da enzima, no entanto após 1 dia de armazenamento em geladeira apenas 5 % de atividade foi encontrada, mostrando que este não pode ser utilizado como estabilizante nestas condições. A adição de octil $\beta$ Gli e celobiose, reduziu a atividade nas concentrações utilizadas, como estes são substratos, provavelmente competiram com o substrato pNP $\beta$ Gli utilizado na quantificação da atividade, demonstrando atividade reduzida. A adição de glicose também reduziu a atividade, pois a glicose é conhecida como um inibidor competitivo de  $\beta$ -glicosidases. Após 1 dia de armazenamento octil $\beta$ gli foi capaz de estabilizar a enzima, neste caso utilizamos concentrações abaixo e acima da concentração micelar crítica, e nas duas condições a enzima foi estabilizada. No entanto, devido a inibição da atividade por este estabilizante, este não foi escolhido, além disso a retirada do inibidor do meio poderia

causar mais perda da atividade da enzima. Celobiose e glicose não foram capazes de manter a estabilidade da enzima, após um dia de incubação a enzima apresentou atividade residual de 1,6 e 0,4 %, com estabilização de 78,3 e 1,2 %, respectivamente. Tween 20 % também foi utilizado em duas concentrações, abaixo e acima da concentração micelar crítica (0,05 e 0,5 mM), o mesmo efeito foi obtido nas duas concentrações. Ocorreu ativação após adição de tween 20 %, mas houve estabilização apenas de 79 % e 75 %, nas concentrações de 0,05 e 0,5 mM.

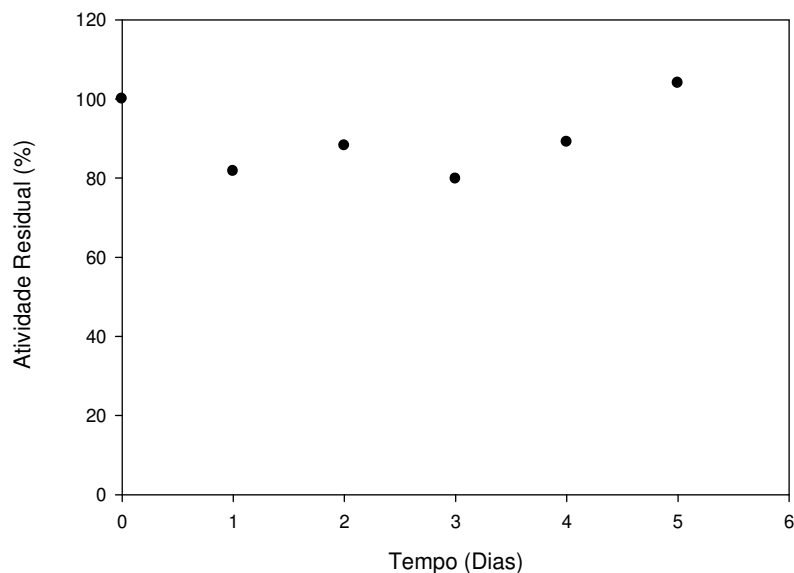
Dentre os estabilizantes testados, os melhores resultados foram encontrados pela adição de proteínas ao meio. BSA e ovoalbumina, além de não inibirem a atividade, não precisam ser retirados do meio para determinação de constantes cinéticas, efeito de temperatura, efeito de íons, efeito de pH, entre outros, pois não são interferentes. De acordo com os resultados obtidos a ovoalbumina foi capaz de estabilizar a enzima em 70 % e BSA em 81 % após 1 dia de incubação. A adição de proteínas no meio, diminui a movimentação de moléculas e conseqüentemente a colisão entre moléculas de proteína, o que pode causar sua desnaturação.



**Figura 17:** Estabilização após adição de diferentes reagentes a PcβGlu2 após 1 dia de armazenamento a 4 °C.

Assim escolhemos a albumina 1 mg/mL como estabilizante para PcβGlu2. A

estabilização foi ainda avaliada, deixando a enzima a 4 °C por cinco dias e determinando a atividade residual. De acordo com a Figura 18 observamos que a enzima é mantida estável após cinco dias de incubação a 4 °C.



**Figura 18:** Atividade de PcβGlu2 após adição de albumina 1 mg/mL e armazenada a 4 °C por cinco dias.

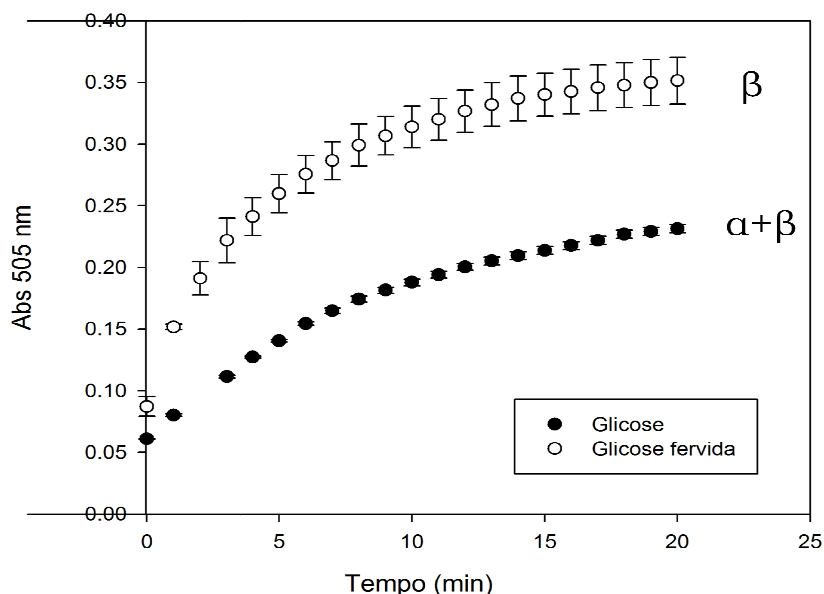
A estabilização de algumas β-glicosidases foi estudada com o objetivo de aumentar sua estabilidade em altas temperaturas. Hagerdal et al. (1980) reportaram uma β-glicosidase de *T. fusca* instável ao processo de purificação e estudaram a estabilidade desta enzima na presença de álcoois polihídricos. De acordo com os autores a atividade desta enzima era dependente de sua associação com a célula. Bernier e Stutzenberger (1988) também estudaram a estabilização de uma β-glicosidase de *T. curvata* por álcoois polihidroxilados, neste caso o melhor estabilizante foi o sorbitol. Flachner et al. (1999) utilizaram glutaraldeído para estabilizar uma β-glicosidase imobilizada de *A. phoenicis*.

#### **5.3.4 Determinação da Configuração do Carbono Anomérico dos Produtos de Reação**

A hidrólise das ligações glicosídicas por β-glicosidases pode acontecer por dois mecanismos descritos por Koshland (1953): inversão ou retenção (mecanismo

clássico) da configuração do carbono anomérico. No mecanismo de inversão, dois grupos carboxílicos atuam como uma base e um ácido geral, e são mantidos a uma distância que permita que a água e o substrato se liguem entre eles. A reação ocorre via um mecanismo de deslocamento simples do grupo de saída pela água, envolvendo um íon oxocarbônio no estado de transição e inversão da configuração anomérica do glicosídeo liberado, neste caso liberando  $\alpha$ -D-glicose. No mecanismo de retenção, um ácido carboxílico atua como ácido/base geral e o outro atua como nucleófilo e grupo de saída. A reação ocorre via um mecanismo de deslocamento duplo, envolvendo um íon oxocarbônio e um intermediário covalente enzima-glicosídeo no estado de transição, assim ocorre a retenção da configuração anomérica e  $\beta$ -D-glicose é liberada como produto. Esquema demonstrado no item 3.5. Devido a formação de um intermediário covalente enzima-glicosídeo, os ácidos carboxílicos se encontram a uma distância menor que nas enzimas que atuam por mecanismo de inversão (Zechel; Withers, 2000, McCarter; Withers, 1994). Portanto as hipóteses sobre o mecanismo de reação de uma enzima deve levar em consideração a configuração anomérica dos açúcares liberados.

Em uma solução recém preparada de glicose, as formas de  $\alpha$  e  $\beta$  glicose encontram-se em equilíbrio. Como a enzima glicose oxidase possui maior afinidade para a forma  $\beta$  esta solução recém preparada de glicose é oxidada vagarosamente pela enzima. No entanto, quando a solução é colocada sob alta temperatura deslocando o equilíbrio em direção a forma  $\beta$ , a solução é rapidamente oxidada pela glicose oxidase (Semenza et al., 1968). Com adição do reagente contendo as enzimas oxidase/peroxidase, a glicose é oxidada pela glicose oxidase, formando ácido glucônico e liberando peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio, na presença de peroxidase, 4-aminoantipirina e fenol, forma um cromógeno vermelho cereja cuja intensidade é proporcional a concentração de glicose (Instruções de uso glicose monoreagente – K082/ Bioclin). Assim na presença da forma  $\beta$ -glicose o cromógeno vermelho cereja é formado mais rapidamente, como demonstrado na figura 19.

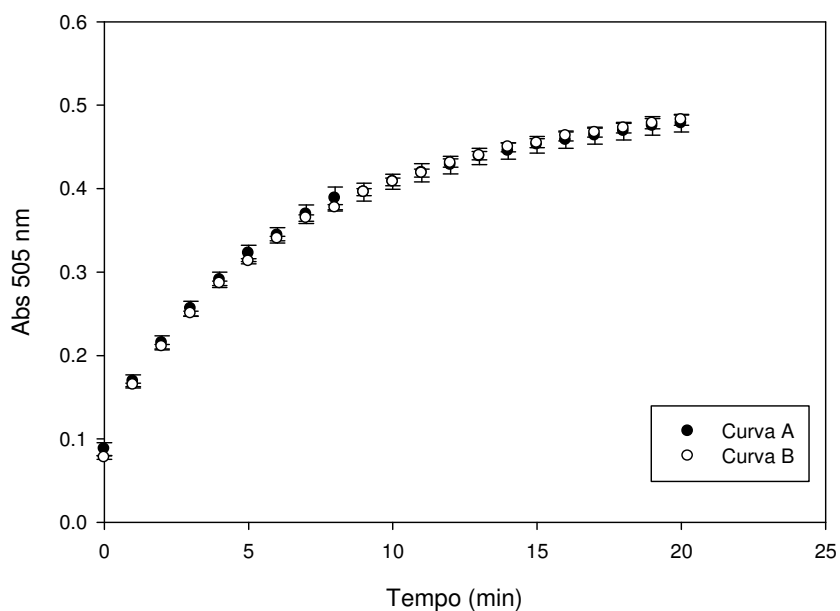


**Figura 19:** Identificação da configuração anomérica de D-Glicose, antes e após anomerização (fervura).

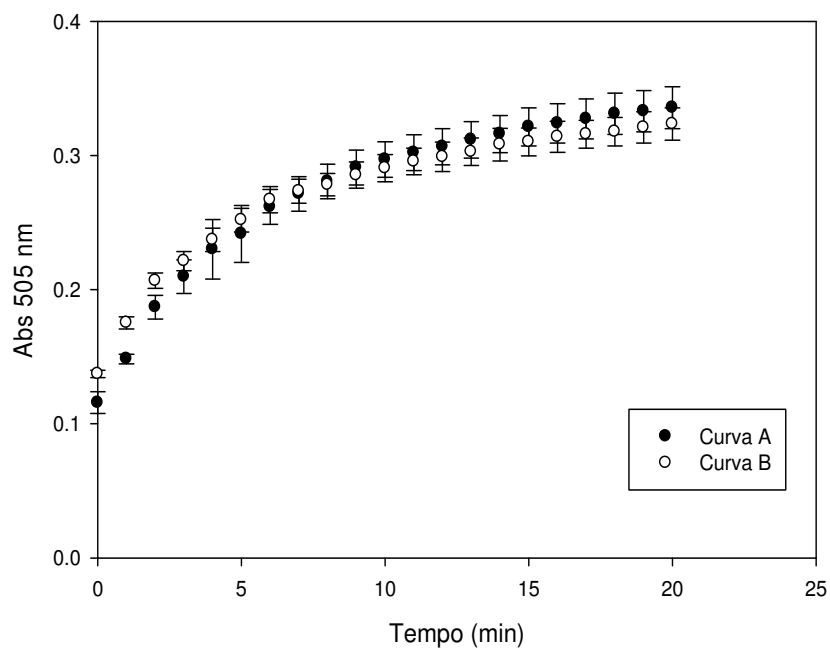
Podemos observar que apesar de a mesma concentração de glicose ter sido adicionada aos dois meios, a amostra que foi submetida a fervura é oxidada mais rapidamente.

Para determinar a configuração anomérica da glicose liberada por PcβGlu1 e PcβGlu2 quando hidrolisam celobiose, a reação de hidrólise foi paralisada com adição de glucono-δ-lactona ou fervendo a 99 °C por 5 min e adicionando o inibidor posteriormente. Após adição do reagente glicose oxidase a absorvância foi determinada a 505 nm. De acordo com as figuras 20 e 21 podemos observar que não houve alteração na velocidade de reação da glicose liberada com o reagente glicose oxidase, antes ou depois do processo de anomerização por fervura.





**Figura 20:** Identificação enzimática da configuração anomérica da D-glicose liberada por Pc $\beta$ glu1. Curva A: D-glicose liberada por Pc $\beta$ Glu1. Curva B: D-glicose liberada por Pc $\beta$ Glu1 após anomerização (fervura).



**Figura 21:** Identificação enzimática da configuração anomérica da D-glicose liberada por Pc $\beta$ glu2. Curva A: D-glicose liberada por Pc $\beta$ Glu2. Curva B: D-glicose liberada por Pc $\beta$ Glu2 após anomerização

(fervura).

Assim podemos dizer que Pc $\beta$ Glu1 e Pc $\beta$ Glu2 liberam  $\beta$ -D-glicose a partir de celobiose, sugerindo que a reação catalizada por estas enzimas ocorrem com retenção de configuração ou produzindo os dois anômeros de glicose. Portanto o mecanismo de reação de Pc $\beta$ Glu1 e Pc $\beta$ Glu2 envolve a protonação do oxigênio do substrato glicosídico seguido pela saída da parte aglicona e ataque do íon oxocarbônio resultante pela água (Sinnott, M.L.;1990).

Utilizando o mesmo protocolo descrito neste trabalho, Saibi et al. (2011), também determinaram a configuração do carbono anomérico da glicose liberada. De acordo com os resultados foi determinado que a  $\beta$ -glicosidase de *S. microspora* também hidrolisa seu substrato por um mecanismo com retenção da configuração do carbono anomérico. De acordo com Thongpoo et al., (2013),  $\beta$ -glicosidases que utilizam o mecanismo de retenção estão classificadas nas famílias GH1, GH3, GH5, GH30 e GH116. Diversas  $\beta$ -glicosidases já foram descritas na literatura como retentoras.

Thongpoo et al. (2013) descreveram uma  $\beta$ -glicosidase de *A. Niger* ASKU 28 que atua pelo mecanismo de deslocamento duplo com retenção da configuração do carbono anomérico do produto de reação. Esta  $\beta$ -glicosidase foi classificada como pertencente a família GH3. O mecanismo de deslocamento duplo empregado pelas enzimas que atuam por retenção da configuração do carbono anomérico permite a estas fazer transglicosilação (hidrólise reversa) (Bathia et al., 2002). Uma  $\beta$ -glicosidase de *Aspergillus Niger* da família GH3 com mecanismo de hidrólise de retenção e atividade de transglicosilação foi descrita por Seidle et al. (2006),

Marana et al. (1995) também descreveram um alquil- $\beta$ -glicosidase que catalisa octil $\beta$ gli pelo mecanismo de retenção de configuração. Esta enzima foi purificada de *Abracris flavolineata*.

### **5.3.5 Sequenciamento de $\beta$ -glicosidases por espectrometria de massas.**

Com o intuito de identificar quais  $\beta$ -glicosidases foram secretadas pelo fungo nas condições de fermentação a que foi submetido, foi realizado o sequenciamento

pela técnica de *shotgun*. Esta técnica acopla a cromatografia líquida de alta performance com a espectrometria de massas. As amostras contendo PcβGlu1 e PcβGlu2 foram digeridas com tripsina e os peptídeos foram separados utilizando cromatografia de fase reversa em coluna C18. Após a separação, os peptídeos foram submetidos a análise MS/MS utilizando LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific, EUA), que utiliza ionização por eletrospray, seleção de íons em uma armadilha linear de íons (*Liner Ion Trap*), fragmentação de íons em uma célula de colisão HCD e detecção de massa em um analisador Orbitrap para análise baseada em transformada de Fourier. Os peptídeos foram identificados utilizando a ferramenta de busca MASCOT (MASCOT version\_1.9.05, Matrix Science, Londres, Reino Unido).

PcβGlu1 foi identificada como uma proteína codificada pelo gene Pc18g01940 de *P. chrysogenum* pertencente a família GH3 com 15 % de cobertura e obtenção de dois peptídeos únicos. A proteína identificada possui 865 aminoácidos e massa molecular de 94,3 kDa. Essa massa novamente confirma a teoria de que esta proteína apresenta-se na forma de homodímero.

```
>gi|255942539|ref|XP_002562038.1| Pc18g01940 [Penicillium chrysogenum Wisconsin 54-1255]gi|211586771|emb|CAP94418.1| Pc18g01940 [Penicillium chrysogenum Wisconsin 54-1255].

MKFAWFEVAALTASVANANSLAYSPPPYPPSPWMTGEGDWSEAYTRAVEFVSNLTLAEKVNLTGSG
GWMQESCVGETGGIPRLGMWGMCMQDAPLGIRFSDYNSAFPAGVNVAADWDKRLAYQQRGVAMG
EEHRDKGVDVQLGVPVAGPLGKFPDGGRNWEGFSPDPVLTGVMMMAETIKGMQDAGVIACAKHFIGN
EQEHFRQSGEAQGYGNISQSLSSNIDDKTMHELYLWPFVDSIRAGVGSVMCSYNQINNSYGCANS
YSLNKLKLGELGFQGFVMSDWGAHHSVGSALAGLDMSPGDIVLGSPPSYWGTNLTISVLNGTM
PEWRVDDMAVRIIMSAYYKVGRDRFRTPPNFSSWTRDEYNFQHSMVSEDWGVNERNVQRDHA
QIIRKIGSDSTVLLKKNKGALPLTHNEKFISILGEDAGSNAHGANGCDDRGCNDGTLAMGWGSGTAN
YPYLITPEQAIQNEALEYSNGQTNVFAVTDNWALTQMAALASQADVALVFNADSGEGFINVDGNE
GDRKNLTLWKNNGEEVIKTASQHCNNTIVVIHSTSAVLISDWYDNDNITAIWAGLPGQESGHSVDVL
YGRINPGGKTPFTWGGKTRKDYGPPLVTVPNNGADAPQDNFEDGVFIDYRRFDKDNIEPIYEFYGL
SYTKFAFSDIKVTPLASSQRGEYKATTGKSQKAPVLGEPSTVSDNLFPEGIKRVRQYLYPWLNSTDL
RASSGDPDYGMDSKDYLPYGATDGSQDQLPSSGSSGGNPGLFEDLYQVTATITNTGSVTGDEVP
QLYLSLGGNDPTKVLRRQFDRVTIAPGQSLQWTTTLTRRDVSNWDVASQNWVISGAQKKVYVGNS
SRKLPLSADLPSVE
```

**Figura 22:** Sequência da proteína codificada pelo gene Pc18g01940 de *P. chrysogenum* identificada como PcβGlu1. Os peptídeos em destaque foram identificados por espectrometria de massa a partir da proteína purificada.

PcβGlu2 foi identificada como uma β-glicosidase pertencente a família GH3 com 3,3 % de cobertura como produto do gene Pc20g10170 e obtenção de um peptídeo

único. A proteína identificada apresenta 736 aminoácidos e massa molecular de 77,5 kDa. Para confirmação da identificação desta proteína corretamente é necessário que um novo sequenciamento seja realizado para maior cobertura da sequência.

```
>gi|255945487|ref|XP_002563511.1| Pc20g10170 [Penicillium chrysogenum Wisconsin 54-1255]gi|211588246|emb|CAP86346.1| Pc20g10170 [Penicillium chrysogenum Wisconsin 54-1255].  
  
MQNLLVSALALSAAADAYGAGAAGWDAAYSKAQAALLKLNQTEKVGIATGVGWEGGPCVGNLYAP  
SSIDYPSLCLQDSPLGIRYANPVTAFFPAGINAGATWDRSLLYARGAAMGQEAKGLGVHVQLGPSAGP  
LGKNPDGGRNWEFGFSDPYLAGVGMEEITQGMQDSGVQACAKHWLGNREQEHNRETMSNIGDRA  
THELYLWPFMNAVKANVASVMCSYKLNLTWACESDAVLNDLLKDELGFPGYVMSDWNQAHTGVN  
SALAGLDMTPGSDFNKPPGSIFWGPNLVEAVTNGSVPSRLDDMATRILASWYLLGQDQGYPEVT  
FSSWNGGKATVDVTADHASVVRTVARDIVLLKNQEHALPLRKPKSLAIIGQDAIVNPDGPNACVDRG  
CNTGTLAMGWGSGTAEFPYLIAPLDAIKVQAQKDGTKIVESTTDTTAAASAAAAADTAVVFINADAG  
EGYLTVEGNAGDRNNDPWHNGNELVKSVAANKNVIVVSVHSGPIIETILAQPSVKAIVWAGLPQG  
ESGNALVDVMTTSPSGKLPYTIKQPSDYGAGWNSALVDNFVEDLFIDYRHFKNGIAPRYEFGY  
GLSYTTFNYSGLAVSVSATAGPSNGPIVPGGAEELFQSVGTISVIVENTGEVAGAEVAQLYLGLPDSV  
LSTPPKQLRGFQKLNLPGEQGTATFELTRRDLISYWDVQTQKWVVPSTFTVYVGASSRDIHGEKG  
FTVA
```

**Figura 23:** Seqüência da proteína codificada pelo gene Pc20g10170 de *P. chrysogenum* identificada para PcβGlu2. Os peptídeos em destaque foram identificados por espectrometria de massa a partir da proteína purificada.

Assim, as duas proteínas foram identificadas como β-glicosidasas pertencentes a família GH3. Enzimas classificadas nesta família atuam por um mecanismo de retenção, o que é coerente com os resultados neste trabalho, que caracterizou as duas enzimas como retentoras. Enzimas GH3 possuem um aspartato como nucleófilo catalítico e um glutamato como doador de prótons no sítio catalítico. A estrutura destas enzimas é formada por dois domínios, um TIM barril seguido por uma estrutura tipo sanduíche α/β. Esta estrutura compreende 6 folhas β em conformação estendida entre 3 α-hélices de cada lado. O sítio ativo destas enzimas está situado entre os domínios (β/α)<sub>8</sub> e (α/β)<sub>6</sub> (Varghese et al., 1997).

