PAULO R. ADALBERTO

Produção, Isolamento e Caracterização de β-galactosidases de *Trichoderma reesei*: Interação de Íons Metálicos na Atividade Enzimática.

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos Requisitos para Obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: **Prof. Dr. Antônio Carlos Massabni**
Co-orientador: **Prof. Dr. Rubens Monti**

Araraquara
2005

DADOS CURRICULARES

Professor Paulo R. Adalberto

1 DADOS PESSOAIS

1.1 Nome	Paulo Roberto Adalberto
1.2 Data de Nascimento	25 de janeiro de 1964
1.3 Naturalidade	Araraquara-SP (Brasil)
1.4 Filiação	Pai: Joviro Adalberto Mãe: Alice Caliman Adalberto
1.5 Estado civil	Solteiro
1.6 R.G	16 691 981- 0
1.7 CIC	056 228 558 / 02
1.8 Título Eleitoral	105 034 001-41, zona 13, seção 82
1.9 CNH	42 108 221-6 Classe B/A 2
1.10 CDI	5CSM BA05 006 205070 B
1.11 Cart. Trab. Prev. Social	036151- 00186 - SP
1.12 Cert. Reg. Professor:	MEC: 1/9 382-LP
1.13 Residência	Av. Antônio P. Correia, 994- São José CEP-14 800-500, ARARAQUARA-SP
1.14 Telefone	residência (016) 232 0934
1.15 Endereço Eletrônico	prdlbrt@uol.com

2 FORMAÇÃO ACADÊMICA

2.1 Pré-universitária:

2º Grau EEPSG "Bento de Abreu"- Araraquara-SP

2.2 Universitária:

Licenciatura em Ciências Biológicas: concluída em 1987 pela FFCLRP-USP

2.3 Pós-graduação

Mestrado em Biotecnologia: Instituto de Química de Araraquara, sob orientação do P^{rof}. D$^{r.}$ Pedro M. Lacava. Data da defesa: 16/12/96.

Doutorado pelo programa de pós-graduação do Instituto de Química de Araraquara UNESP, sob orientação do P^{rof}. D$^{r.}$ Antônio C. Massabni. Data da defesa: 29/11/05.

3 PRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA

ADALBERTO, P. R.; GOULART, A. J.; BERGAMIN, S. C.; MONTI, R.; MASSABNI A. C. Produção e Purificação de uma β-galactosidase extracelular de *Trichoderma reesei*: Caracterização bioquímica e propriedades da metaloenzima. In: Enc..Reg. Quim, 12, 2001, Araraquara – SP.

ADALBERTO, P. R.; GOULART, A. J.; BERGAMIN, S. C.; MASSABNI, A. C.; MONTI, R. Production and partial Purification of the β-galactosidase of *Trichoderma reesei*. In: CBM, 21, 2001, Foz do Iguaçu-PR.

GOULART, A. J.; CONTIEIRO, J.; ADALBERTO, P. R.; MONTI, R. Evaluation of the production of invertase and xylanase for *Rhizopus sp* in diferent conditions of culture. In: CBM, 21, 2001, Foz do Iguaçu-PR.

GOULART, A. J.; CONTIEIRO, J.; ADALBERTO, P. R.; MASSABNI, A. C.; MONTI, R. Evaluation of the production of invertase and xylanase for *Rhizopus sp* in diferent conditions of culture. In: SLACA, n. 4, 2001, Campinas SP.

GOULART, A. J.; CONTIEIRO, J.; ADALBERTO, P. R.; MONTI, R. Evaluation of the production of invertase and xylanase for Rhizopus sp in different conditions of culture. In Semana da Química, 31, 2001.

GOULART A. J.; ADALBERTO, P. R.; AIROLDI, K.; FIRMINO. L. R.; CARDELLO, L.; MONTI, R. Produção das enzimas invertase e xilanase pelo fungo filamentoso *Rizopus sp* em meio semi-sólido. In: Jornada Farmacêutica UNESP, 14, 2002, Araraquara-SP.

ADALBERTO, P. R.; MASSABNI, A. C.; GOULART A. J.; CARDELLO, L.; AIROLDI K.; FIRMINO. L. R..; MONTI, R. Purificação e caracterização de isoformas de β-galactosidase de *Trichoderma reesei*. In: Jornada Farmacêutica UNESP, 14, 2002, Araraquara-SP.

AIROLDI, K.; FIRMINO. L. R.; GOULART A. J.; ADALBERTO, P. R.; MONTI, R.; CARDELLO, L. Purificação da enzima ascobrato-oxidase por eletroeluição extraída de abobrinha (Cucúrbita pepo medulosa). In: Jornada Farmacêutica UNESP, 14, 2002, Araraquara-SP.

FIRMINO. L. R.; AIROLDI K.;. GOULART A. J.; ADALBERTO, P. R.;. MONTI, R.; CARDELLO, L. viabilidade da purificação da enzima ascorbato-oxidase por eletroeluiçao com diferentes formulações na composição do gel de poliacrilamida. In: Jornada Farmacêutica UNESP, 14, 2002, Araraquara-SP.

GOULART, A. J.; FIRMINO, L. R.; ADALBERTO, P. R.; CARDELO, L.; MONTI, R. Purificação parcial e caracterização de invertase e xilanase produzida por *Rizopus sp.* In: BMCFB, 2002, Campinas-SP.

FIRMINO, L. R.; AIROLDI, K.; GOULART, A. J.; ADALBERTO, P. R.; MONTI, R.; CARDELLO, L. Purificação da enzima ascobato-oxidase por eletroeluição extraída de abobrinha *Curcubita pepo medulosa* para a determinação de Vitamina C em alimentos. In: BMCFB, 4, 2002, Campinas-SP.

ADALBERTO, P. R.; GOULART, A. J.; CARDELLO, L.; FIRMINO, L. R..; MONTI, R.; MASSABNI, A. C. Purificação e Caracterização da isoforma I de β–galactosidase de *Trichoderma reesei* In: BMCFB, 4, 2002, Campinas-SP.

ADALBERTO, P. R.; GOULART, A. J.; CARDELLO, L.; FIRMINO, L. R..; MONTI, R.; MASSABNI, A. C. Purificação e Caracterização da isoforma I de β–galactosidase de *Trichoderma reesei* In: Semana da Química, 32, 2002, Campinas-SP.

GOULART, A. J.; FIRMINO, L. R..; ADALBERTO, P. R.; CARDELLO, L.; MONTI, R.; MASSABNI, A. C. Purificação parcial e Caracterização de invertase e xilanase produzida por *Rhizopus sp* In: Semana da Química, 32, 2002, Campinas-SP.

GOULART A. J.; ADALBERTO, P. R.; MONTI, R. Purificação parcial e caracterização de invertase e xilanase produzida por *Rizopus sp* em fermentação semi-sólida. **Alimentos e Nutrição**, v.14, n.2, p.199-203, 2003.

BERGAMIM, S. C.; MARQUES, D. P.; CARMONA, E. C. ADALBERTO, P. R.; GOULART, A. J.; MONTI, R. Produção de xilanase em fermentação líquida por Trichoderma pseudokonigii. In: Congr. Bras. Cienc. Tecnol., 19, 2004.

ADALBERTO, P. R..; MASSABNI, A. C.; GOULART, A. J.; MONTI, R.; LAÇAVA, P. M.. Effect of the phosphorus on the mineral uptake and pigmentation of Azolla caroliniana Willd. (Azollaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 3, p. 581-85, 2004.

ADALBERTO, P. R.; A. C. MASSABNI, MONTI, R.; GOULART A. J.; AND V. MENOCCI Production of β–galactosidase by *Trichoderma reesei* FTKO-39 in wheat bran: partial purification of two isozymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, no prelo.

Quando – nos bondes, por exemplo, em lugares opostos – deparo com uma criança acompanhada de seus pais, admira-me sempre o fato de os traços do homem e da mulher, que nada tem em comum, aparecem harmonizados e unificados na pessoa do filho, tanto nas feições do rosto quanto na conformação do corpo. Primeiramente comparo a mãe ao filho e noto-lhes a grande semelhança; depois, o pai ao filho: igual semelhança; por fim, comparo o pai e a mãe entre si e espanto-me ao constatar que não têm nenhuma afinidade entre si.
Naquele momento, no trem, recordando-me disso, não pude deixar de imaginar como seria o seu pai, ao examinar o menino. Não pude deixar também de conjeturar sobre o destino atual de tal pessoa.

Abashiri made, Naoya Shiga (1883 - ?)

Dedico aos meus pais este trabalho
que, afinal, deles originou.

Tudo que é efêmero é uma alegoria;
Toda insuficiência é aqui essência;
O indescritível é aqui realizado.
O universo feminino nos atrai às alturas.

GOETHE, J. W. Corus misticus. **Fausto,** C. final.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof Dr Antonio Carlos Massabni por ter confiado neste trabalho, por tê-lo orientado de modo seguro e pela garantia de total liberdade de sua execução.

Ao Prof. Dr Rubens Monti pelo carinho e dedicação constante e pela amizade a qual sempre trarei comigo.

À Novozymes Latin America Ltd pela gentileza da oferta do extrato Lactozym 3000.

A Capes e a Fundunesp pelas bolsas concedidas.