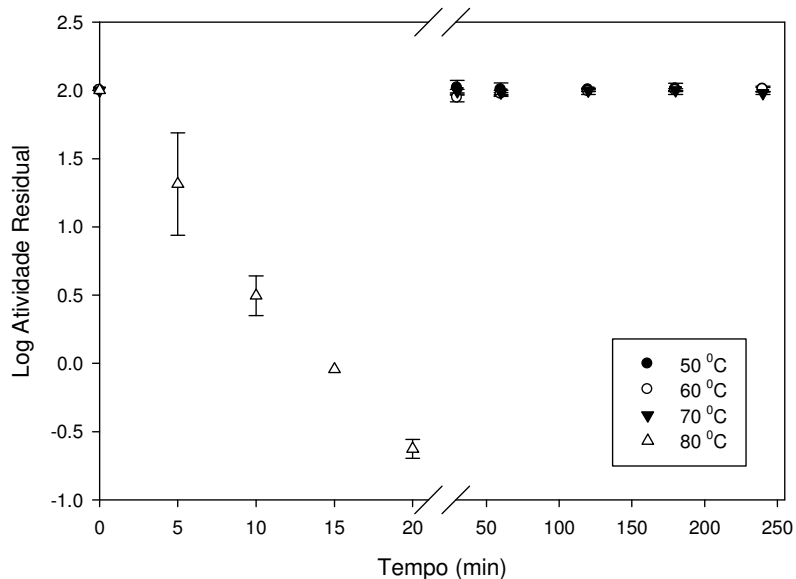
### 5.3.6 Efeito da Temperatura

Para analisar a estabilidade térmica das enzimas estudadas estas foram

incubadas por 4 h em diferentes temperaturas variando de 40 a 80 °C. Alíquotas foram retiradas em diferentes intervalos de tempo e depois avaliadas quanto a atividade residual.

A atividade catalítica de uma enzima provêm de uma estrutura terciária precisa, altamente ordenada com grupos de aminoácidos justapostos de tal modo a formar sítios específicos de ligação do substrato com o centro catalítico. Esta estrutura terciária é mantida por inúmeras ligações fracas, ou seja, é uma estrutura relativamente frágil. Com o aumento da temperatura a molécula pode absorver energia e a estrutura poderá se romper, ficando a enzima desnaturada com perda de atividade catalítica.

PcβGlu1 mostrou-se estável por 4 h nas temperaturas de 30, 40, 50 e 60 °C, sendo que a 70 °C a enzima manteve 96 % de sua atividade inicial enquanto a 80 °C foi completamente desnaturada. Após 10 min de incubação a 70 °C a atividade ainda manteve-se em 100 % e a 80 °C a enzima manteve apenas 3 % de atividade.



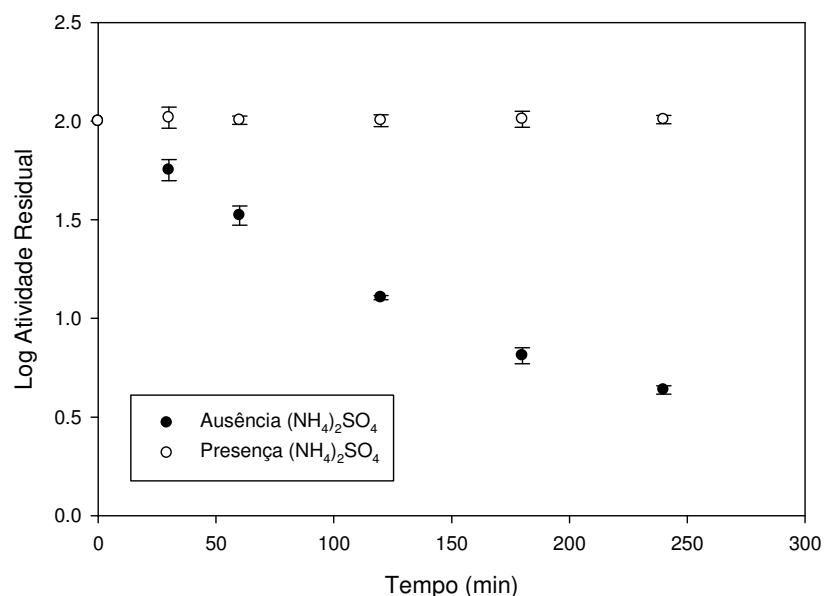
**Figura 24:** Efeito da temperatura sobre a atividade de PcβGlu1. A atividade relativa foi calculada considerando a atividade da enzima não submetida a incubação como 100 %.

Devido ao processo de purificação desta enzima por cromatografia de interação hidrofóbica, a enzima encontra-se em meio com aproximadamente 1 M de sulfato de amônio, pois como observamos na Figura 8, PcβGlu1 é eluída na metade do gradiente aplicado no processo cromatográfico. Para avaliar se o sal é responsável pela

estabilidade da enzima, foi realizada diálise da amostra contra tampão acetato de sódio pH 5 50 mM e esta foi submetida a incubação por 4 h na temperatura de 50 °C. De acordo com a Figura 25 podemos observar que o sulfato de amônio funciona como um estabilizante, pois a sua retirada fez com que PcβGlu1 deixasse de ser estável. O sulfato de amônio presente em baixa concentração pode estabilizar proteínas através de interações eletrostáticas não específicas, dependentes da força iônica do meio (Arakawa; Timasheff, 1984).

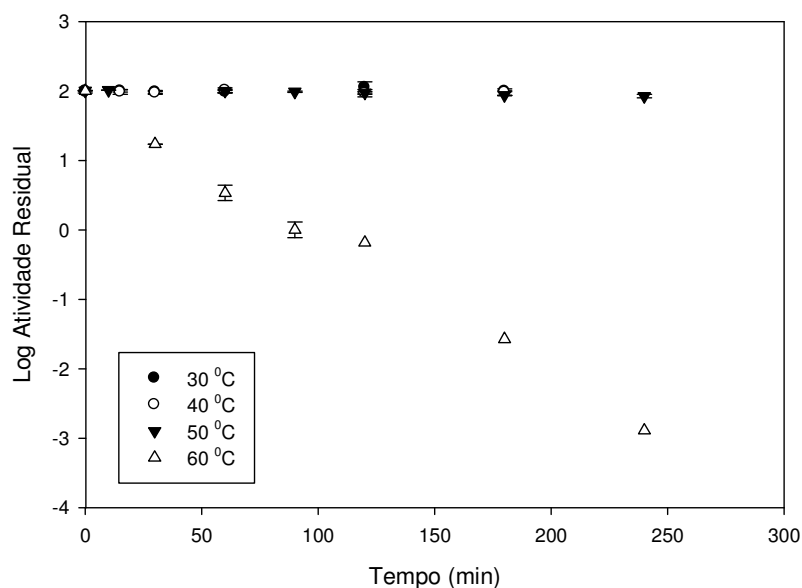
Na ausência de sulfato de amônio a enzima possui apenas 56 % de atividade após 30 min e apenas 4 % após 4 h de incubação. Na presença de sulfato de amônio a enzima mostra-se completamente estável após 4 h.

A enzima pode sofrer desenovelamento parcial quando a temperatura atinge um certo limite, resultando em uma mudança da conformação nativa e perda de atividade. Após um curto tempo de tratamento em temperaturas mais altas a proteína pode recuperar sua atividade, mas após longos períodos de exposição apenas uma pequena porção é recuperada, configurando um processo de termoinativação irreversível (Leite et al., 2007). Os valores de  $k_d$  representam a constante de inativação térmica em determinada temperatura, e esta constante é inversamente proporcional a estabilidade térmica da proteína. Ou seja, um valor de  $k_d$  maior indica uma baixa estabilidade térmica. A constante de termoinativação e a meia vida da enzima foram determinadas para a enzima sem sulfato de amônio quando incubada a 50 °C, e para a enzima no meio contendo sulfato de amônio não foi possível a determinação de  $k_d$  pois não ocorre termoinativação. A meia vida de PcβGlu1 quando incubada a 50 °C na ausência de sal foi de 52 min com  $k_d$  de  $2,21 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ .



**Figura 25:** Efeito da temperatura sobre a atividade de PcβGlu1 na ausência ou presença de sulfato de amônio quando incubada a 50 °C. A atividade relativa foi calculada considerando a atividade da enzima não submetida a incubação como 100 %.

PcβGlu2 na presença de BSA 1 mg/mL mostrou-se estável por 4 h nas temperaturas de 30 e 40 °C, sendo que a 50 °C a enzima manteve 84 % de sua atividade inicial, enquanto a 60 °C foi completamente inativada. Após 30 min de incubação a 50 °C a atividade ainda manteve-se em 100 % e a 60 °C a enzima manteve apenas 17 % de atividade. Na temperatura de 70 °C PcβGlu2 perde a atividade totalmente em menos de 4 min. Na ausência de estabilizante PcβGlu2 apresentou meia vida de 32 min a 30 °C.



**Figura 26:** Efeito da temperatura sobre a atividade de PcβGlu2. A atividade relativa foi calculada considerando a atividade da enzima não submetida a incubação como 100 %.

A termoinativação das duas enzimas foi determinada conforme resultados da Tabela 3. Para PcβGlu1 foi possível a determinação de  $K_d$  nas temperaturas de 70 e 80 °C e para PcβGlu2 nas temperaturas de 50 e 60 °C. A regressão linear de log da atividade residual contra tempo de pré-incubação mostrou coeficiente de correlação maior que 0,99. Os plots demonstram que a inativação das duas proteínas seguiu uma cinética de inativação de primeira ordem, como indicado pela linearidade dos dados. Isto indica inativação por um processo monomolecular ou que a inativação causada pelo agregamento de proteínas não foi suficiente para causar a perda de linearidade (Cobos et al., 2003).

De acordo com os dados relatados acima e com a Tabela 3 abaixo, podemos afirmar que na presença de sulfato de amônio PcβGlu1 é mais estável que PcβGlu2. PcβGlu1 apresentou estabilidade nas temperaturas de 30 – 60 °C e meia vida de 9174 min na temperatura de 70 °C e de 3 min a 80 °C. PcβGlu2 apresentou-se estável apenas nas temperaturas de 30 e 40 °C com meia vida de 814 min a 50 °C e de 16 min a 60 °C.



**Tabela 3:** Constante de termoinativação ( $k_d$ ) e meia vida ( $T_{1/2}$ ) para PcβGlu1 na presença de sulfato de amônio e PcβGlu2 na presença de BSA, quando incubadas em diferentes temperaturas, obtidas a partir do plot log da atividade relativa contra tempo de incubação.

	50 °C	60 °C	70 °C	80 °C
$k_d$ PcβGlu1	-	-	$1,4 \times 10^{-6} \pm 5 \times 10^{-7}$	$4,4 \times 10^{-3} \pm 8 \times 10^{-4}$
$k_d$ PcβGlu2	$1,4 \times 10^{-5} \pm 2 \times 10^{-5}$	$7,3 \times 10^{-4} \pm 3 \times 10^{-5}$	-	-
$T_{1/2}$ PcβGlu1	-	-	$9174 \pm 904$	$3 \pm 0.3$
$T_{1/2}$ PcβGlu2	$814 \pm 121$	$16 \pm 1$	-	-
$k_d = s^{-1}$	$T_{1/2} = \text{min}$			

Bhiri et al. (2008) testaram a estabilidade térmica de duas β-glicosidases, incubando-as entre as temperaturas 30 a 70 °C por 30 min na ausência de substrato. As duas β-glicosidases mantiveram 80 % de sua atividade inicial a 60 °C, no entanto a 70 °C as enzimas perderam a atividade totalmente, não foi determinada a meia vida das enzimas purificadas.

Pal et al. (2010) estudaram a estabilidade térmica da β-glicosidase purificada de *T. clypeatus* incubando-a por 1 h em temperaturas de 30 a 80 °C. A enzima manteve atividade acima de 80 %, entre as temperaturas de 30 a 60 °C e 64 e 46 % de atividade nas temperaturas de 70 e 80 °C, respectivamente.

A estabilidade da β-glicosidase de *Daldinia eschscholsii* foi determinada incubando a proteína por 30 min em temperaturas de 30 a 80 °C. A enzima mostrou-se estável por 30 min em temperaturas até 60 °C e foi completamente inativada em 70 e 80 °C (Karnchanatat et al., 2007).

De acordo com Park et al. (2012) a β-glicosidase purificada de *P. italicum* apresentou cinética de primeira ordem para inativação térmica e meia vida de 1737, 330, 34 e 1 h nas temperaturas de 50, 55, 60 e 65 °C respectivamente.

Leite et al. (2007) purificaram uma β-glicosidase secretada pelo fungo mesofílico *A. pullulans* e uma β-glicosidase do fungo termofílico *T. aurantiacus*. Estas enzimas foram incubadas por 1h em temperaturas de 40 a 90 °C. Segundo estes autores enzimas produzidas por fungos termofílicos são mais estáveis que as enzimas produzidas por fungos mesofílicos, no entanto neste trabalho foi encontrado que a β-glicosidase produzida por *A. pullulans* é mais estável que a enzima secretada por *T.*

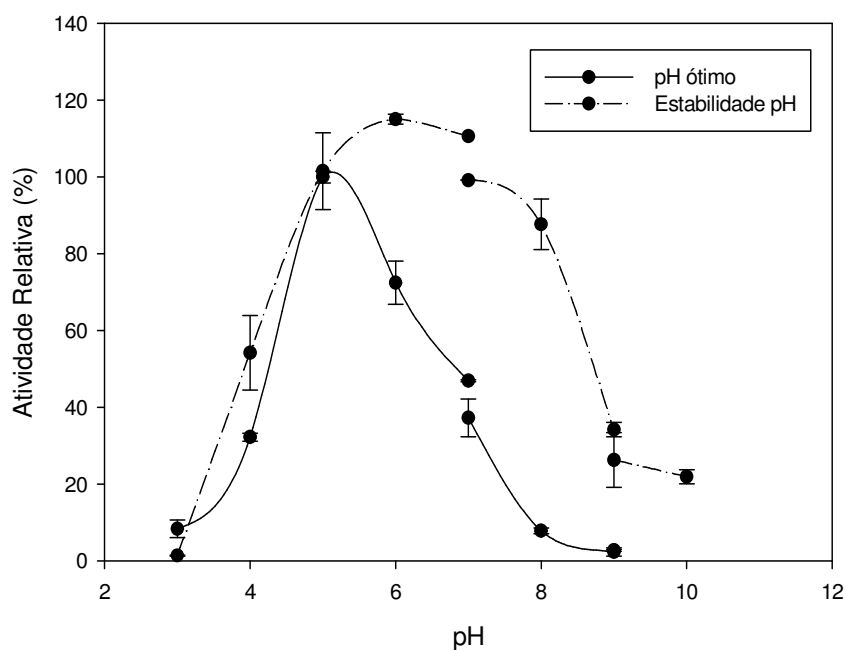
*aurantiacus*. A  $\beta$ -glicosidase produzida pelo primeiro manteve mais de 90 % de sua atividade na temperatura de 75 °C e a  $\beta$ -glicosidase secretada por *T. aurantiacus* 90 % de sua atividade na temperatura de 70 °C. A meia vida para a enzima *T. aurantiacus* foi de 29,7 min a 80 °C, 6,2 min a 82,5 °C, 3,8 min a 85 °C e 1,3 min a 87,5 °C. Para a  $\beta$ -glicosidase de *A. pullulans* a meia vida foi de 88,7 min a 80 °C, 22,7 min a 82,5 °C, 11 min a 85 °C e de 1,83 min a 87,5 °C. A meia vida da  $\beta$ -glicosidase purificada de *P. pinophilum* foi determinada por Joo et al. (2010), foram encontrados valores de 35, 24, 9 e 2,5 h nas temperaturas de 40, 50, 60 e 70 °C respectivamente.

Daroit et al. (2008) determinou a estabilidade da  $\beta$ -glicosidase de *Chalara paradoxa*, quando incubada a 60 °C a enzima manteve 83 % de sua atividade inicial após 1 h e 78 % após 2 h, possuindo meia vida de 315 min. A 65 °C a enzima apresentou meia vida de 57 min e 50 % e 22 % da atividade inicial após 1 e 2 h de incubação. A 70 °C a meia vida desta enzima foi de apenas 1,8 min.

### **5.3.7 Efeito do pH**

O efeito do pH sobre a atividade e sobre a estabilidade de Pc $\beta$ Glu1 e Pc $\beta$ Glu2 foi avaliado. O sítio catalítico das proteínas é constituído por grupos ionizáveis que devem se encontrar em uma forma iônica adequada, para que mantenham a conformação do sítio ativo, liguem-se aos substratos, ou catalisem a reação. Assim a mudança do pH do meio altera a protonação das cadeias laterais dos aminoácidos, alterando a estrutura das proteínas e principalmente a protonação dos aminoácidos no sítio ativo e até mesmo a forma do sítio ativo. A forma como a enzima atua sobre os substratos é alterada e a mudança do pH causa alteração da atividade enzimática. Os substratos podem também conter grupos ionizáveis e somente uma forma deste substrato pode se ligar a enzima e sofrer catálise.

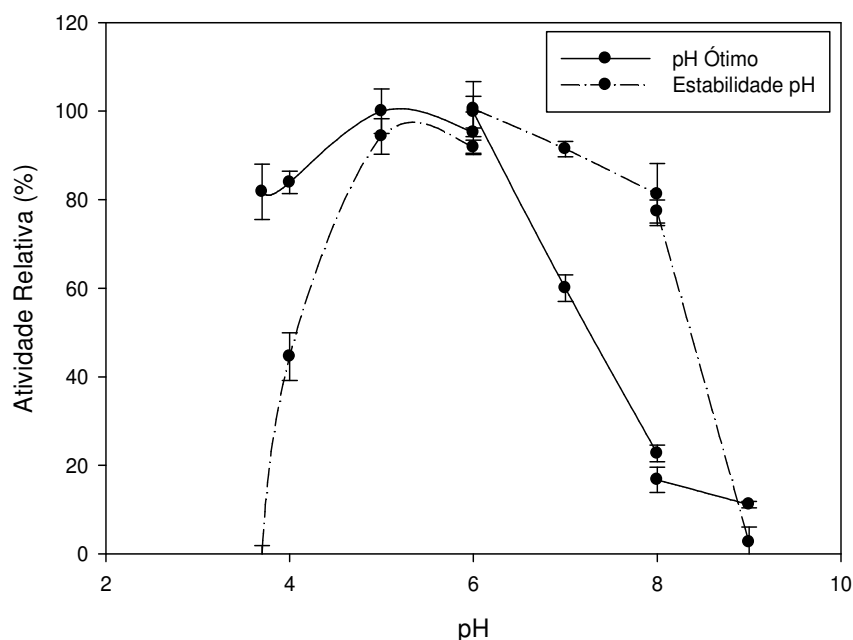
De acordo com a Figura 27 podemos observar que a máxima atividade de Pc $\beta$ Glu1 ocorre em pH 5 e em pH 6 a enzima ainda possui 72 % da atividade. Em valores de pH 3 e 4 e na faixa de 7 a 9, a atividade enzimática não atinge 50 %.



**Figura 27:** Efeito do pH sobre a atividade de PcβGlu1. Determinação da atividade ótima de PcβGlu1 em diferentes valores de pH e efeito do pH sobre a estabilidade de PcβGlu1 quando incubada a 40 °C por 4 h em diferentes valores de pH.

Para PcβGlu2, podemos observar pela figura 28 que sua atividade não é alterada tão drasticamente com a alteração do pH, assim como ocorre para PcβGlu1. A máxima atividade para esta enzima também ocorre em pH 5, no entanto em pH 6 a enzima ainda mantém quase 100 % de sua atividade e em pH 3,6 e 4 a atividade mantém-se acima de 80 %. Estes dados demonstram que a enzima possui características mais acídicas que PcβGlu1. Em pH 7 PcβGlu2 apresenta 60 % de atividade e em pH 8 e 9 a atividade foi drasticamente alterada permanecendo em 17 e 11 % respectivamente.

Pcβglu1 parece ser mais sensível a mudança de pH que PcβGlu2 de acordo com os resultados demonstrados nas Figuras 27 e 28.



**Figura 28:** Efeito do pH sobre a atividade de PcβGlu2. Determinação da atividade ótima de PcβGlu2 em diferentes valores de pH e efeito do pH sobre a estabilidade de PcβGlu2 quando incubada a 40 °C por 4 h em diferentes valores de pH.

Para β-glicosidases fúngicas, segundo Bathia et al. (2002), são encontrados valores de pH ótimo entre 4 e 6. Duas β-glicosidases purificadas de *P. occitanis* apresentaram atividade ótima em pH 4,5 (Bhiri et al., 2008), assim como a β-glicosidase purificada de *P. italicum* (Park et al., 2012).

Resultados semelhantes aos descritos neste trabalho foram encontrados por Jeya et al. (2010) que purificaram uma β-glicosidase de *P. purpurogenum* com atividade ótima em pH 5, assim como a β-glicosidase de *P. verruculosum* purificada por Korotkova et al. (2009). β-glicosidases de *A. pullulans* e *T. aurantiacus* foram mais ativas em pH 4 a 4,5 e 4,5 respectivamente, como descrito por Leite et al. (2007). Joo et al. (2010) purificaram uma β-glicosidase de *P. pinophilum* com atividade ótima em pH 5 e esta enzima ainda possui atividade de 92 e 83 % em pH 6 e 7, respectivamente. Daroit et al. (2008), purificou uma β-glicosidase de *Chalara paradoxa* com atividade ótima entre pH 4 a 5.

Para avaliação da estabilidade das enzimas em diferentes valores de pH, PcβGlu1 foi incubada em valores de pH entre 3 e 10 e PcβGlu2 em valores de pH 3,6 a

9 por 4 h a 40 °C.

Como demonstrado na Figura 27, quando PcβGlu1 é incubada em pH 3 ocorre desnaturação irreversível da enzima, pois quando retornada ao pH ótimo ela não consegue hidrolisar o substrato. Quando incubada em valores de pH 5 a 7, a enzima manteve 100 % de sua atividade, e 87 % quando incubada em pH 8. Em pH 4 a enzima manteve 54 % de sua atividade, mas em pHs 9 a 11 apenas 20 % da atividade foi mantida.

Pcβglu2, como observado na Figura 28, em pH 5 a 7 manteve sua atividade acima de 90 % e em pH 8 manteve 81 % da atividade. No entanto quando incubada em pH 3,6 e 9, a enzima não é capaz de hidrolisar o substrato quando retorna ao pH ótimo, ou seja ocorre desnaturação irreversível. Em pH 4 apenas 54 % da atividade é recuperada.

Resultado semelhante ao deste trabalho, foi encontrado por Pal et al. (2010) que purificou uma β-glicosidase intracelular de *Termitomyces clypeatus*. A enzima possui pH ótimo em 5 e manteve 100, 95 e 80 % da atividade após ser incubada em pH 6, 7 e 8 por 1 hora a 45 °C. Neste caso, PcβGlu1 e 2 são mais estáveis a mudança de pH na faixa de 5 a 8 que a β-glicosidase purificada de *Termitomyces clypeatus*.