Aos Profs Drs João Atílio Jorge e Cláudio Rosa Galo pelas linhagens de *Trichoderma reesei* utilizadas neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Elizeu Antonio Rossi pela pureza da água, ao Prof. Dr. Leonardo Cardello e demais professores do Departamento de Alimentos e Nutrição da FCF-ar pela amizade e apoio.

Ao Prof. Dr João Martins Pizauro Junior cujas orientações garantiram a melhor conclusão para este trabalho.

Ao Prof. Dr Sergio Leite por permitir o uso do seu laboratório quando da reforma do laboratório de Enzimologia de Alimentos.

Aos companheiros de laboratório Antonio, Marcos, Ligia, Karina, Olga, Daniela e entre outros que dividiram as bancadas, equipamentos, triunfos e derrotas na lida com o imponderável.

Ao laboratório de toxicologia do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia na pessoa da senhora Sandra Maria Sanches da Vinha de Lorenzo pelo apoio com a vidraria. Desnecessário dizer-lhe a importância.

Aos meus amigos, Hilton, Paula, André, Roberto, Zé Ricardo, Bruno e Odete, entre tantos outros, que com apoio e estímulo em todas horas fizeram as responsabilidades parecerem mais leves e os problemas menores.

E por falar em amigos, felizes os que os têm muitos, agradeço a compania e os ouvidos conscientes dos moradores da Puleiro dos Anjos e da Curva de Rio, marcas da vida acadêmica e do espírito universitário desta cidade.

Aos maestros Fúlvio Vassilíades e Glauber L. A. Santiago e as maestrinas Profa. Dra. Ilza Z. L. Joly, Lluba Dudnova e Édna N. Silveira por ter juntado tanta gente para tocar junto.

Às meninas da secção de Pós-graduação e da biblioteca, Patrícia Ribeiro de Mattos, Sandra Regina Pavanelli e Camila Cassiavilani. Fantásticas.

Ao Braga e à Lucia, meus parceiros. À Vera, ainda, pelas aulas de clarinete, fundamental é aprender.

À família Cavinatti por conhecerem o paraíso e nos terem levado até lá.

Aos meus amigos silenciosos e ciosos Gerard, Leonardo, Gabriel, Jânus, e Piquinha.

A minha amada Kazuko.

SUMÁRIO

I ÍNDICE DE TABELAS 12

II ÍNDICE DE FIGURAS 13

III RESUMO 14

IV ABSTRACT 14

1 INTRODUÇÃO 16

2 REVISÃO DA LITERATURA 18

2.1 A enzima β-galactosidase 18

2.2 Estrutura da β-galactosidase 18

2.3 Mecanismo de catálise da β-galactosidase 19

2.4 Ciclo catalítico da β-galactosidase 21

2.5 A importância dos metais na atividade da β-galactosidase 22

2.6 Diversidade funcional e estrutural da β-galactosidase 24

2.7 Purificação de β-galactosidases 25

2.8 Metaloenzimas. Investigação do centro metálico 26

2.9 Inibidores suicidas 28

3 PROPOSIÇÃO 31

4 METODOLOGIA 32

4.1 Fontes utilizadas de β-galactosidase 32

4.2 Condições de cultivo e produção da β-galactosidase 33

4.2.1 Meios de manutenção *33*

4.2.1.1 Meio ágar-aveia *33*

4.2.1.2 Meio Nakao-lactose *33*

4.2.2 Meios de Produção *34*

4.2.2.1 Meio Vogel *34*

4.2.2.2 Meio líquido M6 *34*

4.2.2.3 Meio semi-sólido de farelo de trigo *34*

4.3 Produção e extração da β-galactosidase **35**

4.4 Ensaio enzimático **35**

4.4.1 Determinação da atividade enzimática *36*

4.4.1.1 Atividade com o-NPG *36*

4.4.1.2 Medidas de atividade com reagente multienzimático *37*

4.4.2 Cálculo da concentração protéica *39*

4.4.2.1 Método de Lowry *39*

4.4.2.2 Leitura em 280nm *40*

4.5 Manipulação do extrato bruto e de suas frações **40**

4.5.1 Diálise *40*

4.5.1.1 Diálise com EDTA como quelante *42*

4.5.1.2 Eletrodiálise *42*

4.5.2 Precipitação e concentração do conteúdo protéico *43*

4.5.2.1 Precipitação com sulfato de amônio *43*

4.5.2.2 Precipitação com acetona *44*

4.5.2.3- Liofilização *45*

4.6 Fracionamento das enzimas **45**

4.6.1 Colunas de fracionamento por troca aniônica - DEAE-Trisacryl *45*

4.6.2- Colunas de filtração em gel Biogel P-100 *46*

4.6.3 Colunas de fracionamento por exclusão molecular Sephacryl *47*

4.6.4 Colunas de troca iônica S-Sepharose *47*

4.7 Eletroforeses **48**

4.7.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) para proteínas ácidas[60] *48*