Karnchanatat et al. (2007) purificaram uma β-glicosidase de *Daldinia eschscholzii* com atividade ótima em pH 5 e incubaram a enzima a 30 °C por 1h em pH variando de 3 a 9. A enzima foi estável em valores de pH de 5 a 8, mantendo 85 % de sua atividade após incubação, no entanto esta mostrou-se sensível quando incubada em valores de pH abaixo de 4. Neste caso a proteína foi estável em condições neutras e alcalinas, em pH 9 ainda manteve 75 % de atividade.

β-glicosidase de *P. decumbens* foi purificada por Chen et al. (2010) e apresentou atividade ótima em pH entre 4,5 e 5,5. A β-glicosidase foi estável em pH 5 e manteve 95 % de sua atividade original após ser incubada por 18 h a temperatura ambiente.

Nguyen et al. (2010) investigaram a estabilidade de pH de uma β-glicosidase purificada de *Stereum hirsutum* após incubação a 20 °C por 24 h. A enzima mostrou-se estável em valores de pH ácidos entre 3 a 5 e manteve 15 % e 76 % de atividade em pH 2 e 2,5.

$\beta$ -glicosidases de *P. occitanis* purificadas por Bhiri et al. (2008) mostraram-se estáveis em faixas de pH de 3 a 8 quando incubadas por 24 h a 4 °C. No entanto em pH 2 e 9 a atividade foi totalmente perdida.

### **5.3.8 Efeito de Íons**

O efeito de diversos cátions sobre a capacidade de Pc $\beta$ glu1 e Pc $\beta$ glu2 em hidrolisar pNP $\beta$ Gli foi testado. As enzimas foram incubadas a 40 °C por 30 min na presença de 100 mM dos diferentes íons.

Como podemos observar na Tabela 4, os íons testados não apresentaram efeitos de ativação significativos sobre as duas enzimas. Para Pc $\beta$ Glu1 podemos destacar apenas K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

A atividade de Pc $\beta$ Glu1 foi fortemente inibida por Fe<sup>3+</sup>, Pb<sup>+</sup> e Ba<sup>2+</sup>. Em um menor nível a inibição também ocorreu pelos seguintes íons na ordem Cu<sup>2+</sup>> Hg<sup>+</sup>>Mn<sup>2+</sup>> Co<sup>2+</sup>> Ca<sup>2+</sup>> Zn<sup>2+</sup>.

A atividade de Pc $\beta$ Glu2 foi fortemente inibida por Cu<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Hg<sup>+</sup>, Pb<sup>+</sup> e Fe<sup>3+</sup>. Os outros íons foram inibidores na seguinte ordem Zn<sup>2+</sup>> Mg<sup>2+</sup> = Mn<sup>2+</sup>> Co<sup>2+</sup>> Ca<sup>2+</sup>.

O interessante é que atividade de Pc $\beta$ Glu2 foi mais inibida pelos íons Cu<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> e Hg<sup>+</sup>, que a atividade de Pc $\beta$ Glu1, podendo indicar a presença de mais grupos tióis no sítio ativo de Pc $\beta$ Glu2, necessários para a catálise, que no sítio ativo de Pc $\beta$ Glu1, ou que Pc $\beta$ Glu2 possui mais grupos tióis ajudando a manter a estabilidade e conformação da proteína nativa. Segundo Riou et al. (1998) a modificação da atividade enzimática de  $\beta$ -glicosidases por cátions como Ag<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>+</sup>, Zn<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup>, indica a presença de grupos tióis nos sítios catalíticos, pois estes grupos são alvos de metais pesados. Estes estão envolvidos na ligação ou catálise do substrato ou estes grupos estão envolvidos na manutenção da estrutura terciária da enzima. Estes dados são consistentes com o envolvimento de resíduos de cisteína na manutenção da estabilidade e na atividade de  $\beta$ -glicosidases. A ativação por Mn<sup>2+</sup>, quando este não está envolvido na estabilidade da enzima pode indicar um papel funcional deste cátion, como a modulação da atividade enzimática.

**Tabela 4:** Efeito de diferentes íons sobre a atividade de PcβGlu1 e PcβGlu2 após incubação a 40 °C por 30 min.

	Atividade Residual (%)	
	PcβGlu1	PcβGlu2
Controle	100 ± 0	100 ± 0
NaCl	107 ± 6	101 ± 4
NaNO <sub>3</sub>	101 ± 6	107 ± 13
KCl	111 ± 3	100 ± 13
CuSO <sub>4</sub>	30 ± 0.5	0
BaCl <sub>2</sub>	13.3 ± 0.9	0.9 ± 0.01
MgCl <sub>2</sub>	114 ± 3	64 ± 1
CaCl <sub>2</sub>	89 ± 0.4	86 ± 2
ZnCl <sub>2</sub>	92 ± 1	22 ± 1
HgCl	57 ± 1	0.55 ± 0.01
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1.2 ± 0.4	3.3 ± 1
NH <sub>4</sub> Cl	108 ± 0.2	101 ± 14
MnCl <sub>2</sub>	72 ± 0.3	64 ± 0.5
CoCl <sub>2</sub>	78 ± 0.1	73 ± 2
FeCl <sub>3</sub>	0.3 ± 0	0

β-glicosidase de *S. microspora* foi ativada pelo íon Fe<sup>2+</sup> com atividade de 161 % na concentração de 10 mM e foi fortemente inibida por Fe<sup>3+</sup>, demonstrando que Fe<sup>2+</sup> é especificamente reconhecido por alguns resíduos da β-glicosidase. Outros íons aumentaram a atividade a um nível moderado, como Manganês (140 %), bário e cálcio (120 %). No entanto mercúrio reduziu a atividade a 15,79 %. Cobalto não apresentou efeito sobre a atividade de β-glicosidase na concentração utilizada (Saibi et al, 2011).

Yang et al. (2008) testaram o efeito de diversos íons sobre a atividade de β-glicosidase de *Paecilomyces termophila* na concentração de 4 mM. A atividade foi fortemente inibida pelo íon mercúrio (3,5 %) e prata (20,1 %). Os íons Zn<sup>2+</sup> (142 %), Fe<sup>2+</sup> (136 %), Ni<sup>2+</sup> (125 %) Co<sup>2+</sup> (124 %), Mn<sup>2+</sup> (119 %) e Mg<sup>2+</sup> (114 %) ativaram a enzima.

β-glicosidase de *Periconia sp.* apresentou atividade inibida quando colocada na presença de 10 mM dos íons Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>. Todos os íons reduziram a atividade enzimática entre 30 e 80 %, aproximadamente

(Harnpicharnchai et al., 2009).

Os íons  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Hg}^+$  causaram completa inibição da  $\beta$ -glicosidase de *P. pinophilum* na concentração de 0,1 mM. Enquanto  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$  não inibiram nem ativaram a atividade enzimática. Manganês e cobalto inibiram a atividade em 64 e 50 % de acordo com Joo et al. (2010).

De acordo com Ng et al. (2010) os íons  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  inibiram a atividade de  $\beta$ -glicosidase de *P. citrinum*, indicando a presença de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histina) e aminoácidos ácidos (aspartato e glutamato) nos domínios catalíticos no sítio ativo da enzima. Os íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$  não tiveram efeito sobre a atividade enzimática.

A  $\beta$ -glicosidase de *Stereum hirsutum* teve a atividade enzimática inibida 20 % na presença de  $\text{Fe}^{3+}$  na concentração de 1 mM. Os íons  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  não tiveram efeito inibitório (Nguyen et al., 2010).

A atividade de uma  $\beta$ -glicosidase purificada de *T. clypeatus* foi inibida de 50 a 60 % na presença de cloreto de cálcio, sulfato de magnésio, sulfato de cobre, sulfato de zinco e cloreto de magnésio. Na presença de cloreto de mercúrio a enzima foi completamente inativada e na presença de cloreto de magnésio apresentou atividade residual de 26 % (Pal et al., 2010).

### **5.3.9 Especificidade para o Substrato**

$\beta$ -glicosidases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas em oligossacarídeos e glicoconjugados. Várias  $\beta$ -glicosidases são específicas para clivagem de ligações glicosídicas dependendo do número, posição ou configuração dos grupos hidroxilas na molécula de açúcar (Melo et al., 2006). Em geral  $\beta$ -glicosidases de diferentes ordens e reinos diferem em sua especificidade de substrato devido a especificidade pela parte aglicona ligada ao glicosídeo. Pouco se sabe sobre a interação de  $\beta$ -glicosidases com seus substratos, especialmente com a parte aglicona. A interação de  $\beta$ -glicosidases com a parte aglicona do substrato é a base da grande diversidade de substratos que esta enzima é capaz de hidrolisar e é o que faz com que esta enzima tenha diferença de especificidade de substratos. O entendimento deste mecanismo de reconhecimento do substrato na parte aglicona é crítico para modificar



enzimas de forma que estas hidrolisem ou sintetizem compostos de interesse com a eficiência catalítica desejada para aplicações médicas e biotecnológicas (Bhatia et al., 2002).

**Tabela 5:** Atividades de Pc $\beta$ Glu1 e Pc $\beta$ Glu2 purificadas de *Penicillium chrysogenum* sobre substratos sintéticos, naturais e polissacarídeos.

Substrato	Atividade Relativa (%) Pc $\beta$ Glu1	Atividade Relativa (%) Pc $\beta$ Glu2
p-Nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (0,5 mM)	100.0	100.0
p-Nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (0,5 mM)	N.D.	N.D.
Octil- $\beta$ -glucopiranosídeo (0,5 mM)	29.1	881.2
Metilumbeliferil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo ( 0,01 mM)	8.1	122.5
Metilumbelliferil- $\beta$ -D-manopiranosídeo ( 0,01 mM)	N.D.	N.D.
Celobiose (0,5 mM)	18.9	1608.5
Celotriose (0,5 mM)	22.6	4810.1
Celotetraose (0,5 mM)	60.5	6240.4
Celopentaose ( 0,5 mM)	59.8	5432.2
Gentiobiose (0,5 mM)	52.9	3524.8
Laminaribiose (0,5 mM)	93.4	1278.2
CMC (0,25 %)	N.D.	N.D.
Laminarina (0,25 %)	0.2	37.0
Avicel (0,25 %)	N.D.	N.D.

As atividades sobre os diversos substratos foram determinadas em relação a hidrólise de pNP $\beta$ Gli, considerando a atividade obtida sobre este substrato como 100 %. Pc $\beta$ Glu1 e Pc $\beta$ Glu2 mostraram-se capazes de hidrolisar pNP $\beta$ Gli e MU $\beta$ Gli, substratos aril glicosídeos sintéticos, sendo que este possui uma cadeia aglicona maior que o primeiro. A preferência de  $\beta$ -glicosidases por aril glicosídeos é devido a alta eletrofilicidade da parte aglicona, o que aumenta a estabilidade do ânion p-nitrofenóxido gerado durante a primeira etapa da catálise (Plant et al., 1988).

As duas enzimas hidrolisam eficientemente oligossacarídeos naturais contendo ligações (1-4) -  $\beta$ -glicosídicas, como celobiose, celotriose, celotetraose e celopentaose. As enzimas também demonstraram não ser específicas para ligações (1-4)- $\beta$ -glicosídicas encontradas na celobiose, pois hidrolisaram glicosídeos em ligação  $\beta$ -1,3 como laminaribiose e o políssacarídeo solúvel laminarina e um glicosídeo  $\beta$ -1,6 como gentiobiose. Octil $\beta$ Gli, um alquil glicosídeo com cadeia hidrofóbica de oito carbonos, também foi eficientemente hidrolisado pelas duas enzimas.

Pc $\beta$ Glu1 e Pc $\beta$ Glu2 não foram capazes de hidrolisar polímeros de celulose

como carboximetilcelulose e Avicel®. As duas enzimas não foram capazes de hidrolisar substratos que apresentavam manose ou galactose ligada à parte aglicona, demonstrando a especificidade desta enzima para glicosídeos.

As  $\beta$ -glicosidases podem ser divididas em três grupos baseados na especificidade de substrato: I- Aril- $\beta$ -glicosidases, que possuem alta afinidade por aril- $\beta$ -glicosídeos, II – celobiasas, que hidrolisam somente oligossacarídeos e III-  $\beta$ -glicosidases de amplo espectro, que exibem atividade em vários tipos de substrato, sendo estas as mais comuns (Rojas et al.,1995). Como podemos observar na Tabela 5, as  $\beta$ -glicosidases secretadas por *P. chrysogenum* possuem uma ampla especificidade de substrato, pois foram capazes de hidrolisar aril e alquil- $\beta$ -glicosídeos, assim como oligossacarídeos. Podemos então classifica-las como enzimas do grupo III -  $\beta$ -glicosidases de ampla especificidade.

$\beta$ -glicosidases com ampla especificidade de substratos já foram reportadas para diversos fungos. Nguyen et al. (2010) caracterizaram uma  $\beta$ -glicosidase de *S. hirsutum* com especificidade para pNP $\beta$ Gli, oNP $\beta$ Gli, celobiose e pNP- $\beta$ -galactopiranosídeo. A atividade sobre pNP $\beta$ Gli foi maior que a atividade sobre oNP $\beta$ Gli, demonstrando que o grupo na posição orto atrapalha no mecanismo de hidrólise.

Riou et al. (1998) caracterizaram uma  $\beta$ -glicosidase de *A. oryzae* com especificidade para oligossacarídeos naturais com ligação  $\beta$ -1,4 como celobiose, lactose e xilobiose e ligações  $\beta$ -1,3 como laminaribiose e  $\beta$ -1,6 como gentiobiose. A enzima também foi capaz de hidrolisar celooligossacarídeos, mas a eficiência de hidrólise diminui com o aumento da cadeia. O polissacarídeo solúvel laminarina foi pouco hidrolisado confirmando a preferência da enzima por substratos pequenos.

A  $\beta$ -glicosidase de *P. pinophilum* caracterizada por Joo et al. (2010), demonstrou atividade sobre pNP $\beta$ Gli, pNP $\beta$ Gal com menor atividade quando oNP $\beta$ Gli e oNP $\beta$ Gal foram utilizados, e demonstrando menor especificidade para ligações  $\beta$ -1,2. Esta enzima também foi capaz de hidrolisar pNP- $\beta$ -manopiranosídeo e celulose microcristalina com menor eficiência. A atividade sobre celooligossacarídeos diminuiu com o aumento da cadeia glicosídica.

Parry et al. (2001) também descreveram uma  $\beta$ -glicosidase de *T. aurantiacus* com ampla especificidade. A enzima apresentou maior atividade sobre pNP $\beta$ Gli e

quando o grupo nitro apresentava-se na posição orto a atividade era menor. A enzima também apresentou atividade sobre pNP $\beta$ celobiosídeo, pNP $\beta$ lactosídeo, pNP $\beta$ xilosídeo, pNPgentiobiose, entre outros substratos.

$\beta$ -glicosidase de *P. italicum* demonstrou atividade apenas sobre alguns aril-glicosídeos como pNP $\beta$ Gli e pNP $\beta$ Xil e sobre celobiose, sendo uma  $\beta$ -glicosidase de espectro reduzido de substratos (Park et al., 2012).

## 5.4 Caracterização Cinética

### 5.4.1 Especificidade frente a diferentes substratos

A velocidade máxima de hidrólise e a constante de Michaelis ( $K_M$ ) foram determinadas conforme descrito no item 4.13.1, nos substratos sobre os quais a enzima demonstrou atividade.

A constante catalítica  $k_{cat}$  determina o número de moléculas de substrato que será convertido em produto por segundo por molécula de enzima ou seja, descreve a eficiência de catálise de uma determinada proteína. A constante de especificidade ( $k_{cat}/K_M$ ) relaciona, portanto a especificidade catalítica da enzima com sua afinidade pelo substrato.

Para Pc $\beta$ glu1 os substratos testados apresentaram curvas de saturação hiperbólica e o plot de duplo recíproco correspondente foi linear. A atividade desta enzima seguiu a cinética de Michaelis-Menten de acordo com o aumento da concentração dos diferentes substratos utilizados.

De acordo com os resultados obtidos para Pc $\beta$ Glu1, a eficiência catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ) para o substrato pNP $\beta$ Gli é de 143,8 s<sup>-1</sup>mM<sup>-1</sup>, comparado com MU $\beta$ Gli que possui uma eficiência catalítica de 109,1 s<sup>-1</sup>mM<sup>-1</sup>, demonstrando a preferência desta enzima por pNP $\beta$ Gli. Podemos notar também o maior valor de  $k_{cat}$  para pNP $\beta$ Gli em relação a MU $\beta$ Gli, mas como estes dois substratos possuem a mesma parte glicona, podemos dizer que a diferença de catálise ocorre devido ao processo de glicosilação e liberação da parte aglicona (ver item 3.5). Como podemos observar na tabela abaixo os dois substratos possuem valores muito próximos de afinidade de ligação ao sítio ativo da enzima ( $K_M$ ), mas a eficiência catalítica de Pc $\beta$ Glu1 sobre pNP $\beta$ Gli é 1,5 vezes

maior que a eficiência com que hidrolisa MU $\beta$ GLi, resultado demonstrado pelo valor  $k_{cat}$ . A eficiência catalítica para o substrato octil $\beta$ gli demonstra a preferência desta enzima por substratos com cadeias agliconas arílicas em relação às alquílicas.

Dentre a série de oligossacarídeos observamos o aumento da constante de especificidade com o aumento da cadeia glicosídica do substrato, isto ocorre porque a enzima parece ter maior afinidade de ligação com substratos de cadeias maiores, no entanto percebemos que a eficiência catalítica da enzima aumenta até oligossacarídeos possuindo 4 grupos glicosídicos, a presença de um quinto grupo interfere na catálise diminuindo o valor de  $k_{cat}$ .

Em termos de  $k_{cat}$  podemos observar que a enzima possui a mesma eficiência catalítica para glicosídeos com ligação  $\beta$ -1,3,  $\beta$ -1,4 ou  $\beta$ -1,6, o que diferencia a eficiência catalítica para estes substratos é a afinidade de ligação dos substratos à enzima. Podemos observar que a laminariobiose e gentiobiose possuem  $K_M$  menor que o substrato celobiose. A laminarina demonstrou eficiência catalítica como substrato semelhante à do substrato celobiose, isto ocorre porque a laminarina possui  $K_M$  e  $k_{cat}$  10 vezes menor que o apresentado para celobiose, demonstrando novamente que a proteína deve possuir um sítio catalítico que permita a ligação de substratos maiores.

**Tabela 6:** Parâmetros cinéticos determinados a partir da hidrólise de diversos substratos por Pc $\beta$ Glu1.

Substrato	$K_M$ (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_M$ (S <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )
$\rho$ -Nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo	0.28 $\pm$ 0.01	40.3 $\pm$ 0.4	143.8
Metilumbeliferil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo	0.24 $\pm$ 0.01	26.2 $\pm$ 0.5	109.1
Gentiobiose	0.38 $\pm$ 0.04	18.2 $\pm$ 0.4	48.0
Celobiose	1.7 $\pm$ 0.1	18.4 $\pm$ 0.4	10.8
Celotriose	0.8 $\pm$ 0.1	22.0 $\pm$ 0.8	27.5
Celotetraose	0.42 $\pm$ 0.05	23.5 $\pm$ 0.9	56.0
Celopentaose	0.25 $\pm$ 0.02	22.2 $\pm$ 0.7	88.9
Laminaribiose	0.33 $\pm$ 0.04	19.6 $\pm$ 0.6	59.3
Octil- $\beta$ -glicopiranosídeo	0.54 $\pm$ 0.03	14.4 $\pm$ 0.3	26.7
Laminarina	0.09 $\pm$ 0.01	1.06 $\pm$ 0.04	11.8

Para Pc $\beta$ Glu2, a hidrólise dos substratos gentiobiose, celopentaose e laminarina também apresentou curvas de saturação hiperbólica, com plote de duplo recíproco correspondente linear, demonstrando cinética de Michaelis-Menten.

**Tabela 7:** Parâmetros cinéticos determinados a partir da hidrólise de diversos substratos por PcβGlu2.

Substrato	$K_M$ (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_M$ (S <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )	$K_i$ (mM)
ρ-Nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo	0.072 ± 0.007	1.36 ± 0.03	18.9	2.4 ± 0.2
Metilumbeliferil-β-D-glicopiranosídeo	0.0144 ± 0.0015	1.51 ± 0.06	105.2	0.70 ± 0.08
Gentiobiose	0.64 ± 0.06	0.35 ± 0.01	0.6	-
Celobiose	0.31 ± 0.08	2.09 ± 0.04	6.7	3.3 ± 1.2
Celotriose	0.28 ± 0.07	3.15 ± 0.37	11.2	1.1 ± 0.3
Celotetraose	0.07 ± 0.01	1.56 ± 0.25	22.3	4.3 ± 0.8
Celopentaose	0.62 ± 0.07	0.61 ± 0.02	1.0	-
Laminaribiose	0.42 ± 0.03	1.55 ± 0.06	3.7	10.2 ± 1.3
Octil-β-glicopiranosídeo	0.19 ± 0.03	0.26 ± 0.02	1.4	4.2 ± 0.7
Laminarina	0.027 ± 0.001	1.20 ± 0.02	44.3	-

PcβGlu2 apresentou maior eficiência catalítica para MUβGli e laminarina, pois possui um valor de  $K_M$  bem pequeno para este dois substratos. O valor de  $k_{cat}/K_M$  obtido para pNPβgli foi de 18,9 s<sup>-1</sup>mM<sup>-1</sup>. Os valores da constante de especificidade para o substrato MUβGli para PcβGlu1 e PcβGlu2 são praticamente iguais no entanto, PcβGlu2 possui maior especificidade para MUβGli quando comparado com pNPβGli que PcβGlu1, além disso PcβGlu2 possui constante de especificidade para laminarina 40 vezes maior que PcβGlu1. PcβGlu1 possui eficiência de catálise de pNPβGli 29 vezes maior que a eficiência com que PcβGlu2 hidrolisa este substrato. A constante de especificidade para octilβgli foi de 1,4 s<sup>-1</sup>mM<sup>-1</sup>, o que sugere novamente a preferência da enzima por substratos com a parte aglicona arílica. Dentre a série de oligossacarídeos podemos notar mais diferenças entre as duas proteínas, neste caso PcβGlu2 possui baixa especificidade para celopentaose, pois possui  $K_M$  de 0,62 mM e baixa eficiência catalítica. Esta enzima também possui aumento da especificidade de substrato com o aumento da cadeia glicosídica, neste caso até quatro glicoses. Apesar de o substrato celotetraose se ligar a enzima com uma afinidade muito maior que celotriose e celobiose, o valor de  $k_{cat}$  para celotetraose é menor, a enzima perde eficiência de catálise com a presença de uma quarta molécula de glicose na cadeia. Neste caso PcβGlu1 possui maior eficiência catalítica e maior constante de especificidade (37 vezes) sobre celopentaose que PcβGlu2.

De acordo com os valores obtidos de  $k_{cat}$  podemos observar que a enzima

Pc $\beta$ Glu2 possui eficiência de catálise diferente para substratos em ligação  $\beta$ -1,3,  $\beta$ -1,4 e  $\beta$ -1,6. A especificidade de substrato assim como a eficiência catalítica é maior para celobiose, seguida por laminaribiose e gentiobiose, demonstrando que a enzima possui preferência por ligações  $\beta$ -1,4, seguida por  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6.

De acordo com Singhania et al. (2013), na maioria dos casos  $\beta$ -glicosidases demonstram alta atividade catalítica sobre substratos sintéticos como pNP $\beta$ Gli ou MU $\beta$ Gli em relação a celobiose. A cinética das  $\beta$ -glicosidases depende da configuração do substrato e a celobiose requer uma mudança conformacional para que a catálise ocorra.  $\beta$ -glicosidases apresentam uma estrutura rígida no sítio de ligação ao substrato S1. No caso da celobiose, um dos resíduos de glicose se acomoda no sítio, mas a segunda glicose precisa mudar a conformação utilizando rotação da ligação-sigma do glicosídeo para caber no sítio de ligação do substrato (Nam et al., 2010).

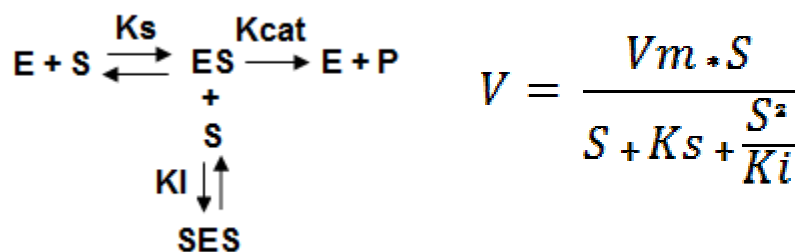
No caso de pNP $\beta$ Gli não é necessário seguir o mesmo modo de ligação da glicose, por isso os valores de  $k_{cat}/K_M$  encontrados para celobiose são mais baixos que os valores encontrados para pNP $\beta$ Gli.

De acordo com os resultados encontrados observamos que Pc $\beta$ Glu2 não seguiu uma cinética Michaeliana para alguns substratos, sendo inibida quando altas concentrações de MU $\beta$ Gli, pNP $\beta$ Gli, celobiose, celotriose, celotetraose, laminaribiose e octil $\beta$ Gli são utilizadas (exemplo na Figura 30). A inibição pode ter sido causada pela ligação de uma segunda molécula no sítio catalítico ou pode ser um artefato causado pela reação dos produtos com as moléculas de substrato, a transglicosilação. Neste caso as moléculas de substratos devem ter um resíduo de glicose na extremidade para serem aceptoras na reação de transglicosilação, no lugar da molécula de água. De acordo com Yagi e Tadera (1996), na transglicosilação a formação do oligossacarídeo depende da partição do intermediário enzima-glicosídeo entre a reação hidrolítica e transglicosídica. Se o tempo de reação é longo e/ou a concentração da enzima é alta a hidrólise dos oligossacarídeos ocorre. Diversos trabalhos já relataram a atividade de transglicosilação de algumas  $\beta$ -glicosidases. Kongsaree et al. (2010) descreveram atividade de transglicosilação de uma dalcoquinase de *Dalbergia cochinchinensis* Pierre utilizando alcoóis primários e secundários como aceptores e de uma linamarase de *Manihot esculenta* Crantz utilizando alcoóis primários, secundários e terciários.

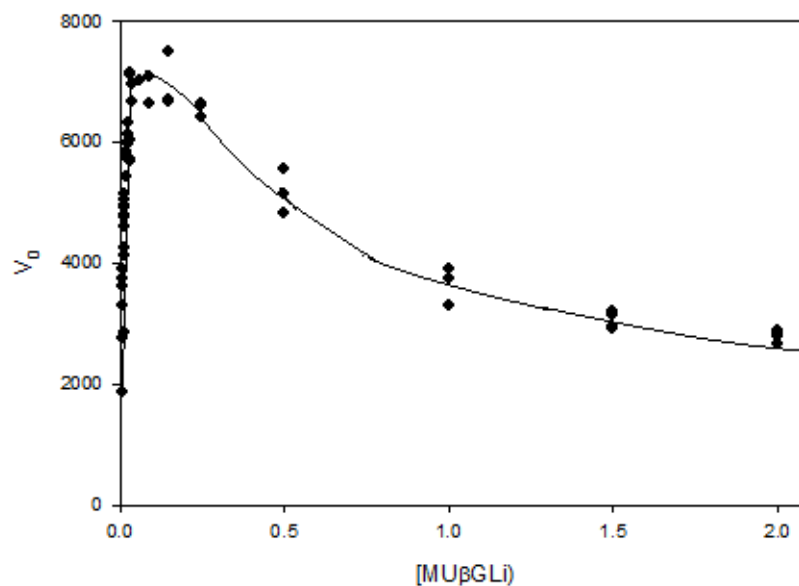
Neste caso as enzimas hidrolisam pNPβGli para formação de um intermediário enzima-glicosídeo e transfere a glicose para um álcool aceptor, formando alquilglicosídeos. Christakopoulos et al. (1994) descreveram a síntese de trioses a partir de celobiose e gentiobiose utilizando β-glicosidasas de *Fusarium oxysporum*. Yagi e Tanderá (1996) descreveram a atividade de transglicosilação de β-glicosidase de cicadáceas utilizando diglicosídeos e diglicose-azoglicosídeos como aceptores. Experimentos com a utilização de cromatografia em camada delgada ou HPLC devem ser utilizados para confirmar a transglicosilação.

Os valores de  $K_I$  encontrados para estes substratos estão descritos na tabela 7. O substrato MUβGli e celotriose apresentaram menores valores de  $K_I$  de 0,7 e 1,1 mM, mostrando que estes começam a inibir a enzima quando se encontram em uma concentração menor que laminariobiose, ou que estes são melhores aceptores na reação de transglicosilação. A laminariobiose foi o substrato que apresentou menor efeito de inibição por substrato com  $K_I$  de 10,2 mM. O restante dos substratos apresentaram valores de  $K_I$  na faixa de 2 a 4 mM.

O equilíbrio que explica os resultados quando levamos em conta a ligação de uma segunda molécula de substrato e que leva ao melhor ajuste experimental dos dados teóricos das curvas está representado abaixo (Figura 29) pela equação de velocidade:



**Figura 29:** Sistema de equilíbrio utilizado para descrever a inibição pelo substrato.



**Figura 30:** Hidrólise de MUβGli por PcβGlu2 em diferentes concentrações de substratos.

De acordo com o modelo apresentado, o complexo enzima-substrato é capaz de se ligar a outra molécula de substrato quando este se encontra em altas concentrações formando um complexo ternário inativo (ES<sub>2</sub>). Esta segunda molécula de substrato pode se ligar ao sítio catalítico impedindo ou diminuindo a hidrólise da molécula que se encontra ligada no sítio ativo.

De acordo com Riou et al. (1998), a inibição causada pelo substrato é uma propriedade comum de β-glicosidases. A β-glicosidase de *A. oryzae*, não foi inibida na presença de 50 mM de pNPβGli, no entanto na presença de 15 % de laminaribiose, gentiobiose, celobiose e maltose, a hidrólise reduziu-se a 50 % da taxa inicial de reação. De acordo com Saha et al. (1996), a inibição por substrato causada por celobiose é uma propriedade comum de β-glicosidase de *Trichoderma spp.* e outros microrganismos.

Resultado semelhante ao encontrado para  $K_M$  de celobiose hidrolisado por PcβGlu1 foi encontrado para β-glicosidase de *Stachybotrys microspora* que apresentou  $K_M$  de 1,9 mM, para pNPβgli o  $K_M$  foi de 0,9 mM (Saibi et al., 2011).

De acordo com Yang et al. (2008) a β-glicosidase de *P. termophila* é efetivamente ativa sobre pNPβGli, celobiose, gentiobiose, sofrorose, amidalina e salicilina, com  $K_M$  de 0,26, 0,65, 0,77, 1,06, 145 e 1,39 mM respectivamente. A cinética



de hidrólise dos substratos indicam que a enzima é mais específica para pNPβGli que para dissacarídeos como celobiose, gentiobiose e sofrorose.

Harnpicharnchai et al. (2009), demonstraram que a β-glicosidase recombinante do fungo endofítico *Periconia sp.*, possui preferência de hidrólise para pNPβGli, celobiose e metilumbeliferil-β-celobiosídeo, com  $K_M$  de 0,19, 0,5 e 0,04 mM respectivamente. Esta enzima também demonstrou capacidade de hidrólise de pNPαGli, pNPβxilopiranosídeo e pNPβfucopiranosídeo.

β-glicosidase de *P. decumbens* apresentou  $K_M$  de 0,019 mM para o substrato salicilina e de 0,0064 mM sobre pNPβGli, possuindo esta enzima uma alta afinidade pelo extrato salicina, comparado com resultados obtidos anteriormente (Chen et al., 2010). β-glicosidase de *P. pinophilum*, no entanto apresentou  $K_M$  de 5,6 mM para o substrato pNPβGli (Joo et al., 2010).

Resultados obtidos para eficiência catalítica de um β-glicosidase *T. thermophilus* com atividade de galactosidase, demonstrou que os glicopiranosídeos são melhores substratos que galactopiranosídeos para esta enzima. Os valores de  $k_{cat}/K_M$  foram 257, 29, 12, 4,4 s<sup>-1</sup>mM<sup>-1</sup>, para os substratos oNPβGli, celobiose, oNPGal e lactose, respectivamente. Estes resultados ocorrem devido ao baixo  $K_M$  encontrado para os glicosídeos em relação aos galactosídeos (Nakkharat et al., 2006).

β-glicosidase de *Stereum hirsutum* possui maior preferência para substratos arilglicosídicos que para substratos naturais, apresentando  $K_M$  de 2,5 mM e  $k_{cat}$  de 5 s<sup>-1</sup> para pNPβgli e  $K_M$  de 86 mM e  $k_{cat}$  281 s<sup>-1</sup> para o substrato celobiose. As análises demonstram que esta glicosidase possui afinidade 34 vezes maior para pNPβgli e é capaz de hidrolisar pNPβgli 18 vezes mais rápido que celobiose (Nguyen et al., 2010).

Os parâmetros cinéticos para os substratos celobiose e pNPβGli foram determinados para β-glicosidase de *P. italicum*. Os plotes de Lineweaver-Burk indicaram que o  $K_M$  para pNPβGli e celobiose foram de 0,11 e 0,41 mM, respectivamente. Os valores de eficiência catalítica foram de 15,8 e 6,4 s<sup>-1</sup>mM<sup>-1</sup> para pNPβGli e celobiose. Os resultados demonstram que a enzima é capaz de hidrolisar celobiose com alta eficiência catalítica (Park et al., 2012).

Parry et al. (2001) determinaram os parâmetros cinéticos para hidrólise de arilglicosídeos e dissacarídeos, para β-glicosidase de *T. aurantiacus*. A enzima

apresentou o menor valor de  $K_M$  para pNP $\beta$ Gli (0,11 mM) e o maior para sofrorose (1,34 mM). Trealose e celobiose possuíram os maiores valores de  $k_{cat}$ . E a eficiência catalítica para hidrólise de  $\beta,\beta$ -trealose ( $39 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ) e celobiose ( $26,7 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ) foi menor que a eficiência de hidrólise de pNP $\beta$ Gli ( $127,8 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ). A eficiência de hidrólise de pNP $\beta$ Gli foi 2 vezes maior que a encontrada para oNP $\beta$ Gli ( $56,4 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ) e octil $\beta$ gli ( $51,8 \text{ min}^{-1} \text{mM}^{-1}$ ).

#### **5.4.2 Inibição por Celobiose e Glicose**

O efeito de inibição causado pela adição de glicose e celobiose ao meio de reação contendo Pc $\beta$ Glu1 e Pc $\beta$ Glu2 e pNP $\beta$ Gli como substrato foi avaliado conforme descrito no item 4.12.2.

Estudos de inibição frequentemente indicam algo com relação à especificidade de uma enzima, à arquitetura química e física do sítio ativo e ao mecanismo cinético de reação. Diversos inibidores para uma enzima podem ser encontrados como drogas, toxinas, antibióticos e venenos. Algumas enzimas sofrem retroinibição e podem ser inibidas pelo próprio produto da reação. Estudar o efeito de inibição de celobiose e glicose sobre a atividade  $\beta$ -glicosidase é de extrema importância, principalmente para o uso dessas enzimas em aplicações biotecnológicas. Em processos de hidrólise enzimática de biomassas, por exemplo, a celobiose gerada no meio como produto da ação de celobiohidrolases e a glicose gerada pela hidrólise de celobiose podem atuar como inibidores da atividade de  $\beta$ -glicosidases, diminuindo a eficiência de hidrólise.

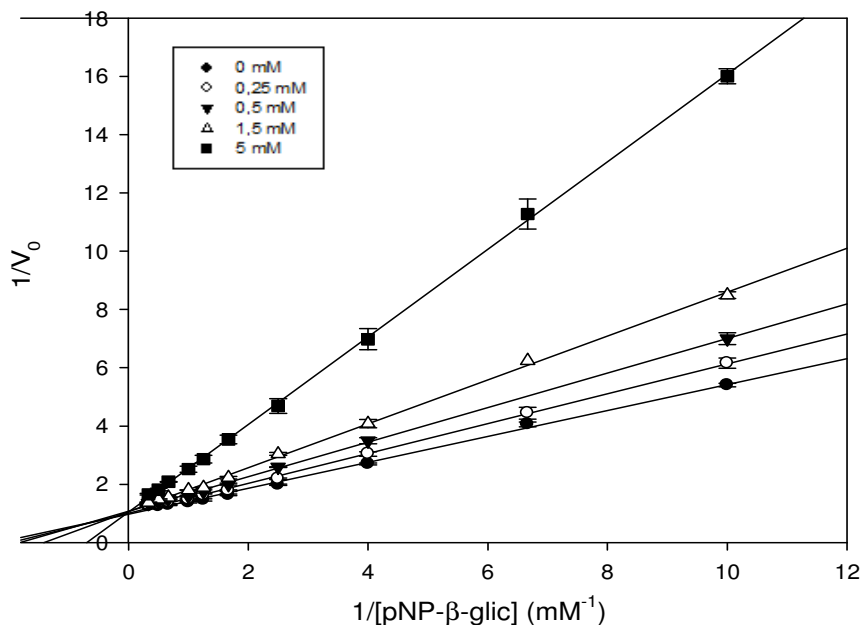
As curvas de Michaelis-Menten obtidas para as diferentes concentrações de inibidores assim como os perfis dos plotes de Lineweaver-Burk, demonstraram que, quando utilizamos glicose como inibidor, Pc $\beta$ Glu1 e Pc $\beta$ Glu2 são inibidas competitivamente. A partir do replote da inclinação das retas obtidas no plote de Lineweaver-Burk versus concentração do inibidor podemos obter o valor de  $K_I$ . Quanto menor o valor de  $K_I$ , maior o grau de inibição a uma dada concentração de substrato e inibidor.

A inibição competitiva é caracterizada pela ligação do inibidor no sítio ativo da enzima, esta situação faz com que a enzima complexada ao inibidor não seja capaz de se ligar ao substrato. Neste tipo de inibição a  $V_{max}$  permanece constante, no entanto, o

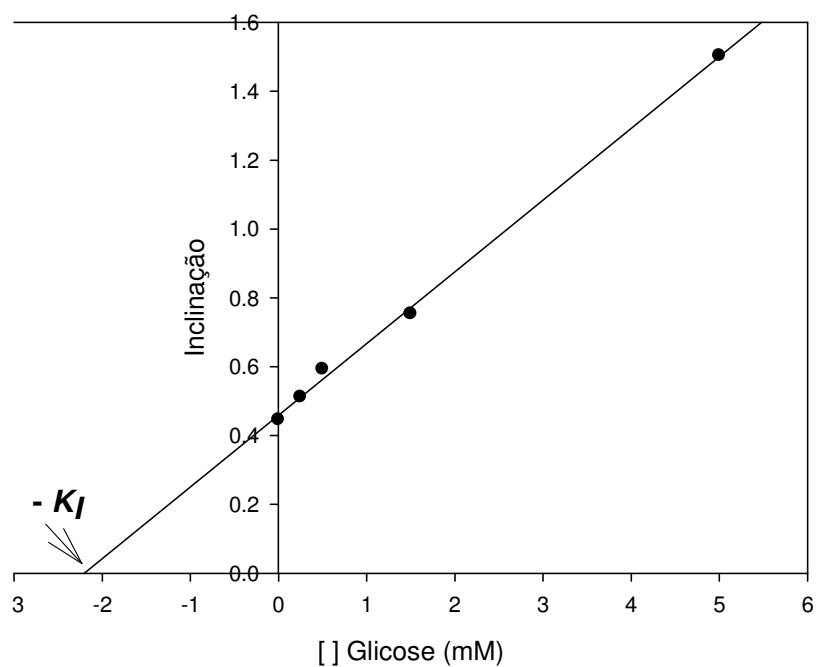
valor de  $K_M$  aumenta ( $K_M$  aparente) com o aumento de inibidor no meio, como se o inibidor diminuísse a afinidade da enzima pelo substrato.

De acordo com a tabela 8 podemos observar que o grau de inibição de P $\beta$ Glu2, quando utilizamos glicose, foi maior que a inibição causada em P $\beta$ Glu1. O valores de  $K_I$  foram determinados em 3,89 e 0,89 mM para P $\beta$ Glu1 e P $\beta$ Glu2 respectivamente.

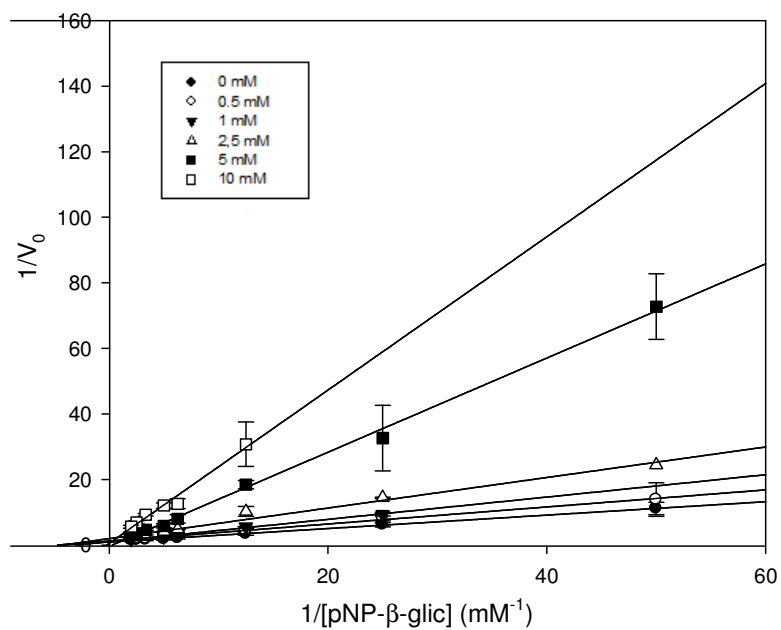
De acordo com Cairns e Esen (2010),  $\beta$ -glicosidases são inibidas pelo estado de transição de análogos de açúcares, análogos de substratos glicosídicos e agliconas livres de seus substratos, assim como substratos pouco hidrolisados. Como as agliconas e os bolsos de ligação à parte glicona do sítio ativo são distintos, análogos de açúcares dobrados na conformação de meia cadeira no estado de transição podem se ligar ao sítio de ligação a parte glicona e inibir a enzima, enquanto agliconas livres se ligam ao sítio de ligação a parte aglicona. Ainda de acordo com estes autores agliconas livres podem ser melhores inibidores que a glicose pois esta necessita ser distorcida na conformação de meia cadeira para se ligar ao sítio de ligação a glicona, requerendo energia.



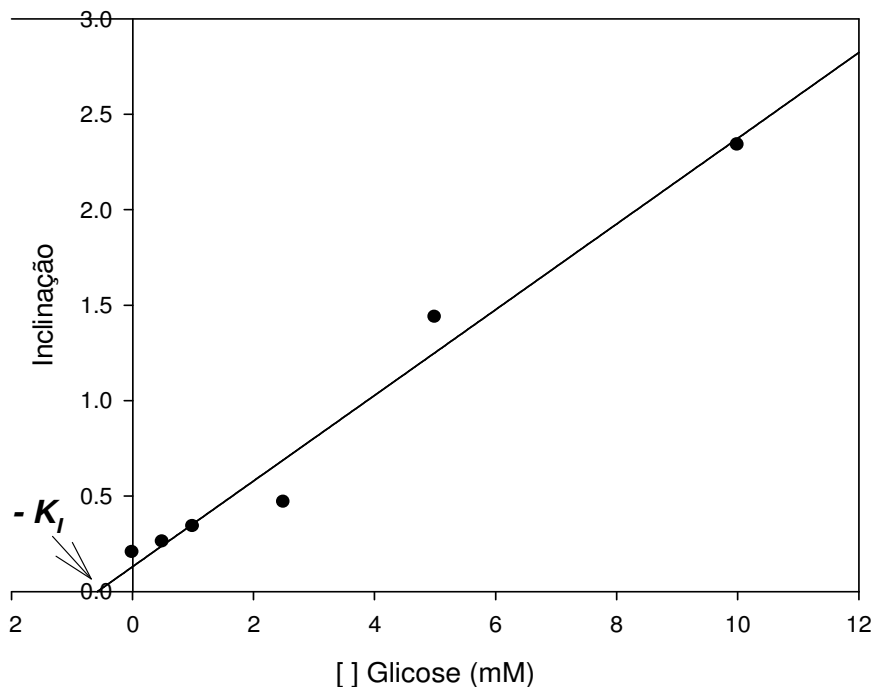
**Figura 31:** Plote de Lineweaver–Burk para inibição de P $\beta$ Glu1 por glicose utilizando pNP $\beta$ Gli como substrato. Para determinação de  $K_I$  a concentração de glicose variou de 0 a 5 mM.



**Figura 32:** Plote de inclinações obtido a partir do plote de Lineweaver-Burk para determinação de  $K_I$  de Pc $\beta$ Glu1 por glicose.



**Figura 33:** Plote de Lineweaver–Burk para inibição de Pc $\beta$ Glu2 por glicose utilizando pNP $\beta$ Gli como substrato. Para determinação de  $K_I$  a concentração de glicose variou de 0 a 10 mM.