4.7.1.1 Coloração em Comassie Brillant Blue *49*

4.7.1.2 Atividade da β-galactosidase em PAGE *49*

4.7.2 Eletroforese em condição desnaturante (SDS-PAGE) *50*

4.8 Caracterização das isoformas de *T. reesei* **51**

4.8.1 Parâmetros físico-químicos *51*

4.8.1.1 Temperatura ótima *51*

4.8.1.2 pH ótimo *52*

4.8.1.3 Estabilidade em pH *52*

4.8.1.4 Estabilidade térmica *52*

4.8.2 Parâmetros cinéticos *52*

4.8.3 Eficiência de imobilização em alginato das isozimas *53*

4.9 Necessidade de metal na atividade de β-galactosidases **53**

4.9.1 Limpeza do material *54*

4.9.2 Desativação da enzima com EDTA. Obtenção da apoenzima *54*

4.9.3 Reativação da enzima com diferentes metais *54*

4.10 Linearidade **55**

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES **56**

5.1 Seleção da linhagem e do método de cultivo. Produção da enzima **56**

5.2 Isolamento da enzima **57**

5.2.1 Processamento do extrato bruto *57*

5.2.2 Precipitação diferencial com $(NH_4)_2SO_4$ *59*

5.2.3 Fracionamento por coluna de troca aniônica DEAE-Trisacryl *60*

5.2.4 Fracionamento por exclusão molecular em Biogel P-100 *64*

5.2.5 Fracionamento por exclusão molecular em Sephacryl S-200 HR *66*

5.2.6 Fracionamento por exclusão molecular em Sephacryl S-300 HR *68*

5.2.7 Fracionamento por coluna de troca catiônica S Sepharose *70*

5.3 Eletroforeses **73**

5.3.1 Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) *73*

5.3.2 Atividade da enzima em gel de eletroforese nativa *75*

5.4 Caracterização das isoformas de *T. reesei* **FTKO** **76**

5.4.1 Parâmetros físico-químicos *76*

5.4.1.1 Temperatura ótima *76*

5.4.1.2 pH Ótimo *78*

5.4.1.3 Estabilidade térmica *79*

5.4.1.4 Estabilidade em pH *80*

5.4.2 Parâmetros Cinéticos *81*

5.5 Necessidade de metal na atividade de β–galactosidases **84**

5.5.1 Testes de desativação de BGT I: diálise com EDTA como quelante e eletrodiálise *84*

5.5.2 Padronização da desativação da enzima. Extrato Lactozym 3000 *85*

5.5.2.1 Caracterização de atividade e purificação do extrato Lactozym 3000 *86*

5.5.2.2 Desativação da enzima com EDTA *87*

5.5.2.3 Titulação da enzima com metais divalentes *89*

5.5.3 Titulação de BGT I com EDTA *94*

5.5.4 Eficiência de imobilização em alginato das isozimas *96*

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS **97**

7 REFERÊNCIAS **100**

I ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 comparação entre vários métodos de purificação de β-galactosidase 27
Tabela 4.1 composição do tampão de atividade para o método *o*-NPG 36
Tabela 4.2 composição do tampão de atividade para o método GOD/ANA 38
Tabela 4.3 soluções-estoque para a produção de solução Lowry A 39
Tabela 4.4 composição do tampão de diálise/EDTA 42
Tabela 4.5 solução C', acrilamida 48% 48
Tabela 4.6 solução fixadora de proteínas corridas em PAGE 49
Tabela 4.7 solução descorante de PAGE 49
Tabela 4.8 solução reveladora de atividade de lactase 50
Tabela 4.9 solução de acrilamida 30% 51
Tabela 5.1 atividade de β-galactosidase das linhagens de fungos estudadas. 56
Tabela 5.2 efeito de diferentes tratamentos sobre o extrato bruto na atividade enzimática 58
Tabela 5.3 precipitação com $(NH_4)_2SO_4$ do extrato dialisado de *Trichoderma reesei* FTKO 60
Tabela 5.4 purificação de β-galactosidases extracelulares de *T. reesei* FTKO 75
Tabela 5.5 atividade positiva de β-galactosidase em PAGE 6% 76
Tabela 5.6 parâmetros comparados de ambas isozimas 83
Tabela 5.7 eficiência dos tratamentos de desativação de BGT I 85
Tabela 5.8 purificação do extrato comercial Lactozym 3000 86
Tabela 5.9 eficiência da imobilização das isoforma de β-galactosidases 96

II ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Representação do tetrâmero da β-galactosidase. 19
Figura 2.2. Diagrama do monômero da enzima. 20
Figura 2.3. Intermediários X-enzima de reação de substituição nucleofílica. 21
Figura 2.4. Esquema da hidrólise do laço β-galactosídico catalisada pela β-galactosidase. 22
Figura 2.5. A importância metais bivalentes de β-galactosidase de *Saccharopolyspora rectivirgula*. 24
Figura 4.1. Esquema de um aparelho de eletrodiálise. 43
Figura 5.1. Estratégias de isolamento de β–galactosidases de *T. reesei* FTKO. 58
Figura 5.2. Padrão de corrida em eletroforese desnaturante (gel 12%). 59
Figura 5.3. Perfil cromatográfico DEAE-Trisacryl. 61
Figura 5.4. Perfil cromatográfico DEAE-Trisacryl. 62
Figura 5.5. Perfil cromatográfico DEAE-Trisacryl. 62
Figura 5.6. Perfil cromatográfico DEAE-Trisacryl. 63
Figura 5.7. Perfil cromatográfico DEAE-Trisacryl. 63
Figura 5.8. Perfil cromatográfico DEAE-Trisacryl. 64
Figura 5.9. Perfil cromatográfico Biogel P-100. 65
Figura 5.10. Perfil cromatográfico Biogel P 100. 65
Figura 5.11. Perfil cromatográfico Sephacryl S-200 HR. 66
Figura 5.12. Perfil cromatográfico Sephacryl S-200 HR 67
Figura 5.13. Perfil cromatográfico Sephacryl S-200 HR. 67
Figura 5.14. Perfil cromatográfico Sephacryl S-300 HR. 68
Figura 5.15. Perfil cromatográfico Sephacryl S-300 HR. 69
Figura 5.16. Perfil cromatográfico Sephacryl S-300 HR. 70
Figura 5.17. SDS-PAGE das frações ativas Sephacryl S-300 HR. 71
Figura 5.18. Perfil cromatográfico S Sepharose. 71
Figura 5.19. Perfil cromatográfico S Sepharose. 72
Figura 5.20. Perfil cromatográfico S Sepharose. 72
Figura 5.21. Perfil cromatográfico S Sepharose. 73
Figura 5.22. SDS-PAGE das etapas envolvidas no protocolo empregado. 74
Figura 5.23. Efeito da temperatura sobre a atividade das isozimas BGT I e BGT II.. 77
Figura 5.24. Tratamento de Arrhenius para a hidrólise de *o*-NPG por BGT I e BGT II. 78
Figura 5.25. Atividade de BGT I e de BGT II em função do pH. 79
Figura 5.26. Curvas de desativação térmica da hidrólise de *o*-NPG por BGT I e BGT II. 80
Figura 5.27. Estabilidade ao pH na hidrólise de *o*-NPG por BGT I e por BGT II 81
Figura 5.28. Curvas de Lineweaver-Burk obtidas com *o*-NPG de ambas β-galactosidases isoladas. 83
Figura 5.29. Curvas de Lineweaver-Burk obtidas com lactose de ambas β-galactosidases isoladas. 84
Figura 5.30. Cromatografia Sephacryl S 200 HR do extrato comercial Lactozym 3000. 86
Figura 5.31. Desativação tempo dependente do extrato Lactozym 3000 em tampão fosfato. 88
Figura 5.32. Desativação tempo dependente extrato Lactozym 3000 em tampão Tris/HCl. 88
Figura 5.33. Reativação de β-galactosidase (Lactozym 3000) por Mg^{2+}. 90
Figura 5.34. Reativação de β-galactosidase (Lactozym 3000) por Mn^{2+}. 91
Figura 5.35. Reativação de β-galactosidase (Lactozym 3000) por Co^{2+}. 93
Figura 5.36. Reativaçao de β-galactosidase (Lactozym 3000) por Ni^{2+}. 93
Figura 5.37. Reativação de β-galactosidase (Lactozym 3000) por Zn^{2+}. 94
Figura 5.38. Reativação de β-galactosidase (Lactozym 3000) por Eu^{3+}. 94
Figura 5.39. Teste de desativação de β-galactosidase de *Trichoderma reesei* FTKO. 95
Figura 5.40. Teste de desativação de β–galactosidase de *Trichoderma reesei* FTKO. 96