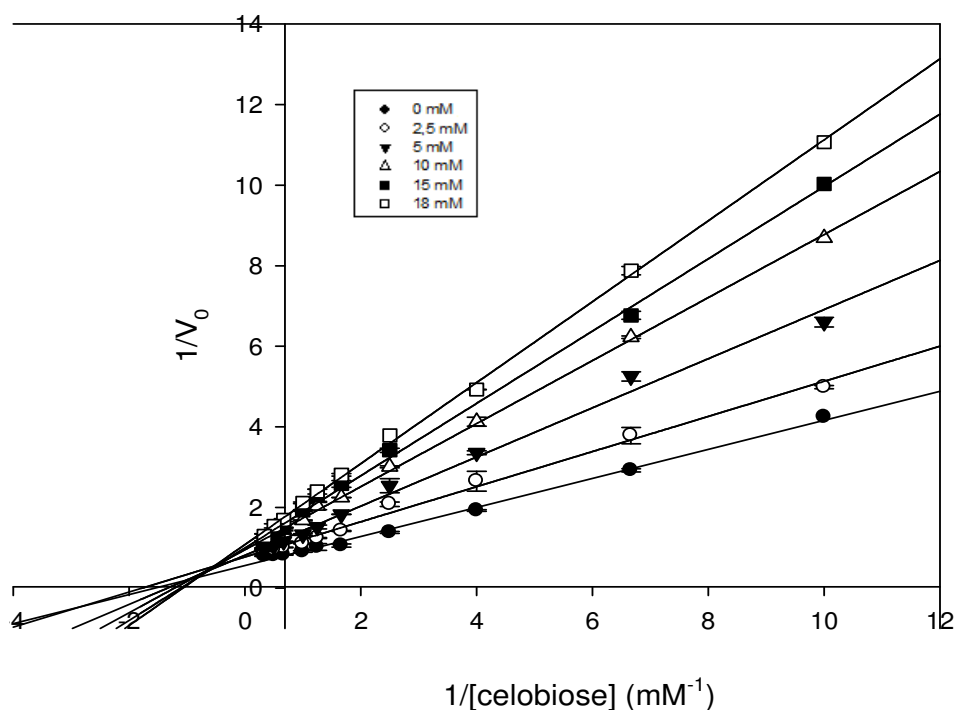
**Figura 34:** Plote de inclinações obtido a partir do plote de Lineweaver-Burk para determinação de  $K_I$  de Pc $\beta$ Glu2 por glicose.

As curvas de Michaelis-Mentem obtidas para as diferentes concentrações de inibidores assim como os perfis dos plotes de Lineweaver-Burk, demonstraram que, quando utilizamos celobiose como inibidor, Pc $\beta$ Glu1 e Pc $\beta$ Glu2 são inibidas não-competitivamente, em um tipo de inibição caracterizada como mista linear. A inibição mista linear indica que a ligação do substrato e do inibidor não são mutuamente exclusivas. A partir do replote da inclinação e da intercepção das retas obtidas no plote de Lineweaver-Burk versus concentração do inibidor podemos obter o valor de  $K_I$  e de  $\alpha$ .

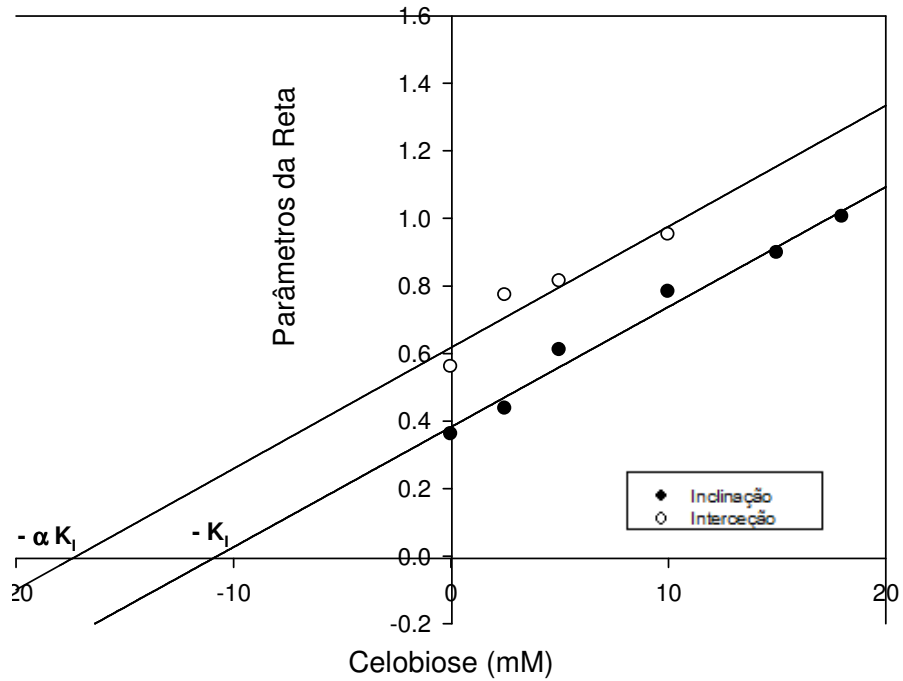
A inibição mista linear é caracterizada pela ligação do inibidor em um sítio próximo ao sítio ativo da enzima, impedindo a ligação da molécula de substrato, ou o inibidor pode se ligar a outro sítio distante do sítio ativo da enzima causando alteração na conformação da enzima o que faz com que esta não ligue mais o substrato com a mesma afinidade no sítio ativo. Neste tipo de inibição o complexo ESI é cataliticamente inativo e a presença do inibidor modifica a constante de dissociação do complexo enzima-substrato (ES) por um fator  $\alpha$ , assim o valor de  $K_M$  aumenta ( $K_M$  aparente) e

diminui a  $V_{max}$ .

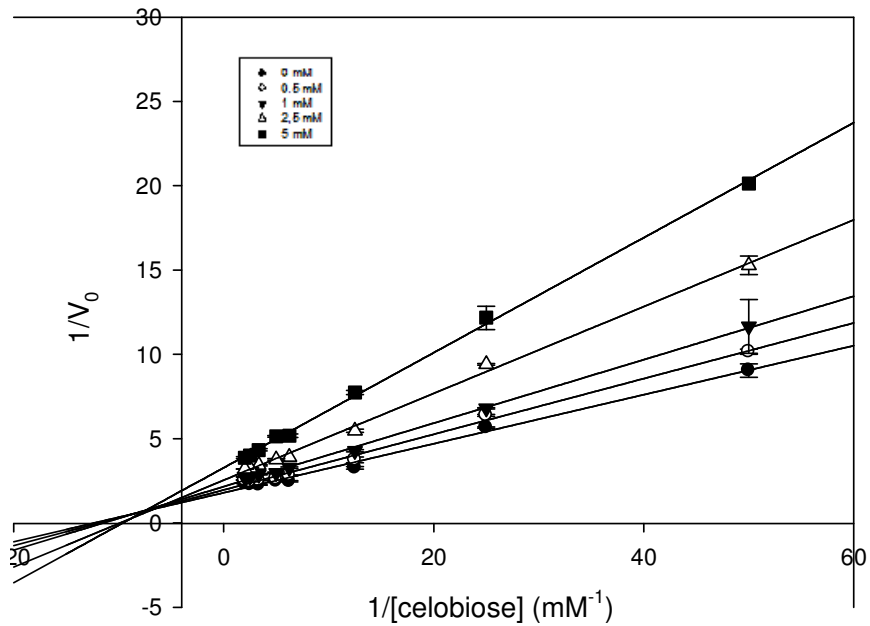
De acordo com a Tabela 8 podemos observar que PcbGlu1 e PcbGlu2 apresentaram diferentes graus de inibição quando utilizamos celobiose. Os valores de  $K_I$  foram determinados em 10,7 mM e 3,74 mM para PcbGlu1 e PcbGlu2, respectivamente. Sendo o valor da constante de dissociação do complexo ES para PcbGlu1 alterado por um fator  $\alpha=8$  e PcbGlu2 por um fator  $\alpha= 2,5$ , o que indica nos dois casos uma maior afinidade do inibidor pela enzima livre do que pelo complexo enzima-substrato. Os valores de  $K_I$  encontrados são diferentes dos valores encontrados para  $K_M$  quando utilizamos celobiose como substrato, o que indica que quando utilizamos esta como inibidor ela se liga em um sítio diferente do sítio de ligação do substrato, o que é coerente com o modelo de inibição mista linear.



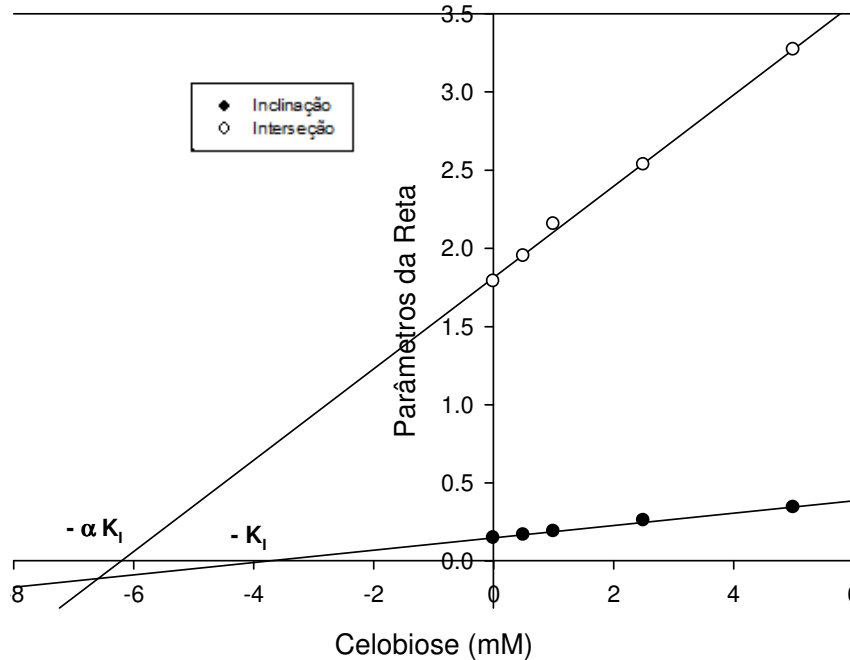
**Figura 35:** Plote de Lineweaver–Burk para inibição de PcbGlu1 por celobiose utilizando pNPβGli como substrato. Para determinação de  $K_I$  a concentração de celobiose variou de 0 a 18 mM.



**Figura 36:** Plote dos parâmetros da reta obtidos a partir do plote de Lineweaver-Burk para determinação de  $K_i$  e  $\alpha$  para inibição de PcβGlu1 por celobiose.



**Figura 37:** Plote de Lineweaver-Burk para inibição de PcβGlu2 por celobiose utilizando pNPβGli como substrato. Para determinação de  $K_i$  a concentração de celobiose variou de 0 a 5 mM.



**Figura 38:** Plote dos parâmetros da reta obtidos a partir do plote de Lineweaver-Burk para determinação de  $K_i$  e  $\alpha$  para inibição de Pc $\beta$ Glu2 por celobiose.

**Tabela 8:** Parâmetros e tipos de inibição determinada quando glicose e celobiose são utilizadas como inibidores de Pc $\beta$ Glu1 e Pc $\beta$ Glu2, utilizando pNP $\beta$ Gli como substrato.

Proteína	Tipo Inibição	Inibidor	$K_i$ (mM)	$\alpha$
Pc $\beta$ Glu1	Competitiva	Glicose	$1.89 \pm 0.08$	-
	Mista Linear	Celobiose	$10.7 \pm 0.1$	8
Pc $\beta$ Glu2	Competitiva	Glicose	$0.88 \pm 0.08$	-
	Mista Linear	Celobiose	$3.74 \pm 0.07$	2.5

$\beta$ -glicosidases lisossomais ácidas (glicosilcerebrosidases) já foram caracterizadas com um tipo de inibição mista linear por galactosilesfingosinas. Radin et al. (1975) e LaMarco e Glew (1984) sugerem que nesta enzima o segundo sítio de ligação ao inibidor, pode ter resultado de uma duplicação gênica parcial do sítio ativo da enzima e que com as modificações evolutivas a atividade catalítica foi perdida enquanto o sítio de ligação ao substrato foi preservado.

A inibição do tipo mista linear também foi descrita para uma  $\beta$ -glicosidase de *A.*



*ornatus* utilizando glucono- $\delta$ -lactona como inibidor (Yeoh et al., 1986).

Duas  $\beta$ -glicosidases secretadas por *Penicillium occitanis*, foram testadas quanto a inibição por glicose e glucono- $\delta$ -lactona. As duas enzimas foram inibidas competitivamente e apresentaram o mesmo valor de  $K_i$ , sendo de 1 mM para glicose e 0,03 mM glucono- $\delta$ -lactona (Bhiri et al., 2008). A enzima de *T. aurantiacus* mostrou-se fortemente inibida por glucono- $\delta$ -lactona apresentando  $K_i$  de 8,3 nM (Parry et al., 2001).

Seidle et al. (2006) demonstraram inibição de uma  $\beta$ -glicosidase por glicose, celobiose, glucono- $\delta$ -lactona e gentiobiose, com  $K_i$  de 3,0, 1,8, 0,4 e 4,8 mM, demonstrando que glucono- $\delta$ -lactona é o inibidor mais forte.

Chauve et al. (2010) determinaram o efeito de inibição por glicose sobre uma  $\beta$ -glicosidase de *T. reesei* e outra de *A. Niger*, utilizando pNP $\beta$ Gli como substrato. Os resultados demonstraram que a enzima secretada por *T. reesei* é menos inibida por glicose que a enzima de *A. Niger*, com  $K_i$  de 3,25 e 2,70 mM.

Uma  $\beta$ -glicosidase de *S. hirsutum* apresentou  $K_i$  de 29 mM para inibição competitiva por glicose utilizando pNP $\beta$ Gli como substrato (Nguyen et al., 2010) e a  $\beta$ -glicosidase de *P. pinophilum* foi inibida competitivamente por glicose com  $K_i$  de 26,6 mM (Joo et al., 2010).

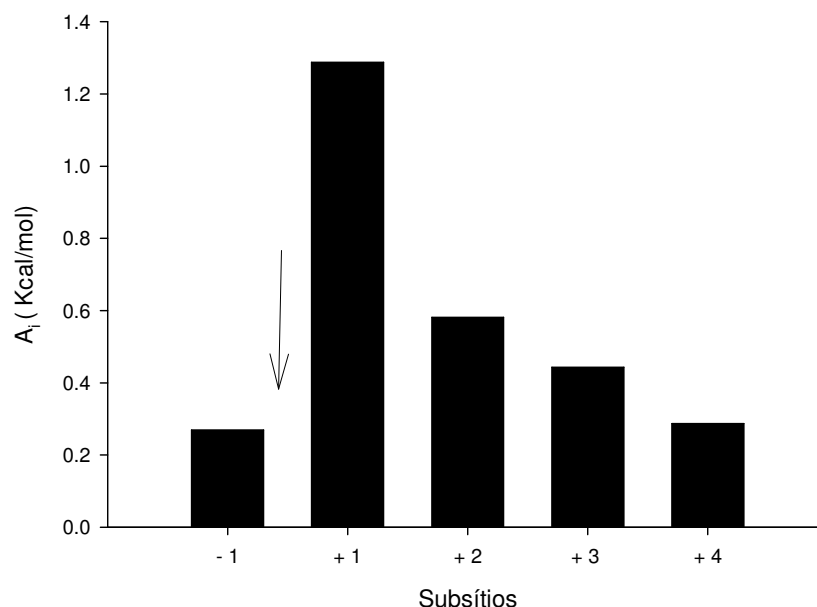
O trabalho de Park et al. (2012) demonstrou inibição não-competitiva de uma  $\beta$ -glicosidase de *P. italicum* por glicose e glucono- $\delta$ -lactona quando pNP $\beta$ Gli é utilizado como substrato, com valores de  $K_i$  de 8,9 e 11,3 mM respectivamente. O resultado indica que a glicose é um inibidor mais forte que a glucono- $\delta$ -lactona. De acordo com os autores este foi o primeiro trabalho a demonstrar  $\beta$ -glicosidases inibidas não-competitivamente. Na inibição não-competitiva o inibidor se liga em um sítio diferente do sítio ativo.

A presença de celobiose inibiu competitivamente a hidrólise de pNP $\beta$ Gli por uma  $\beta$ -glicosidase de *S. thermophilum* com  $K_i$  de 1,32 mM, sugerindo que o substrato sintético e o natural são hidrolisados no mesmo sítio catalítico (Zanoelo et al., 2004).

### 5.4.3 Afinidade Subsítios

Na degradação de substratos poliméricos por hidrolases, é observado que a Constante de Michaelis ( $K_M$ ) e a velocidade máxima ( $V_{max}$ ) estão inteiramente ligadas ao grau de polimerização dos substratos ( $dp$ ) (Im, Henson, 1995). De acordo com a teoria dos subsítios, o sítio ativo destas enzimas consiste em um número definido de subsítios e cada um possui afinidade e interação de maneira diferente com o substrato. Esta teoria também propõe que a taxa de hidrólise intrínseca do substrato ( $k_{int}$ ), quando este está em um complexo enzima-substrato produtivo, é constante e independente do grau de polimerização do substrato. A dependência aparente de  $V_{max}$  com  $dp$  ocorre somente devido a probabilidade de formação de complexos produtivos, que é determinada pelo arranjo das afinidades de subsítios no sítio ativo da enzima ( $A_i$ ; onde  $i$ =número subsítio). Os valores de  $K_M$  observados são menores que os valores da constante de dissociação de complexos enzima-substrato produtivos por causa da existência de modos de ligação não produtivos. As constantes de dissociação de complexos produtivos e não produtivos, podem ser atribuídas à soma das afinidades dos subsítios ocupados em cada modo de ligação para cada substrato. O valor de  $k_{cat}/K_M$  pode ser utilizado para determinar as afinidades de subsítios utilizando substratos lineares com diferentes graus de polimerização (Hiromi et al., 1973).

Os subsítios foram numerados como descrito no item 4.12.3, de acordo com Davies et al. (1997). Os valores experimentais obtidos de  $k_{cat}/K_M$  permitem o cálculo de afinidade de subsítios para Pc $\beta$ Glu1 e Pc $\beta$ Glu2. Para Pc $\beta$ Glu1 podemos observar que o sítio catalítico se encontra entre os subsítios -1 e +1, como esperado, pois esta enzima cliva seu substrato a partir da extremidade não-redutora. O subsítio que apresenta o maior valor de afinidade é  $A_{+1}$  e o valor diminui em direção à extremidade redutora, com o aumento da distância em relação ao sítio catalítico. Nenhum subsítio apresentou valor negativo de afinidade, demonstrando que os subsítios são efetivos na ligação do substrato. O valor obtido para  $A_{+1} = 1,29$  Kcal/mol é comparável ao valor obtido para afinidade de ligação molecular da glicose,  $B_G = 2,00$  Kcal/mol, obtida a partir da constante de inibição  $K_i$ , e esta similaridade sugere que a glicose se liga aos segundo subsítio quando inibe a proteína.



**Figura 39:** Histograma demonstrando afinidade de subsítios de PcβGlu1 de *P. chrysogenum* por resíduos glicosil em oligocelodextrinas. A seta indica a posição da ligação glicosídica hidrolisada.

**Tabela 9:** Valores de afinidades para resíduos glicosil de subsítios  $A_i$  e  $k_{int}$  para PcβGlu1 a 40 °C e pH 5,0, usando oligocelodextrinas como substratos.

Subsítio (i)	-1	+1	+2	+3	+4
Afinidade Subsítio ( $A_i$ )	$A_{-1}$	$A_{+1}$	$A_{+2}$	$A_{+3}$	$A_{+4}$
$A_i$ (Kcal/Mol)	0.27	1.29	0.58	0.44	0.29
$k_{int}$ ( $S^{-1}$ )	49.2				

A constante intrínseca de hidrólise da ligação de um substrato em um complexo produtivo ( $k_{int}$ ) foi de  $49,2 \text{ s}^{-1}$ , este valor foi maior que o maior valor de  $k_{cat}$  encontrado para celotetraose ( $23,5 \text{ s}^{-1}$ ), indicando que a contribuição de complexos não produtivos estão envolvidos, podendo levar a inibição por substrato. Além disso, o valor da afinidade de  $A_{-1}$  é menor que a afinidade para os sítios  $A_{+2}$  e  $A_{+3}$ , indicando novamente a presença de modos não produtivos de ligação. Os valores obtidos para  $k_{cat}/K_M$  teóricos calculados a partir dos dados de afinidade apresentam um desvio muito pequeno em relação ao valores obtidos, como pode ser observado na tabela 10,

demonstrando a teoria de que  $k_{int}$  é independente do grau de polimerização dos substratos, ou seja cada subsítio possui sua própria afinidade para cada resíduo de glicose presente no polímero de glicose e não existe interação entre estes subsítios e que os valores de  $A_i$  são aditivos, é válida para Pc $\beta$ Glu1.

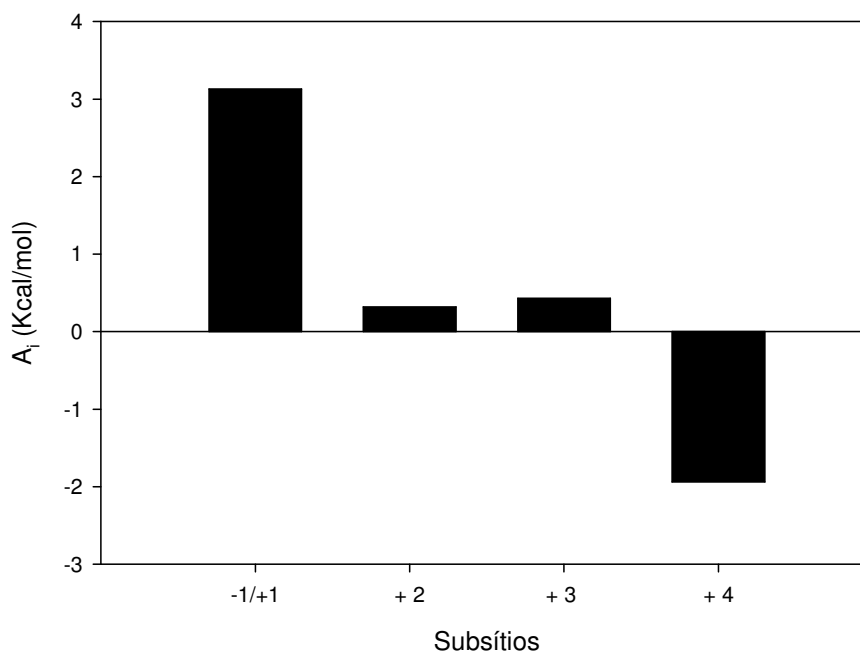
**Tabela 10:** Comparação entre parâmetros experimentais e teóricos de Pc $\beta$ Glu1 de *P. chrysogenum*.