III RESUMO

A β-D-galactopiranosídeo hidrolase é uma enzima com ampla aplicação tecnológica, clínica e experimental. A enzima possui um íon de metal bivalente coordenado. Para se obter informações a respeito do centro metálico da enzima, algumas espécies de fungos filamentosos foram testadas para a produção de β–galactosidase, ente as quais, a linhagem de *Trichoderma reesei* FTKO foi selecionada. O extrato enzimático, ao passar pelo processo de purificação, revelou ao menos duas isoformas de β-galactosidase identificadas como BGT I e BGT II. As enzimas são termofílicas e termotolerantes. A dependência do pH para a atividade, os valores de medidas cinéticas e a atividade revelada em gel de poliacrilamida distinguem as isozimas. Para avaliar a necessidade de metais bivalentes foi padronizada uma metodologia de desativação da enzima, apoiado na competição entre o agente seqüestrante e a enzima pelos metais. A metodologia foi aplicada ao o extrato comercial Lactozym 3000 (Novozyme Latin America Ltd.) revelou a necessidade de metal para a sua atividade com a desativação seguida de reativação pelos íons Mg^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, mas não por Zn^{2+} e Eu^{3+}. A enzima BGT I (pH ótimo de 4,5) mostrou-se, contudo, resistente à desativação, pois se mantém ativa mesmo em altas concentrações de EDTA.

Palavras-chaves: *Trichoderma reesei*, β-galactosidase, sítio metálico

IV ABSTRACT

The β-D-galactopiranosyde-hidrolase is an enzyme with large technological, clinic, and scientific application. The enzyme coordinates a bivalent metal ion. In order to investigate the metal center of the enzyme of moulds, some strains were tested for β–galactosidase production. Among then, *Trichoderma reesei* FTKO were selected. The partially purified enzymatic extract reveals the production of two isoforms of β-galactosidase, at least. This enzymes are identified as BGT I e BGT II. Both are termophylic and thermotolerant. The pH dependence, the measured kinetic values and the activity revealed in polyacrylamide electrophoresis gels distinguished the isozymes. The metal assistance of enzymatic activity was evaluated in a standard deactivation methodology of enzyme by competition for the metal by chelating agent and metal site of enzyme. When this methodology was applied in the deactivation of commercial extract Lactozym 3000 (Novozyme Latin America Ltd.), revealed the metal importance for activity. The deactivation was reverted by metals ions as Mg^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, but not by Zn^{2+} or Eu^{3+}. On the other hand BGT I enzyme (optimal pH of 4,5) maintained the activity, even in high concentration of EDTA.

Palavras-chaves: *Trichoderma reesei*, β-galactosidase, metal binding site

V ABREVIATURAS

E. C.	Enzyme Commission
T. reesei	*Trichoderma reesei*
BGT I	Isoforma I de β-galactosidase de *T. reesei*
BGTII	Isoforma II de β-galactosidase de *T. reesei*
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS PAGE	Eletroforese em condições desnaturantes
DEAE-Trisacril	Dietilaminoetil-Trisacryl
S-Sepharose	Sulfidril-Sepharose
EDTA	Etilenodiamina tetraacético
Tris	Trisetilaminoetano
U A	Unidade de atividade enzimática ($mmol.min^{-1}.mL^{-1}$)
U esp	Unidade de atividade específica ($mmol.min^{-1}.mg^{-1}$)
Å	Angstron = $10^{-10}m$

1 INTRODUÇÃO

A β-D-galactosídeo-galactohidrolase, EC 3.2.1.23 é uma enzima muito versátil e de larga aplicação clínica, tecnológica e industrial[1]. A bactéria *Escherichia coli* produz a mais estudada β-galactosidase cuja estrutura cristalina é formada por quatro monômeros idênticos e cada um possui um metal coordenado[2]. A enzima é largamente distribuída na natureza e , ainda que produzida por diversas fontes, suas propriedades e estruturas exibem certa uniformidade com a β–galactosidase da *E. coli*[3, 4].

A β-galactosidase tem servido tradicionalmente como modelo de estudo para diversas aplicações. O operon *Lac*, por exemplo, teve um papel fundamental na elucidação da expressão gênica[4]. Clones com a excisão de um peptídeo putativo em β-galactosidase de exportação serviram de modelo para o transporte de proteína expressa. O emprego de substratos análogos forneceu informações sobre o mecanismo do ataque nucleofílico ao substrato[5, 6]. Inibidores competitivos indicam a possibilidade de generalização de modelos para toda classe de hidrolases[6].

As espécies de β-galactosidases são dependentes de íons metálicos bivalentes. Os resíduos na esfera de coordenação do metal, assim como os aminoácidos envolvidos no processo catalítico, foram identificados[1]. Metodologias de desativação com conseqüências cinéticas indicam a necessidade de metais na manutenção da estrutura e da atividade enzimática[7].