Substrato	$k_{cat}/K_M$ ( $S^{-1}mM^{-1}$ )		Taxa (Exp/Teo)
	Experimental	Teórico	
Celobiose	10.8288	10.8046	1.0022
Celotriose	27.4691	27.5117	0.9985
Celotetraose	56.0244	56.0238	1.0000
Celopentaose	88.9377	88.9377	1.0000

Para Pc $\beta$ Glu2 a afinidade de ligação molecular para celatetraose foi de  $B_{C4,app}$ = 4,05 Kcal/mol, e para celobiose foi de  $B_{C2,app}$ = 3,13 Kcal/mol, se calcularmos o valor teórico de  $B_{C2,app}$  utilizando o valor de  $B_{C4,app}$  e as afinidade dos sítios +2 e +3, encontraremos um valor de 3,31 Kcal/mol, o que indica que modos não produtivos de ligação não estão afetando os valores de  $K_M$  encontrados e portanto a afinidade de ligação molecular para celobiose pode ser representada pela soma das afinidades dos subsítios  $A_{-1}+ A_{+1}$ . Assim o sítio catalítico também se encontra entre os sítios +1 e -1, como pode ser notado a soma das afinidades destes subsítios é maior que a afinidade encontrada para os outros subsítios.

Os subsítios que apresentam o maior valor de afinidade são  $A_{-1}+A_{+1}$  e o valor diminui em relação a extremidade redutora para n igual 3, tendo um pequeno incremento no subsítio +3 e valor negativo no sítio +4. Para Pc $\beta$ glu2,  $k_{int}$  não pode ser determinada. O valor de  $K_M$  é decrescente com os substratos, C2, C3, e C4 respectivamente, sugerindo que esta enzima possui quatro subsítios que se ligam à resíduos de glicose, em acordo com os valores de afinidade positivos encontrados nos sítios -1, +1, +2 e +3 e o valor negativo encontrado no sítio hipotético +4. O valor negativo encontrado para  $A_{+4}$  pode também indicar que esse subsítio não é efetivo na ligação ao substrato, devido à presença de mais ligações não específicas que

específicas neste subsítio.



**Figura 40:** Histogramas demonstrando afinidade de subsítios de PcβGlu2 de *P. chrysogenum* por resíduos glicosil em oligocelodextrinas.

**Tabela 11:** Valores de afinidades de subsítios  $A_i$  para PcβGlu2 a 40 °C e pH 5,0, utilizando oligocelodextrinas como substrato.

Subsítio (i)	-1	+1	+2	+3	+4
Afinidade Subsítio ( $A_i$ )	$A_{-1} + A_{+1}$		$A_{+2}$	$A_{+3}$	$A_{+4}$
$A_i$ (Kcal/Mol)	3,13		0,32	0,43	-1,94

Alguns dados estão disponíveis relatando que a afinidade nos subsítios -1 e +1 de exo-glicosidases são positivas enquanto nas posições +2 e +3, são menos positivas ou próximas de zero (Yazaki et al., 1997; Chiba, 1997).

Yazaki et al. (1997) estudaram os subsítios de uma β-glicosidase de *A. Niger* e de uma β-glicosidase da levedura *Candida wickerhamii*. As afinidades para os subsítios -1, +1 e +2 são maiores que as afinidades encontradas para os subsítios +3, +4 e +5 para as duas enzimas. E as afinidades de subsítios para as enzimas da levedura são menores que os encontrados para a enzima de *A. Niger*, demonstrando que esta é uma

enzima mais efetiva na hidrólise de oligossacarídeos.

Ferreira et al. (2001) caracterizaram o subsítio de uma  $\beta$ -glicosidase de *Tenebrio molitor*. De acordo com os autores todos os subsítios apresentam afinidade por glicose, exceto o subsítio +4. A constante catalítica intrínseca encontrada foi de  $21,2 \text{ s}^{-1}$ . Ainda segundo os autores o subsítio +2 possui maior afinidade para compostos hidrofóbicos do que para resíduos de glicose.

## 5.5 Hidrólise Enzimática

Atualmente a conversão de biomassa celulósica para produção de bioetanol possui grandes desafios econômicos e tecnológicos, e o sucesso deste processo depende do desenvolvimento de um processo de hidrólise altamente eficiente.

A conversão efetiva de celulose em açúcares fermentáveis requer ação de três classes de enzimas, as endoglucanases (EC 3.2.1.4) que clivam a cadeia de celulose randomicamente gerando celooligossacarídeos, exoglucanases (EC 3.2.1.91) que atuam exoliticamente na extremidade redutora ou não-redutora da cadeia de celulose liberando celobiose e  $\beta$ -glicosidases (EC 3.2.1.21) que hidrolisam celulose e celooligossacarídeos a glicose. A atividade de  $\beta$ -glicosidase no processo de conversão é de extrema importância, para retirada de celobiose do meio, pois esta pode inibir a atividade de endoglucanases e exoglucanases, inviabilizando o processo (Ng et al., 2011). Artigos recentes também demonstraram que a diminuição da porcentagem de conversão da biomassa em açúcares fermentáveis está relacionada com a inibição de endoglucanases e exoglucanases por açúcares de 4 e 5 carbonos (Ximenes et al., 2010). Este fato torna as enzimas secretadas por *P. chrysogenum* fortes candidatas a hidrolisar eficientemente biomassas. Como observamos pelos valores de  $k_{cat}$  e afinidades de subsítios encontrados, estas enzimas são capazes de hidrolisar celooligossacarídeos com alta eficiência catalítica.

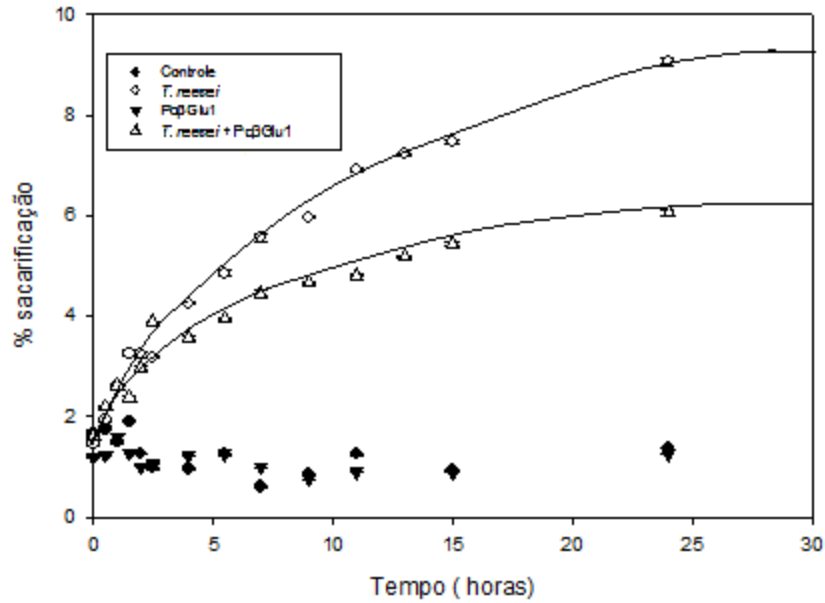
Celulases de *T. reesei* tem recebido muita atenção devido a sua capacidade de hidrolisar celulose microcristalina eficientemente. Este fungo secreta diversas celulases, no entanto o coquetel é deficiente em atividade de  $\beta$ -glicosidase. Assim para eficientemente hidrolisar celulose a açúcares fermentáveis, a complementação com  $\beta$ -

glicosidase é necessária.

Assim avaliamos a suplementação de um coquetel enzimático de *T. reesei* com as  $\beta$ -glicosidases secretadas por *P. chrysogenum*, para incremento da porcentagem de açúcar total hidrolisado. Para os ensaios de hidrólise utilizamos três biomassas coloidais com composições diferentes, o bagaço de cana, folha de bananeira e fibra de coco, tendo esta última uma maior porcentagem de lignina em relação as duas primeiras. Aos ensaios adicionamos 7 CBU/g de biomassa para o coquetel de *T. reesei* e testamos a complementação com 10 CBU/g de biomassa das  $\beta$ -glicosidases purificadas de *P. chrysogenum*. A hidrólise foi avaliada por 24 h. Curvas foram ajustadas aos gráficos apenas para avaliar a tendência de hidrólise.

Uma das maiores preocupações quando utilizamos substratos sintéticos ou comerciais para testar a capacidade de hidrólise de enzimas é que eles não refletem necessariamente a atividade destas sobre fontes lignocelulósicas. O uso de substratos naturais é dificultado pela presença de partículas insolúveis. As biomassas coloidais são preparadas utilizando pré-tratamentos mínimos do material bruto (Lucena et al., 2011) e o substrato formado é homogêneo, facilitando o rastreamento de atividades hidrolíticas.

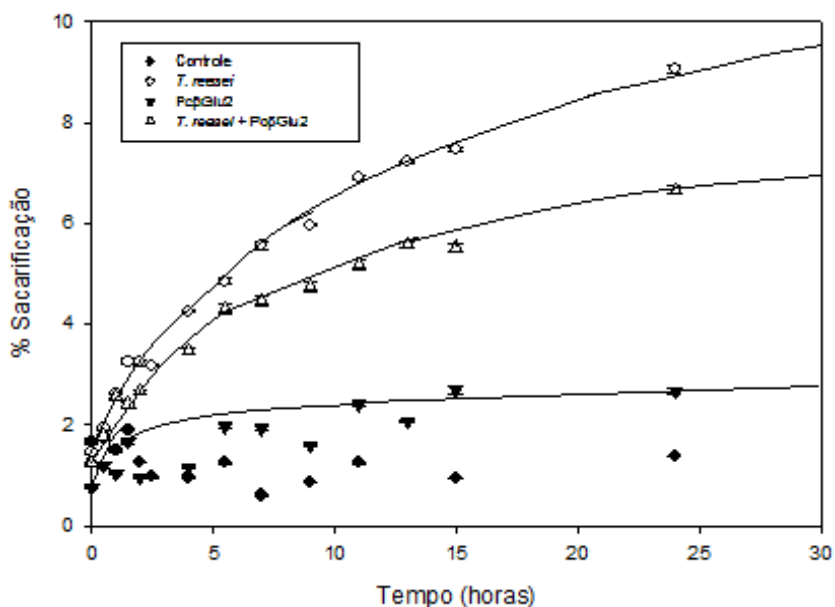
De acordo com os resultados encontrados observamos pela figura 41, que Pc $\beta$ Glu1 não é capaz de utilizar bagaço de cana como substrato sem ação de outras enzimas para gerar oligossacarídeos menores nas condições testadas, pois a porcentagem de açúcar redutor encontrado quando adicionamos ao meio reacional apenas Pc $\beta$ Glu1 é o mesmo valor encontrado no controle. Quando suplementamos o coquetel de *T. reesei* com Pc $\beta$ Glu1 a porcentagem de hidrólise é reduzida em relação a hidrólise realizada utilizando somente as enzimas de *T. reesei*. A velocidade inicial de hidrólise é praticamente a mesma nos ensaios contendo enzimas de *T. reesei* com ou sem adição de Pc $\beta$ Glu1,  $V_0 = 0,05 \mu\text{mol/h}$  e  $V_0 = 0,04 \mu\text{mol/h}$ , respectivamente.



**Figura 41:** Hidrólise de bagaço de cana coloidal ao longo do tempo, utilizando enzimas de *T. reesei* 7 CBU/g de biomassa e *PcβGlu1* 10 CBU/g de biomassa. O controle não apresentou adição de enzimas.

O mesmo ocorre quando suplementamos o coquetel de *T. reesei* com *PcβGlu2* (Figura 42). A velocidade inicial de hidrólise é de  $V_0$  0,05  $\mu\text{mol/h}$  utilizando apenas as enzimas de *T. reesei* e de 0,06  $\mu\text{mol/h}$  quando adicionamos *PcβGlu2* ao coquetel de enzimas. Contudo, a porcentagem final de hidrólise é menor após a suplementação do coquetel de *T. reesei* com a enzima de *P. chrysogenum*. Isso ocorre por que *PcβGlu2* é capaz de hidrolisar bagaço de cana coloidal sem a adição de outras proteínas no meio, com  $V_0$  de 0,02  $\mu\text{mol/h}$ .



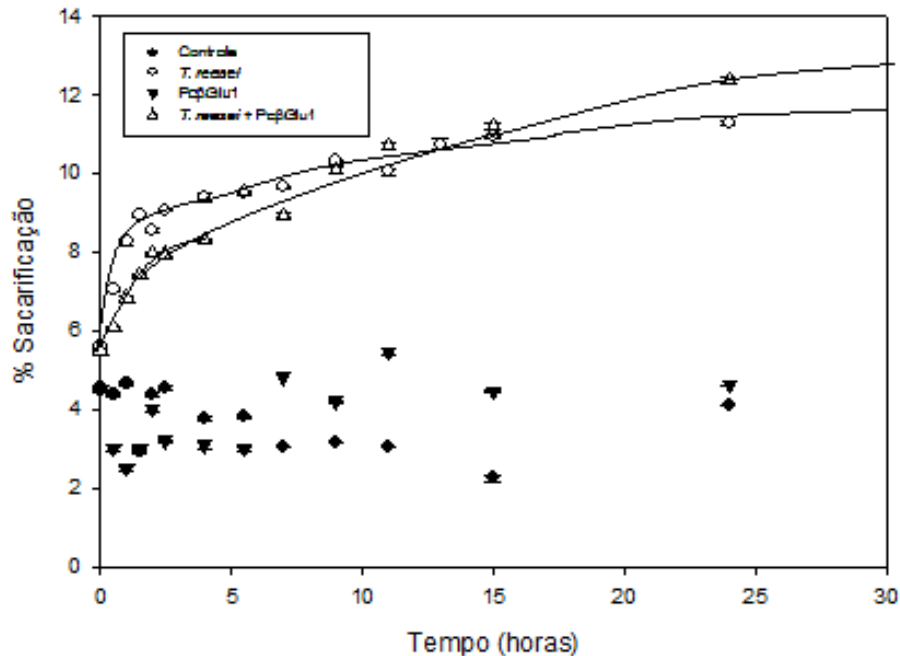


**Figura 42:** Hidrólise de bagaço de cana coloidal ao longo do tempo, utilizando enzimas de *T. reesei* 7 CBU/g de biomassa e PcβGlu2 10 CBU/g de biomassa. O controle não apresentou adição de enzimas.

Observamos pela tabela 12 que nas condições utilizadas a hidrólise de bagaço de cana coloidal por enzimas de *T. reesei* alcançou 9,7 % de hidrólise do açúcar total enquanto a suplementação com PcβGlu1 causou uma queda de 3 % na porcentagem de hidrólise e adição de PcβGlu2 casou perda de 2 %. PcβGlu2 sozinha consegue utilizar o substrato atingindo 2,5 % de hidrólise.

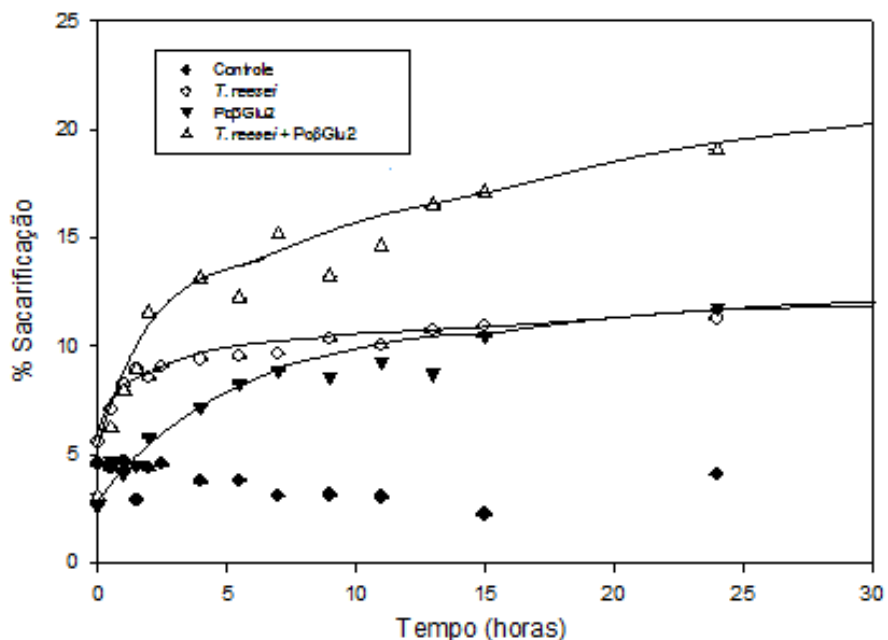
De acordo com os resultados encontrados observamos pela figura 43, que PcβGlu1 não é capaz de utilizar folha de bananeira coloidal como substrato sem ação de outras enzimas para gerar oligossacarídeos menores nas condições testadas, pois novamente a quantidade de açúcar redutor detectado neste ensaio é similar ao encontrado para o ensaio o controle. Quando suplementamos o coquetel de *T. reesei* com PcβGlu1 a porcentagem de hidrólise permaneceu praticamente a mesma em relação a hidrólise realizada utilizando somente as enzimas de *T. reesei*. Com o coquetel de *T. reesei* a hidrólise do substrato em relação a quantidade de açúcares totais presentes no meio foi de 10,6 %, com a adição de PcβGlu1 ao extrato de *T. reesei* a hidrólise atingiu 11 %. No entanto a velocidade inicial de hidrólise foi reduzida, no ensaio utilizando apenas enzimas de *T. reesei*  $V_0$  0,07  $\mu\text{mol/h}$ , com a adição de

Pc $\beta$ Glu1  $V_0$  0,03  $\mu$ mol/h.



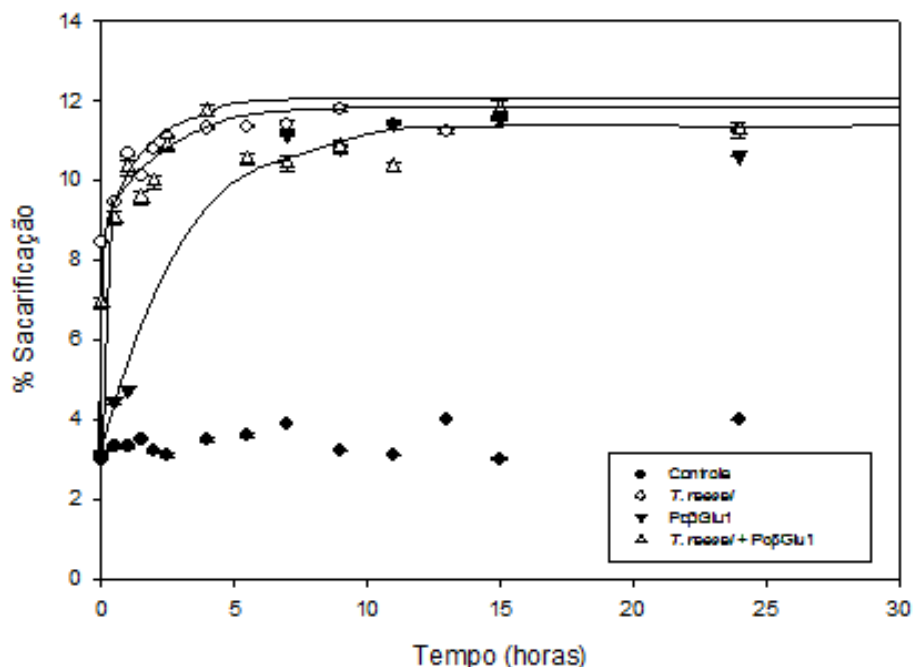
**Figura 43:** Hidrólise de folha de banana coloidal ao longo do tempo, utilizando enzimas de *T. reesei* 7 CBU/g de biomassa e Pc $\beta$ Glu1 10 CBU/g de biomassa. O controle não apresentou adição de enzimas.

A porcentagem de hidrólise de folha de banana coloidal utilizando apenas Pc $\beta$ Glu2 foi a mesma encontrada para a hidrólise utilizando apenas enzimas do extrato de *T. reesei*, 11,0 e 10,6 % respectivamente. Sendo que as enzimas de *T. reesei* apresentam uma velocidade inicial de hidrólise maior, como demonstrado na tabela 12, atingindo 50 % da porcentagem máxima de hidrólise em tempo menor que Pc $\beta$ Glu2. Quando suplementamos o extrato de *T. reesei* com Pc $\beta$ Glu2, um aumento de 7 % na porcentagem de hidrólise do substrato coloidal foi encontrado. No entanto não observamos sinergismo entre as enzimas de *T. reesei* e a enzima adicionada de *P. chrysogenum*. O sinergismo ocorre quando a atividade exibida pelas duas enzimas é maior que a soma das atividades das enzimas individualmente. A velocidade inicial de hidrólise foi de 0,07  $\mu$ mol/h sem adição de Pc $\beta$ Glu2, para 0,1  $\mu$ mol/h com a adição da enzima, sendo possível atingir 50 % da porcentagem máxima de hidrólise em um tempo de 1,3 h. O aumento da velocidade inicial pode ter ocorrido devido a retirada de celobiose do meio devido a adição extra de  $\beta$ -glicosidasas. Sabe-se que a celobiose é um inibidor de celulasas, o que pode diminuir a velocidade de hidrólise.



**Figura 44:** Hidrólise de folha de bananeira coloidal ao longo do tempo, utilizando enzimas de *T. reesei* 7 CBU/g de biomassa e PcβGlu2 10 CBU/g de biomassa. O controle não apresentou adição de enzimas.

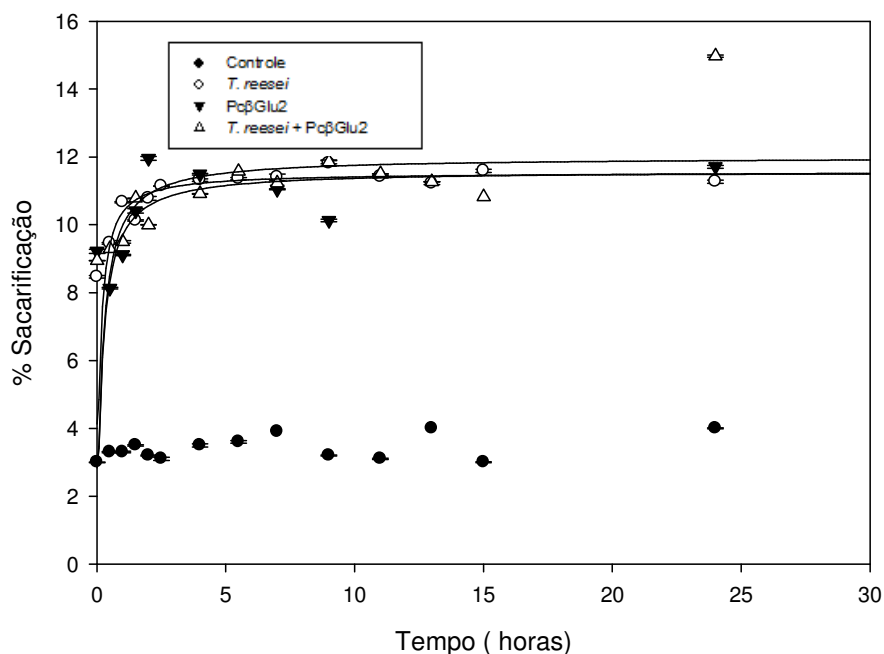
Quando utilizamos fibra de coco coloidal como substrato PcβGlu1 foi capaz de hidrolisar o substrato tão eficientemente quanto o coquetel enzimático de *T. reesei*, atingindo 12,2 % de hidrólise e 11,5 % para enzima de *Trichoderma* e com velocidades iniciais de hidrólise praticamente iguais. No entanto quando utilizamos apenas a enzima de *T. reesei*, esta é capaz de atingir 50 % da capacidade máxima de hidrólise em um tempo de 0,1 h, enquanto a enzima de *P. chrysogenum* leva um tempo de 1,1 h. Quando suplementamos o coquetel enzimático de *T. reesei* com PcβGlu1 não foi observado efeito sinérgico entre as enzimas e a porcentagem de hidrólise dos açúcares totais foi a mesma, no entanto a velocidade inicial de hidrólise foi aumentada de 0,06  $\mu\text{mol/h}$  utilizando apenas a enzima de *T. reesei* para 0,1  $\mu\text{mol/h}$  com a adição de PcβGlu1. Na tabela 12 podemos encontrar os valores de hidrólise máxima obtidas com os diferentes extratos utilizados.



**Figura 45:** Hidrólise de fibra de coco coloidal ao longo do tempo, utilizando enzimas de *T. reesei* 7 CBU/g de biomassa e PcβGlu1 10 CBU/g de biomassa. O controle não apresentou adição de enzimas.

O mesmo resultado foi encontrado para porcentagem de hidrólise máxima de fibra de coco coloidal quando utilizamos apenas o coquetel de PcβGlu2 ou a suplementação do coquetel de *T. reesei* com PcβGlu2. Quando utilizamos apenas PcβGlu2 a velocidade inicial de hidrólise permanece a mesma, assim como o tempo gasto para atingir 50 % da porcentagem de hidrólise máxima. No entanto a para a completação do coquetel de *T. reesei* com PcβGlu2,  $V_0$  foi reduzida a 0,02  $\mu\text{mol/h}$ .

Para hidrólise fibra de coco coloidal não houve diferenças entre a utilização de PcβGlu1 ou PcβGlu2 para a porcentagem final de hidrólise.



**Figura 46:** Hidrólise de fibra de coco coloidal ao longo do tempo, utilizando enzimas de *T. reesei* 7CBU/g de biomassa e PcβGlu2 10 CBU/g de biomassa. O controle não apresentou adição de enzimas.

Assim podemos concluir que, nas condições testadas, PcβGlu1 não é capaz de suplementar o coquetel enzimático de *T. reesei* para hidrólise de bagaço de cana e folha de bananeira. No entanto, possui a mesma eficiência de hidrólise quando utilizamos fibra de coco. PcβGlu2 também não é capaz de suplementar o coquetel de *T. reesei*, nas condições testadas, quando utilizamos bagaço de cana, no entanto possui a mesma eficiência de hidrólise quando utilizamos fibra de coco. Apesar de não apresentar efeito sinérgico a adição de PcβGlu2 suplementou o coquetel de *T. reesei* na hidrólise de folha de bananeira.

Comparando as duas enzimas purificadas de *P. chrysogenum*, podemos dizer que PcβGlu2 possui um maior potencial de aplicação para hidrólise de biomassas, visto que conseguiu hidrolisar as três biomassas sem adição de enzimas suplementares, enquanto PcβGlu1 foi capaz de hidrolisar apenas fibra de coco. Devido as características apresentadas por estas enzimas, podemos dizer que a suplementação do coquetel de *T. reesei* com o extrato de *P. chrysogenum*, apresenta grande potencial na hidrólise de biomassas.

**Tabela 12:** Efeito da utilização de enzimas secretadas por *T. reesei* e *P. chrysogenum* sobre hidrólise dos substratos colidais, bagaço de cana, folha de bananeira e fibra de coco.

	Bagaço			Bananeira			Coco		
	$V_0$ ( $\mu\text{mol/h}$ ) <sup>a</sup>	% Hidrólise Máxima	$T_{50\%}$ (h) <sup>b</sup>	$V_0$ ( $\mu\text{mol/h}$ ) <sup>a</sup>	% Hidrólise Máxima	$T_{50\%}$ (h) <sup>b</sup>	$V_0$ ( $\mu\text{mol/h}$ ) <sup>a</sup>	% Hidrólise Máxima	$T_{50\%}$ (h) <sup>b</sup>
<i>T. reesei</i>	0.05	9.7	4.4	0.07	10.6	0.3	0.06	11.5	0.1
Pc $\beta$ Glu1	-	-	-	-	-	-	0.05	12.2	1.1
Pc $\beta$ Glu2	0.02	2.5	1.6	0.04	11.0	1.7	0.07	11.6	0.2
<i>T. reesei</i> + Pc $\beta$ Glu1	0.04	5.7	1.6	0.03	11.0	0.7	0.1	11.1	0.1
<i>T. reesei</i> + Pc $\beta$ Glu2	0.06	6.6	2.6	0.1	17.6	1.3	0.02	12.0	0.2

<sup>a</sup> Velocidade inicial de hidrólise.

<sup>b</sup> Tempo gasto para atingir 50 % da hidrólise máxima nas condições de ensaio.

Sabe-se que as celulasas são inibidas pelo produto de reação celobiose, assim é esperado que a remoção de celobiose pela adição de  $\beta$ -glicosidase, aumente a hidrólise de celulose. No entanto o processo de hidrólise de celobiose libera glicose, que pode inibir as  $\beta$ -glicosidases. Várias hipóteses para o rápido declínio nas taxas de hidrólise das celulosas têm sido propostas, como inativação enzimática, mudanças na acessibilidade do substrato e reatividade, aumento na cristalinidade da celulose, falta de extremidades nas cadeias de celulosas para ação de celobiohidrolases, diminuição do sinergismo entre as enzimas, obstáculos na superfície do substrato e a natureza fractal do substrato (Bansal et al., 2012). No entanto a determinação e quantificação destes fatores ainda é um desafio. A fração não hidrolisada de celulose, devido a uma adsorção não produtiva da enzima ao substrato, pode acontecer por diversas razões como a falta de sítios reativos, orientação imprópria da cadeia de celulose em relação ao domínio catalítico, inacessibilidade das extremidades da cadeia de celulose e competição pelo substrato entre as enzimas adsorvidas (Bansal et al., 2012).

De acordo com Ng et al. (2011)  $\beta$ -glicosidases de *A. Niger* e de *Chaetomella raphigera* foram capazes de complementar de forma sinérgica um coquetel de *T. reesei* utilizado para a hidrólise bagaço de cana. A porcentagem de hidrólise obtida com as enzimas de *T. reesei* foi de 11 %, com a adição da enzima de *A. Niger* a hidrólise foi incrementada em 49 % e com a adição da  $\beta$ -glicosidase de *C. raphigera* a hidrólise foi de 68 %. No trabalho é demonstrado que dentre todas as  $\beta$ -glicosidases estudadas as que se apresentaram menos sensíveis a inibição por glicose foram capazes de complementar o coquetel de *T. reesei*. Utilizando pNP $\beta$ Gli como substrato a enzima de *A. Niger* apresentou  $K_I$  de 1,39 mM e a enzima de *C. raphigera*  $K_I$  de 4,39 mM, quando celobiose foi utilizado como substrato foram encontrados valores de  $K_I$  de 59,5 mM e

46,3 mM para *A. Niger* e *C. raphigera* respectivamente.

Berlin et al. (2007), suplementaram um coquetel comercial de *T. reesei* (Celulaclast) com Novozym 188, um coquetel de *A. niger* contendo grande quantidade de  $\beta$ -glicosidase. De acordo com os autores a suplementação levou ao aumento de 37 % na liberação de glicose.

Wang et al. (2012), estudaram o efeito sinérgico da adição de uma  $\beta$ -glicosidase em uma mistura de *T. reesei* Rut C-30, utilizando celulose microcristalina como substrato. Esta  $\beta$ -glicosidase foi identificada em uma biblioteca metagenômica como pertencente ao intestino de *Globitermes sulphureus*. A adição da  $\beta$ -glicosidase ao meio de hidrólise aumentou a porcentagem de glucose em 87 % após três dias.

Bai et al. (2013), testaram o efeito sinérgico de uma  $\beta$ -glicosidase de *Caldicellulosiroptor bescii* sobre três celulasas diferentes, utilizando celulose amorfa como substrato. As celulasas utilizadas foram uma celobiohidrolase de *C. bescii*, uma endoglucanase de *C. bescii* e uma endoglucanase de *Fervidobacterium nodosumand*. A taxa de sinergia foi considerada como a soma das atividades individuais sobre a atividade produzida pela mistura de enzimas. Uma taxa de sinergia de 1,3 foi encontrada entre a  $\beta$ -glicosidase e a endoglucanase de *F. nodosumand*. Para a adição a celobiohidrolase de *C. bescii* ocorreu taxa de sinergia foi de 2,6 e para a endoglucanase de *C. bescii* a taxa de sinergia foi aproximadamente 2,0.

## 6 CONCLUSÕES

O fungo *P. chrysogenum* foi capaz de secretar duas  $\beta$ -glicosidases quando cultivado em meio líquido contendo farelo de trigo como indutor da atividade de celulases. O processo de purificação com resina hidrofóbica demonstrou que Pc $\beta$ Glu1 possui menos aminoácidos hidrofóbicos periféricos que Pc $\beta$ Glu2. As  $\beta$ -glicosidases purificadas, Pc $\beta$ Glu1 e Pc $\beta$ glu2, apresentaram massas de 134 e 98 kDa em gel desnaturante de poliacrilamida e massa de 258 e 98 kDa estimadas por cromatografia de exclusão molecular, respectivamente, sugerindo que Pc $\beta$ Glu1 é provavelmente um homodímero. O Sequenciamento por espectrometria de massas demonstrou que Pc $\beta$ Glu1 é um homodímero e identificou as duas proteínas como  $\beta$ -glicosidases pertencentes a família GH3. Pc $\beta$ Glu1 foi identificada com 15 % de cobertura como produto codificado pelo gene Pc18g01940 e Pc $\beta$ Glu2 foi identificada com 3,3% de cobertura como produto codificado pelo gene Pc20g10170.

A determinação da configuração do carbono anomérico dos produtos de reação demonstrou que as duas enzimas atuam por um mecanismo de retenção de configuração do carbono anomérico.

Dentre as características estudadas para estas enzimas, Pc $\beta$ Glu1 mostrou-se mais estável que Pc $\beta$ Glu2, com meia vida de 9174 min a 70 °C enquanto a segunda perdia a atividade totalmente em menos de 4 min a 70 °C. No entanto a estabilidade de Pc $\beta$ Glu1 é conferida pela presença de sulfato de amônio no meio. No caso da variação de pH Pc $\beta$ Glu1 mostrou-se mais sensível que Pc $\beta$ Glu2 e as duas proteínas possuem atividade ótima em pH 5,0, e mantem-se estável quando incubadas em valores de pH de 4-8. A atividade de Pc $\beta$ Glu2 foi mais inibida pelos íons Cu<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> e Hg<sup>+</sup>, que a atividade de Pc $\beta$ Glu1, podendo indicar a presença de mais grupos tióis no sítio ativo ou na estrutura de Pc $\beta$ Glu2 do que em Pc $\beta$ Glu1.

As duas enzimas demonstraram preferência para aril-glicosídeos em relação a alquil glicosídeos e hidrolisaram eficientemente oligossacarídeos naturais. Além disso, as duas enzimas não foram específicas para a hidrólise de ligações  $\beta$ -1,4, pois foram capazes de hidrolisar laminaribiose e gentiobiose. Pc $\beta$ Glu2 foi inibida por alguns substratos quando estes apresentavam-se em alta concentração no meio.



Provavelmente nestas concentrações uma segunda molécula era capaz de se ligar a enzima formando um complexo ternário inativo, ou a diminuição da presença do produto no meio pode ter acontecido devido a atividade de transglicosilação da enzima. As duas enzimas foram inibidas competitivamente por glicose e não competitivamente por celobiose quando utilizamos pNP $\beta$ Gli como substrato. Este resultado demonstra a presença de um segundo sítio de ligação a inibidor presente na enzima e ainda que Pc $\beta$ Glu2 é mais fortemente inibida pelo substrato celobiose e pelo produto de reação glicose que Pc $\beta$ Glu1. Foi determinado que as duas enzimas são capazes de hidrolisar os oligossacarídeos de glicose nos subsítios -1 e +1 e que Pc $\beta$ Glu1 possui cinco subsítios de ligação a substratos e que Pc $\beta$ Glu2 possui apenas quatro.

Devido as características apresentadas por estas enzimas, principalmente alta eficiência catalítica para celodextrinas, a suplementação do coquetel de *T. reesei* com o extrato de *P. chrysogenum*, apresenta grande potencial para hidrólise de biomassas. Pc $\beta$ Glu1 e Pc $\beta$ Glu2 não foram capazes de suplementar o coquetel de *T. reesei* para hidrólise de bagaço de cana, folha de bananeira e fibra de coco, nas condições testadas, no entanto hidrolisaram fibra de coco com a mesma eficiência do coquetel utilizado. Apesar de não apresentar efeito sinérgico a adição de Pc $\beta$ Glu2 suplementou o coquetel de *T. reesei* na hidrólise de folha de bananeira, incrementando a porcentagem de hidrólise. Comparando as duas enzimas purificadas de *P. chrysogenum*, podemos dizer que Pc $\beta$ Glu2 possui um maior potencial de aplicação para hidrólise de biomassas.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arakawa, T.; Timasheff, S.N. Mechanism of Protein Salting In and Salting Out by Divalent Cation Salts: Balance between Hydration and Salt Binding? *Biochemistry*, v. 23, p. 5912-5923, 1984.

Assareh, R.; Zahiri, H. S.; Noghabi, K. H.; Aminzadeh, S.; Khaniki, G.B. Characterization of the newly isolated *Geobacillus sp.* T1, the efficient cellulase-producer on untreated barley and wheat straws. *Bioresource Technology*, v. 120, p. 99-105, 2012.

Badhan, A.K.; Chadha, B.S.; Kaur, J.; Saini, H.S.; Bhat, M.K. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora sp.* IMI 387099. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 504–510, 2007.

Bai, A.; Zhao, X.; Jin, Y.; Yanga, G.; Feng, Y. A novel thermophilic  $\beta$ -glucosidase from *Caldicellulosiruptor bescii*: Characterization and its synergistic catalysis with other cellulases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 85-86, p. 248-256, 2013.

Bansal, P.; Vowell, B.J.; Hall, M.; Realf, M.J.; Lee, J.H.; Bommarius, A.S. Elucidation of cellulose accessibility, hydrolysability and reactivity as the major limitations in the enzymatic hydrolysis of cellulose. *Bioresource Technology*, v. 107, p. 243–250, 2012.

Beguin, P., Aubert, J. P. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 13, p.25–58, 1993.

Berlin, A.; Maximenko, V.; Gilkes, N.; Saddler, J. Optimization of Enzyme Complexes for Lignocellulose Hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 97, p. 287-296, 2007.

Bernier, R.F.; Stutzenberger, F.J. Stabilization of  $\beta$ -glucosidase by polyhydric alcohols. *Journal of Biotechnology*, v.7, 293-298, 1988.

Bhat, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, v. 18, p. 355-383, 2000.

Bhat, M.K.; Bhat, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology advances*, v. 15, p. 583-620, 1997.

Bhatia, Y.; Mishra, S.; Bisaria, V.S. Microbial  $\beta$ -Glucosidases: Cloning, Properties and Applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 22, p. 375–407, 2002.

Bhiri, F.; Chaabouni, S.E.; Limam, F.; Ghrir, R.; Marzouki, N. Purification and Biochemical Characterization of Extracellular  $\beta$ -Glucosidases from the Hypercellulolytic Pol6 Mutant of *Penicillium occitanis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 149, p. 169–182, 2008.

Brijwani, K.; Oberoi, H.S.; Vadlani, P.V. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 120–128, 2010.

Buaban,B.; Inoue,H.; Yano,S.; Tanapongpipat,S.; Ruanglek,V.; ChampredaV.; Pichyangkura, R.; Rengpipa, T.S.; Eurwilaichitr,L. Bioethanol production from ball milled bagasse using an on-site produced fungal enzyme cocktail and xylose-fermenting *Pichia stipitis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 110, p. 18-25, 2010.

Cairns, J.R.K.; Esen, A.  $\beta$ -Glucosidases. *Cell.Mol. Life Sci.*, v. 67, p. 3389–3405, 2010.

Cao, W.G.; Crawford, D.L. Purification and some properties of beta-glucosidase from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* Strain. *J. Microbiol.*, v. 39, p. 125-129, 1993.

Cantarel, B.L.; Coutinho, P.M.; Rancurel, C.; Bernard, T.; Lombard, V.; Henrissat, B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res.*, v. 37, p. D233–D238, 2009.

Chandra, M.S.; Viswanath, B.; Reddy, B.R. Cellulolytic enzymes on lignocellulosic substrates in solid state fermentation by *Aspergillus niger*. *Indian Journal of Microbiology*, v. 47, p. 323–328, 2007.

Chauve, M.; Mathis, H.; Huc, D.; Casanave, D.; Monot, F.; Ferreira, N.L. Comparative kinetic analysis of two fungal  $\beta$ -glucosidases. *Biotechnology for Biofuels*, v. 3, p.3, 2010.

Chen, M.; Qinb, Y.; Liu, Z.; Liu, K.; Wang, F.; Qua, Y. Isolation and characterization of a  $\beta$ -glucosidase from *Penicillium decumbens* and improving hydrolysis of corncob residue by using it as cellulase supplementation. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 46, p. 444-449, 2010.

Cheong, D. E.; Chang, W. S.; Kim, G. J.A. cloning vector employing a versatile  $\beta$ -glucosidase as an indicator for recombinant clones, *Anal.Biochem.*, v. 425, p. 166-168, 2012.

Chiba, S. Molecular mechanism in  $\alpha$ -glucosidase and glucoamylase. *Biosci. Biothechnol. Biochem.*, v. 61, p. 1233–1239, 1997.

Christakopoulos, P.; Kekos, D.; Marcris, B.J.; Goodenough, P.W.; Bhat, M.K. Purification and characterization of an extracellular  $\beta$ -glucosidase with transglycosylation and exo-glucosidase activities from *Fusarium oxysporum*. *Biotech. Lett.*, v. 16, p. 587-592, 1994.

Cobos, A.; Estrada, P. Effect of polyhydroxylic cosolvents on the thermostability and activity of xylanase from *Trichoderma reesei* QM 9414. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 33, p. 810–818, 2003.

Coughlan, M. P. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. In: G.E. Russell, Editor, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v. 3, p. 39–109, 1985.

Czjzek, M.; Cicek, M.; Zamboni, V.; Bevan, D.R.; Henrissat, B.; Esen, A. The mechanism of substrate (aglycone) specificity in  $\beta$ -glucosidases is revealed by crystal structures of mutant maize  $\beta$ -glucosidase -DIMBOA, -DIMBOAGlc, and dhurrin complexes. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, v. 97, p. 13555–13560, 2000.

Daroit, D. J.; Simonetti, A.; Hertz, P. F.; Brandelli, A. Purification and characterization of an extracellular  $\beta$ -glucosidase from *Monascus purpureus*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 18, p. 933–941, 2008.

Davies, G.J.; Wilson, K.S.; Henrissat, B. Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolyses, *Biochem. J.*, v. 321, p. 557–559, 1997.

Decker, C. H.; Visser, J.; Schreier, P. B-Glucosidases from Five Black *Aspergillus* species: study of their physico-chemical and biocatalytic properties. *J Agric Food Chem*, v. 48, p. 4929 – 4936, 2000.

Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical chemistry*, v. 28, n. 3, p. 350 – 356, 1956.

Elyas, K.K.; Mathew, A.; Sukumaran, R.K.; Manzur Ali, P.P.; Sapna, K.; Kumar, S.R.; Mol, K.R. Production optimization and properties of beta glucosidases from a marine fungus *Aspergillus-SA 58*. *New Biotechnology*, v. 27, p. 347-351, 2010.

Esen, A.  $\beta$ -Glucosidases. In: Whitaker, J.R.; Voragen, A.G.J.; Wong, D.W.S.; editors. *Handbook of food enzymology*. MarcelDekker Inc., New York, pp 791–804, 2003.

Evans, C.S. Properties of the beta-D-glucosidase (cellobiase) from the wood-rotting fungus, *Coriolus versicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 22, p. 128-131, 1985.

Falkoski, D.L.; Guimarães, V.M.; de Almeida, M.N.; Alfenas, A.C.; Colodette, J.L.; de Rezende, S.T. *Chrysosporthe cubensis*: A new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. *Bioresource Technology*, v. 130, p. 296–305, 2013.

Flachner, B.; Brumbauer, A.; Reczey, K. Stabilization of  $\beta$ -glucosidase in *Aspergillus phoenicis* QM 329 pellets. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 24, p. 362–367, 1999.

Fox, J.D.; Robyt, J.F. Miniaturization of three carbohydrate analyses using a microsample plate reader. *Anal. Biochem.* v. 195, p. 93–96, 1991.

García-Rico, R.O.; Fierro, F.; Mauriz, E.; Gómez, A.; Fernández-Bodega, M.A.; Martín J.F. The heterotrimeric G $\alpha$  protein Pga1 regulates biosynthesis of penicillin, chrysogenin and roquefortine in *Penicillium chrysogenum*. *Microbiology*, v. 154, p. 3567–3578, 2008.

Gilbert, H.J.; Sta Ibrand, H.; Brumer, H. How the walls come tumbling down: recent structural biochemistry of plant polysaccharide degradation. *Current Opinion Plant Biol.*, v. 11, p. 338–348, 2008.

Goker-Alpan, O. Therapeutic approaches to bone pathology in Gaucher disease: Past, present and future. *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 104, p. 438–447, 2011.

Grabowski, G.A.; Gatt, S.; Horowitz, M. Acid beta-glucosidase: enzymology and molecular biology of Gaucher disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol.*, v. 25, p. 385-414, 1990.

Gunata, Z. Flavor enhancement in fruit juices and derived beverages by exogenous glycosidases and consequences of the use of enzyme preparations. In: Whitaker, J.R.;

Voragen, A.G.J.; Wong, D.W.S.; editors. *Handbook of food enzymology*. Marcel Dekker Inc., New York, p. 303–330, 2003.

Haas, H.; Friedlin, E.; Stöffler, G.; Redl, B. Cloning and structural organization of a xylanase-encoding gene from *Penicillium chrysogenum*. *Gene*, v. 126, p. 237-242, 1993.