A proposição deste trabalho de avaliar o centro metálico de β- galactosidase, foi conduzida a partir da produção e do estabelecimento de vias de isolamento da enzima produzida por diferentes espécies de fungos filamentosos. Após o teste entre as linhagens e de modos de cultivo, selecionou-se o meio semi-sólido e a linhagem FTKO do fungo *Trichoderma reesei* para a produção do extrato com atividade do qual se procedeu a purificação de β-galactosidase. O protocolo de purificação utilizou cinco etapas compreendidas em: clarificação em terra

diatomácea, precipitação com sulfato de amônio (30-70%), troca aniônica (DEAE-Trisacryl), filtração em gel (Sephacryl S-300 HR), e troca catiônica (S Sepharose).

O procedimento de isolamento da enzima levou a formação de um agregado que impediu que se atingisse a homogeneidade na purificação. A cromatografia de troca aniônica e a atividade registrada em gel de eletroforese (PAGE 6%) revelaram duas isozimas produzidas pelo microorganismo com características distintas. As isozimas foram identificadas como BGT I e BGT II.

BGT I apresenta pH ótimo em torno de 4,5, energia de ativação de 32.5 Kcal mol^{-1}, Km de 1,65 mmol L^{-1}(ONPG) e 21,68 mmol L^{-1}(lactose) V_{max}. 0,55 μmol min^{-1} mg^{-1} e 0,26 μmol min^{-1} mg^{-1} para ONPG e lactose respectivamente. BGT II apresenta pH ótimo em torno de 6,5, energia de ativação de 35.2Kcal mol^{-1}, Km de 2,66 mmol L^{-1}(ONPG) e 19,01 mmol L^{-1}(lactose) V_{max}. 0,41μmol min^{-1} mg^{-1} e 0,18 μmol min^{-1} mg^{-1} para ONPG e lactose respectivamente. Ambas caracterizam-se como termofílicas A enzimas exibem alta estabilidade a 65° C. A isoforma BGT II demonstrou ser mais sensível que a isoforma BGT I às variações de pH.

O extrato enzimático comercial de *Kluyveromyces lactis*, Lactozym 3000 foi desativado por EDTA e reativado por Mg^{2+} e Mn^{2+} e com menor eficiência por Co^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{2+}; foi testada também a reativação por európio. A β-galactosidase de *T. reesei*, no entanto, não foi desativada usando a metodologia padronizada. Ao fim, tendo em vista a importância dos metais na imobilização de enzimas foi avaliada a eficiência da imobilização das isozimas em alginato de sódio.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A enzima β-galactosidase

A β-galactosidase (EC 3.2.1.23), é o produto do gene lacZ em *Escherichia coli*[1], também pode ser purificada de outras fontes vegetais e microbianas[8], todas com alta homologia nas seqüências primárias[4]. Seu papel fisiológico é a hidrólise de β-galactosídeos redutores de oligossacarídeos, polissacarídeos ramificados como galactomananas e da fração polissacarídica de glicoproteínas[8, 9]. À função biológica desta enzima deve-se acrescentar o interesse pelo seu uso rotineiro em diagnóstico molecular, como marcador gênico[9], como modelo de estudos de catálise enzimática[1, 5] e de evolução molecular[10, 4], salienta-se sua larga aplicação tecnológica como a industrialização de laticínios[11] e o tratamento de eflúvios[12].

2.2 Estrutura da β-galactosidase

A β-galactosidase de *E. coli* é uma enzima bem caracterizada em suas estruturas cristalina e molecular[9], no seu mecanismo de reação[13, 14, 15, 16], controle genético[4, 9] e aplicação tecnológica[9, 11]. Um de seus aspectos mais estudados e cuja função ainda carece de uma explicação mais precisa é o centro metálico, representado por um íon divalente, geralmente Mg^{+2}, complexado ao esqueleto peptídico[8, 14].

A estrutura cristalina da β-galactosidase indica um tetrâmero com simetria pontal 222 com dimensões de 175x135x90Å ao longo dos eixos de ordem 2. Consiste de quatro subunidades idênticas do tipo α_4 (figura 2.1), os monômeros são compostos de cinco domínios e 50 resíduos adicionais no N-terminal. A participação desse segmento aminoterminal no estabelecimento da interface entre duas subunidades está de acordo com a observação de que cada monômero ativo

é formado por elementos de duas subunidades diferentes. Este fenômeno é conhecido como α-complementação[2, 10].