Haas, H.; Herfurth, E.; Stöffler, G.; Redl, B. Purification, characterization and partial amino acid sequences of a xylanase produced by *Penicillium chrysogenum*. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1117, p. 279-286, 1992.

Hagerdal, B.; Ferchak, J.D.; Pye, E.K. Saccharification of cellulose by the cellulolytic enzymesystem of *Thermomonospora* sp. I. Stability of cellulolytic activities with respect to time, temperature, and pH. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 22, p. 1515-1526, 1980.

Hammel, K. E. Fungal degradation of lignin. In: Cadisch, G.; Giller, K.E.; editors. *Plant litter quality and decomposition*. CAB-International, p. 33–46, 1997.

Harnpicharnchai, P.; Champreda, V.; Sornlake, W.; Eurwilaichitr, L. A thermotolerant  $\beta$ -glucosidase isolated from an endophytic fungi, *Periconia* sp., with a possible use for biomass conversion to sugars. *Protein Expression and Purification*, v. 67, p. 61–69, 2009.

Henrissat, B.; Callebaut, I.; Fabrega, S.; Lehn, P.; Mornon, J.P.; Davies, G. Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 92, p. 7090–7094, 1995.

Henrissat, B.; Bairoch, A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem.J.*, v. 316, p. 695-696, 1996.

Hiromi, K.; Nitta, Y.; Numata, C.; Ono, S. Subsite Affinities Of Glucoamylase: Examination Of The Validity Of The Subsite Theory. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 302, p. 362-375, 1973.

Im, H.; Henson, C.A. Characterization of high pl  $\alpha$ -glucosidase from germinated barley seeds: substrate specificity, subsite affinities and active-site residues. *Carbohydrate Research*, v. 277, p. 145 – 159, 1995.

Ismail, B.; Hayes, K.  $\beta$ -Glycosidase Activity toward Different Glycosidic Forms of Isoflavones. *J. Agric. Food Chem.*, v. 53, p. 4918-4924, 2005.

Javed, M.R.; Rashid, M.H.; Mukhtar, Z.; Riaz, M.; Nadeem, H.; Huma, T.; Ashiq, N. Kinetics and thermodynamics of high level  $\beta$ -glucosidase production by mutant derivative of *Aspergillus niger* under submerged growth conditions. *Afr. J. Microbiol. Res.*, v. 5, p. 2528-2538, 2011.

Jeya, M.; Joo, A.R.; Lee, K.M.; Tiwari, M.K.; Lee, K.M.; Kim, S.H.; Lee, J.K. Characterization of beta-glucosidase from a strain of *Penicillium purpurogenum* KJS506. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 86, p. 1473-1484, 2010.

Joo, A.; Jeya, M.; Lee, K.; Moon, H.; Kim, Y.; Lee, J. Production and characterization of  $\beta$ -1,4-glucosidase from a strain of *Penicillium pinophilum*. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 851–858, 2010.

Jørgensen, H.; Mørkeberg, A.; Krogh, K.B.; Olsson, L. Growth and enzyme production by three *Penicillium* species on monosaccharides. *J Biotechnol.*, v. 109, p. 295 -299, 2004.

Jung, Y.R.; Shin, H.Y.; Song, Y.S.; Kim, S.B.; Kim, S.W. Enhancement of immobilized enzyme activity by pretreatment of  $\beta$ -glucosidase with cellobiose and glucose. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 18, p. 702–706, 2012.



Karnchanatat, A.; Petsom, A.; Sangvanich, P.; Piaphukiew, J.; Whalley, A.J.; Reynolds, C.D.; Sihanonth, P. Purification and biochemical characterization of an extracellular beta-glucosidase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.:Fr.) Rehm. *FEMS Microbiol Lett*, v. 270, p. 162-170, 2007.

Kaya, M.; Ito, J.; Kotaka, A.; Matsumura, K.; Bando, H.; Sahara, H.; Ogino, C.; Shibasaki, s.; Kuroda, K.; Ueda, M.; Kondo, A.; Hata, Y. Isoflavone aglycones production from isoflavone glycosides by display of  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus oryzae* yeast cell surface. *Appl Microbiol Biotechnol.*, v. 79, p. 51–60, 2008.

Kim, S., Dale, B. E. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy*, v. 26, p. 361-375, 2004.

Kongsaeree, P.T.; Ratananikoma, K.; Choengpanyab, K.; Tongtubtima, N.; Sujiwattanaratb, P.; Porncharoenop, C.; Onpiuma, A.; Svastic, J. Substrate specificity in hydrolysis and transglucosylation by family 1  $\beta$ -glucosidases from cassava and Thai rosewood. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 67, p. 257–265, 2010.

Korotkova, O.G.; Semenova, M.V.; Morozova, V.V.; Zorov, I.N.; Sokolova, L.M.; Bubnova, T.M.; Okunev, O.N.; Sinitsyn, A.P. Isolation and properties of fungal beta-glucosidases. *Biochemistry (Mosc)*, v. 74, p. 569-577, 2009.

Koshland, D.E. Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. *Biol Rev*, v. 28, p. 416-436, 1953.

Kovacs, K.; Megyeri, L.; Szakacs, G.; Kubicek, C.P.; Galbeb, M.; Zacchib, G. *Trichoderma atroviride* mutants with enhanced production of cellulase and  $\beta$ -glucosidase on pretreated willow. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 43, p. 48–55, 2008.

Krogh, K.B.R.; Harris, P.V.; Olsen, C.L.; Johansen, K.S.; Hojer-Pedersen, J.; Borjesson, J.; Olsson, L. Characterization and kinetic analysis of a thermostable GH3 beta-

glucosidase from *Penicillium brasilianum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 86, p. 143–154, 2010.

Krystal, G.; Macdonald, C.; Munt, B.; Ashwell, S.A method for quantitating nanogram amounts of soluble protein using the principle of silver binding. *Analytical Biochemistry*, v. 148, p. 451-460, 1985.

Kubicek, C.P.; Messner, R.; Gruber, F.; Mach, R.L.; Kubicek-Pranz, E.M. The *Trichoderma reesei* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 15, p. 90-99, 1993.

Kumar, R.; Singh, S.; Singh, O.V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 35, p. 377–391, 2008.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-683, 1970.

LaMarco, K. L.; Glew, R.H. Galactosylsphingosine Inhibition of the Broad-Specificity Cytosolic  $\beta$ -Glucosidase of Human Liver. *Archives of Biochemistry And Biophysics.*, v. 236, p. 669-676, 1985

Leite, R.S.R.; Gomes, E.; da Silva, R. Characterization and comparison of thermostability of purified  $\beta$ -glucosidases from a mesophilic *Aureobasidium pullulans* and a thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Process Biochemistry*, v. 42, p. 1101–1106, 2007.

Li, Y.K.; Lee, J.A. Cloning and expression of  $\beta$ -glucosidase from *Flavobacterium meningosepticum*: a new member of family B  $\beta$ -glucosidase - Homology to fungal  $\beta$ -glucosidases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 24, p. 144-150, 1999.

Liu, J.; Yuan, X.; Zeng, G.; Shi, J.; Chen, S. Effect of biosurfactant on cellulose and xylanase production by *Trichoderma viride* in solid substrate fermentation. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 2347–2351, 2006.

Lucena, S.A.; Moraes, C.S.; Costa, S.G.; de Souza, W.; Azambuja, P.; Garcia, E.S.; Genta, F.A. Miniaturization of hydrolase assays in thermocyclers. *Anal. Biochem.*, v. 434, n. 1, p. 39-43, 2013.

Lynd, L.R.; Weimer, P.J.; van Zyl, W.H.; Pretorius, I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol.Mol. Biol. Rev.*, v. 66, p. 506–577, 2002.

Mach, R.L.; Zeilinger, S. Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 60, p. 515–522, 2003.

Mandels, M.; Weber, J. The production of cellulases. *Advances in Chemistry*, v. 95, cap. 23, p. 391-414, 1969.

Marana, S.R. Molecular basis of substrate specificity in family 1 glycoside hydrolases. *IUBMB Life*, v. 58, p. 63–73, 2006.

Marana, S.R.; Terra, W.R.; Ferreira, C. Midgut  $\beta$ -D-Glucosidases from *Abracris Flavolineata* (Orthoptera: Acrididae). Physical Properties, Substrate Specificities and Function. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, v. 25, p. 835-843, 1995.

McCarter, J.D.; Withers, S.G. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 4, p. 885-892, 1994.

Melo, E.B.; Gomes, A.S.; Carvalho, I.  $\alpha$ - and  $\beta$ -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. *Tetrahedron*, v. 62, p. 10277–10302, 2006.

Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.*, v. 31, p. 426-428, 1959.

Morrissey, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gel. A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal.Biochem.*, v. 11, p.307-310, 1981.

Moscatelli, M. C.;Lagomarsino, A.; Garzillo, A.M.V.; Pignataro, A.; Grego, S.  $\beta$ -Glucosidase kinetic parameters as indicators of soil quality under conventional and organic cropping systems applying two analytical approaches. *Ecological Indicators*, v. 13, p. 322–327, 2012.

Nakkharat, P.; Haltrich, D. Purification and characterisation of an intracellular enzyme with  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -galactosidase activity from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus* CBS 236.58. *Journal of Biotechnology*, v. 123, p. 304–313, 2006.

Nam, K.H.; Sung, M.N.; Hwang, K.Y. Structural insights into the substrate recognition properties of  $\beta$ -glucosidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 391, p. 1131–1135, 2010.

Nefisa, El-Shayeb, M. A.; Mabrouk, S.S.; Ismail, S. A.; Abdel-Fattah, A. F. Production of fungal enzymes with special reference to  $\beta$ -glucosidases. *Zentralblatt für Mikrobiologie*, v. 147, p. 563–568, 1992.

Ng, I.; Li, C.; Chan, S.; Chir, J.; Chen, P.T.; Tong, C.; Yu, S.; Ho, T.D. High-level production of a thermoacidophilic b-glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 1310–1317, 2010.

Ng, I.; Tsai, S.; Ju, Y.; Yu, S.; Ho, T.D. Dynamic synergistic effect on *Trichoderma reesei* cellulases by novel  $\beta$ -glucosidases from Taiwanese fungi. *BioresourceTechnology*, v. 102, p. 6073–6081, 2011.

Nguyen, N.; Lee, K.; Kim, I.; Kim, Y.; Jeya, M.; Lee, J. One-step purification and characterization of a  $\beta$ -1,4-glucosidase from a newly isolated strain of *Stereum hirsutum*. *Appl. Microbiol. Biotechnology*, v. 87, p. 2107–2116, 2010.

Pal, S.; Banik, S.P.; Ghorai, S.; Chowdhury, S.; Khowala, S. Purification and characterization of a thermostable intra-cellular  $\beta$ -glucosidase with transglycosylation properties from filamentous fungus *Termitomyces clypeatus*. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 2412–2420, 2010.

Park, A.; Hong, J.H.; Kim, J.; Yoon, J. Biochemical Characterization of an Extracellular  $\beta$ -Glucosidase from the Fungus, *Penicillium italicum*, Isolated from Rotten Citrus Peel. *Mycobiology*, v. 40, p. 173-180, 2012.

Park, Y.P.; Aguiar, C.L.; Alencar, S.M.; Scamparini, A.R.P. Biotransformação de isoflavonas de soja. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, v. 20, p. 12-14, 2001.

Parry, N. J.; Beever, D. E.; Owen, E.; Vandenberghe, I.; Van Beeumen, J.; Bhat, M. K. Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable  $\beta$ -glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus*. *Biochem. J.*, v. 353, p. 117–127, 2001.

Plant, A.R.; Oliver, J.E.; Patchett, M.L.; Daniel, R.M.; Morgan, H.W. Stability and substrate specificity of a  $\beta$ -glucosidase from the thermophilic bacterium Tp8 cloned into *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 262, p.181, 1988.

Queiroz, J.A.; Tomaz, C.T.; Cabral, J.M.S. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *Journal of Biotechnology*, v. 87, p. 143–159, 2001.

Raabo E.; Terkildsen, T.C. On the enzymatic determination of blood glucose. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, v. 12, n. 4, p. 402–407, 1960.

Radin, N. S.; Warren, K. R.; Arora, R. C.; Hyun, J. C.; Misra, R. S. Modification of Lipid Metabolism (Perkins, E. G., and Witting, L. A., eds.), *Academic Press, New York*, p. 87-104, 1975.

Rahman, Z.; Shida, Y.; Furukawa, T.; Suzuki, Y.; Okada, H.; Ogasawara, W.; Morikawa, Y. Application of *Trichoderma reesei* cellulose and xylanase promoters through homologous recombination for enhanced production of extracellular beta-glucosidase I. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v. 73, p. 1083-1089, 2009.

Rappsilber, J.; Mann, M.; Ishihama, Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat. Protoc.*, v. 2, p. 1896–906, 2007.

Rhoderick, E.; Brown, K.L.; Jarvis, K.J.; Hyland, K.J. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Analytical Biochemistry*, v. 180, p. 136–139, 1989.

Riou, C.; Salmon, J.; Vallier, M.; Nata, Z.G.; Barre, P. Purification, Characterization and Substrate Specificity of a Novel Highly Glucose-Tolerant  $\beta$ -Glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 64, p. 3607–3614, 1998.

Rodriguez-Martin, A.; Acosta, R.; Liddell, S.; Nunez, F.; Benito, M.J.; Asensio, M.A. Characterization of the novel antifungal protein PgAFP and the encoding gene of *Penicillium chrysogenum*. *Peptides*, v. 31, p. 541-547, 2010.

Rojas, A.; Arola, Li.; Romeu, A.  $\beta$ -Glucosidase families revealed by computer analysis of protein sequences. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, v. 35, p. 1223-1231, 1995.

Romero-Segura, C.; García-Rodríguez, R.; Sánchez-Ortiz, A.; Sanz, C.; Pérez, A.G. The role of olive  $\beta$ -glucosidase in shaping the phenolic profile of virgin olive oil. *Food Research International*, v. 4, p. 191–196, 2012.

Rostagno, M.A.; Palma, M.; Barroso, C.G. Solid-phase extraction of soy isoflavones. *J. Chromatogr.A*, v. 1076, p. 110, 2005.

Saha, B.C.; Bothast, R.J. Production, Purification, and Characterization of a Highly Glucose-Tolerant Novel  $\beta$ -Glucosidase from *Candida peltata*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, p. 3165–3170, 1996.

Saibi, W.; Gargouri, A. Purification and biochemical characterization of an atypical  $\beta$ -glucosidase from *Stachybotrys microspora*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 72, p. 107– 115, 2011.

Sanz-Aparicio, J.; Hermoso, J.A.; Martinez-Ripoll, M.; Lequerica, J.L.; Polaina, J. Crystal structure of beta-glucosidase A from *Bacillus polymyxa*: insights into the catalytic activity in family 1 glycosyl hydrolases. *J. Mol. Biol.*, v. 275, p. 491–502, 1998.

Seidle, H.F.; Allison, S.J.; George, E.; Huber, R.E. Trp-49 of the family 3  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger* is important for its transglucosidic activity: Creation of novel  $\beta$ -glucosidases with low transglucosidic efficiencies. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 455, p. 110–118, 2006.

Semenza, G.; Curtis, H.C.; Raunhardt, O.; More, P.; Muler, M. The configurations at the anomeric carbon of the reaction products of some digestive enzymes. *Carbohydr. Res.*, v. 10, p. 417 - 428, 1969.

Setchell, K.D.; Cole, S.J. Variations in isoflavone levels in soy foods and soy protein isolates and issues related to isoflavone databases and food labeling. *J. Agric. Food Chem.*, v. 51, p. 4146-4155, 2003.

Singhania, R.E.; Patel, A.; Sukumaran, R.K.; Larroche, C.; Pandey, A. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technology*, v. 127, p. 500–507, 2013.

Sinnott, M.L. Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. *Chem. Rev.*, v. 911, p. 1171-1202, 1990.

Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C. Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.*, v. 150, p. 76-86, 1985

Soarse, F.E.F.; Braga, F.R.; Genier, H.L.A.; Araujo, J.V.; Ferriera, S.R.; Araujo, J.M.; Tavela, A.O.; Vilela, V.L.R.; Queiróz, J.H. Optimization of medium composition for protease production by *Paecilomyces marquandii* in solid-state-fermentation using response surface methodology. *Afr. J. Microbiol. Res.*, v. 4, p. 2699-2703, 2010.

Souza, F.H.; Nascimento, C, V.; Rosa, J.C.; Masui, D.C.; Leone, F.A.; Jorge, J.A.; Furriel, R.P.M. Purification and biochemical characterization of a mycelial glucose- and xylose-stimulated  $\beta$ -glucosidase from the thermophilic fungus *Humicola insolens*. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 272–278, 2010.

Suto, M.; Tomita, F. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. *Journal of bioscience and bioengineering*, v. 92, p. 305 -311, 2001.

Thongpoo, P.; McKee, L.S.; Araújo, A.C.; Kongsaree, P.T.; Brumer, H. Identification of the acid/base catalyst of a glycoside hydrolase family 3 (GH3)  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger* ASKU28. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1830, p. 2739–2749, 2013.

Tsukada, T.; Igarashi, K.; Yoshid, M.; Samejima, M. Molecular cloning and characterization of two intracellular beta-glucosidases belonging to glycoside hydrolase family 1 from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 73, p. 807–814, 2006.



van den Berg, M.A.; Albang, R.; Albermann, K.; Badger, J.H.; Daran, J.; Driessen, A.J.M.; Garcia-Estrada, C.; Fedorova, N.D.; Harris, D.M.; Heijne, W.H.M.; Joardar, V.; Kiel, J.A.K.W.; Kovalchuk, A.; Martin, J.F.; Nierman, W.C.; Nijland, J.G.; Pronk, J.T.; Roubos, J.A.; van der Klei, I.J.; van Peij, N.I.N.M.E.; Veenhuis, M.; von Dohren, H.; Wagner, C.; Wortman, J.; Bovenberg, R.A.L. Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. *Nature Biotechnology*, v. 26, p. 1161-1168, 2008.

Verdoucq, L.; Czjzek, M.; Moriniere, J.; Bevan, D.R.; Esen, A. Mutational and structural analysis of aglycone specificity in maize and sorghum  $\beta$ -glucosidases. *J. Biol. Chem.*, v. 278, p. 25055–25062, 2003.

Wallecha, A.; Mishra, S. Purification and characterization of two  $\beta$ -glucosidases from a thermo-tolerant yeast *Pichia etchellsii*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1649, p. 74–84, 2003.

Wanga, Q.; Qiana, C.; Zhang, X.; Liu, N.; Yana, X.; Zhou, Z. Characterization of a novel thermostable  $\beta$ -glucosidase from a metagenomic library of termite gut. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 51, p. 319–324, 2012.

Wang, L., Ridgway, D., Gu, T., Moo-Young, M. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. *Biotechnol. Adv.*, v. 23, p. 115–129, 2005.

Wen, Z.; Liao, W.; Chen, S. Hydrolysis of animal manure lignocellulosics for reducing sugar production. *Bioresour. Technol.*, v. 91, p. 31-39, 2004.

Withers, S.G. Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. *Carbohydrate Polymers*, v. 44, p. 325–337, 2001.

Wood, T.M.; McCrae, S.I. Purification and some properties of the extracellular  $\beta$ -glucosidase of the cellulolytic fungus *Trichoderma koningii*. *J. Gen. Microbiol.*, v. 128, p. 2973–2982, 1982.

Ximenes, E., Kima, Y., Mosiera, N., Dien, B., Ladisch, M. Inhibition of cellulases by phenols. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 46, p. 170–176, 2010.

Xu, Z.; Escamilla-Trevino, L.L.; Zeng, L.; Lalgondar, M.; Bevan, D.R.; Winkel, B.S.J.; Mohamed, A.; Cheng, C.; Shih, M.; Poulton, J.E.; Esen, A. Functional genomic analysis of *Arabidopsis thaliana* glycoside hydrolase family 1. *Plant Mol Biol.*, v. 55, p. 343–367, 2004.

Yagi, F.; Tadera, K. Substrate specificity and transglucosylation catalyzed by cycad  $\beta$ -glucosidase. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1289, 315-321, 1996.

Yang, S.; Jiang, Z.; Yan, Q.; Zhu, H. Characterization of a thermostable extracellular  $\beta$ -glucosidase with activities of exoglucanase and transglycosylation from *paecilomyces thermophile*. *J. Agric. Food Chem.*, v. 56, p.602–608, 2008.

Yang, S.; Wang, L.; Yan, Q.; Jiang, Z.; Li, L. Hydrolysis of soybean isoflavone glycosides by a thermostable beta-glucosidase from *Paecilomyces thermophila*. *Food Chem.*, v. 115, p. 1247–1252, 2009.

Yazaki, T.; Ohnishi, M.; Rokushika, S.; Okada, G. Subsite structure of the  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger*, evaluated by steady-state kinetics with cello-oligosaccharides as substrates. *Carbohydrate Research*, v. 298, p. 51-57, 1997.

Yeoh, H.H.; Tan, T.K.; Koh, S.K. Kinetic Properties of  $\beta$ -glucosidase from *Aspergyillus ornatus*. *Microbiol. Biotechnol.*, v. 25, p. 25—28, 1986.

Yoon, J.J.; Cha, C.J.; Kim, Y.S.; Son, D.W.; Kim, Y.K. The brown-rot basidiomycete *Fomitopsis palustris* has the endo-glucanases capable of degrading microcrystalline cellulose. *J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 17, p. 800-805, 2007.

Yvon, M.; Chabanet, C.; Pélissier, J.P. Solubility of peptides in trichloroacetic acid (TCA) solutions. Hypothesis on the precipitation mechanism. *Int. J. Pept. Protein Res.*, v. 34, p. 166-76, 1989.

Zagrobelny, M.; Bak, S.; Møller, B.L. Cyanogenesis in plants and arthropods. *Phytochemistry*, v. 69, p. 1457–1468, 2008.

Zanoelo, F.F.; Polizeli, M.L.T.M.; Terenzi, H.F.; Jorge, J.A.  $\beta$ -Glucosidase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose. *FEMS Microbiology Letters*, v. 240, p. 137–143, 2004.

Zechel, D.L.; Withers, S.G. Glycosidase Mechanisms: Anatomy of a Finely Tuned Catalyst. *Acc. Chem. Res.*, v. 33, p. 11-18, 2000.

Zheng, P.; Wang, J.; Lu, C.; Xu, Y.; Sun, Z. Immobilized  $\beta$ - glucosidase on magnetic chitosan microspheres for hydrolysis of straw cellulose. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 683-687, 2013.

Zhou, S.; Ingram, L.O. Synergistic hydrolysis of carboxymethyl cellulose and acid-swollen cellulose by two endoglucanases (CelZ and CelY) from *Erwinia chrysanthemi*. *J. Bacteriol.*, v. 182, p. 5676-5682, 2000.

Zilliox, C.; Deberie, P. Hydrolysis of wheat straw by a thermostable endoxylanase: Adsorption and kinetic studies. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 22, p. 58–63, 1998.