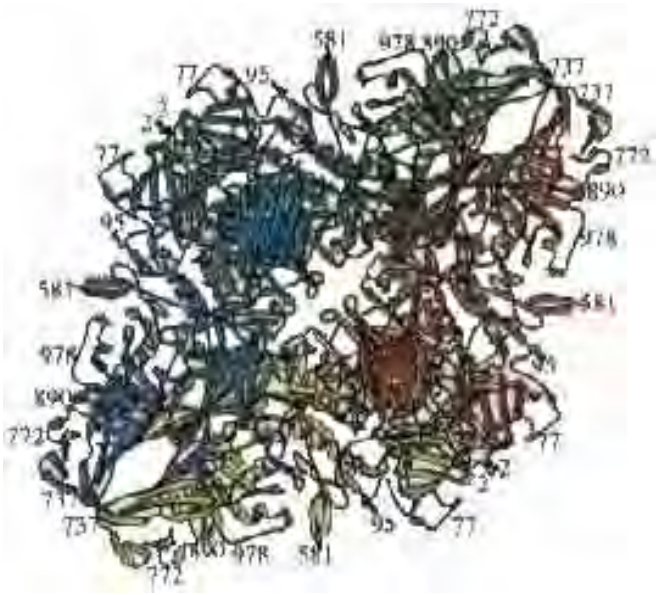


Figura 2.1. Representação do tetrâmero da β-galactosidase e contato com os monômeros[2].

O primeiro domínio corresponde a um barril de folhas β adelgaçado. O segundo domínio apresenta uma conformação fibronectina-III típica e é responsável pelo reconhecimento e pelo estabelecimento da interface com o monômero vizinho. No terceiro domínio encontram-se o sítio catalítico e o metal divalente coordenado. O quarto domínio é similar ao segundo. O quinto domínio é formado por um sanduíche de fitas β e contribui com o resíduo W 999 (W = TRP) no sítio ativo, apresentado na figura 2.2[2].

2.3 Mecanismo de catálise da β-galactosidase

A hidrólise da ligação β-1,4-D-galactosídica foi experimentalmente considerada dependente da estrutura química e das interações eletrostáticas do substrato, ou inibidores análogos, com a enzima. O mecanismo de catálise envolve uma reação de duplo deslocamento, na qual a enzima forma e hidrolisa um intermediário glicosil-enzima *via* um estado de transição, provavelmente galactosilada no íon carboxilato de um resíduo glutâmico[1, 16]. Essa ligação

covalente pode ser reconhecida na investigação do intermediário cataliticamente competente através de ressonância magnética de ^{19}F. A catálise, de caráter ácido/base, parece ser comandada pelos resíduos de Y-503[15] (Y = TYR), ou ainda, por outros resíduos, adjacentes ao sítio ativo da enzima. O comportamento é comum em enzimas hidrolíticas. A dissociação do intermediário tem uma constante da ordem de 1200 s^{-1}, um "turnover" alto, o que torna difícil a observação direta desse estado[13].

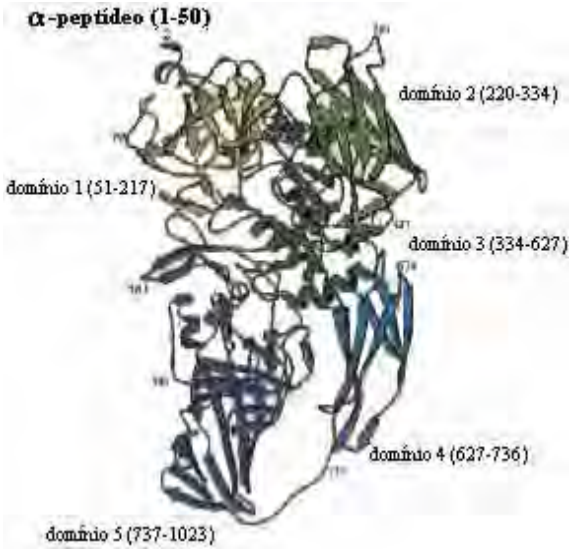


Figura 2.2. Diagrama do monômero da enzima. Os domínios estão identificados em cores sucessivas no espectro[2].

Muitos detalhes da catálise enzimática da transferência do grupo glicosil para nucleófilos neutros ou aniônicos encontram-se ainda obscuros[1]. Tais reações podem ocorrer *via* mecanismo de reação de substituição nucleofílica bimolecular A_ND_N (S_N2) ou substituição nucleofílica unimolecular $A_N + D_N$ (S_N1), como se observa nas reações de substituição em solução para nucleófilos alifáticos. Ambos mecanismos são favorecidos pelo fato do íon oxocarbênio do substrato ser estabilizado pela ressonância eletrônica com o oxigênio-α, figura 2.3-A. Tais reações de substituição no derivado α-alcóxido podem seguir como o mecanismo de reação contínua, através de um estado de transição que permite a formação de um intermediário, figura 2.3-B, ou a formação do carbocátion, figura 2.3-C. Como o carbono central é similar em ambos os estados

de transição os possíveis mecanismos para as substituições nucleofílicas apresentam-se muito semelhantes[5]. Isto reflete a exploração ainda a ser realizada para tais reações e dimensionam as dificuldades em se estudá-las.

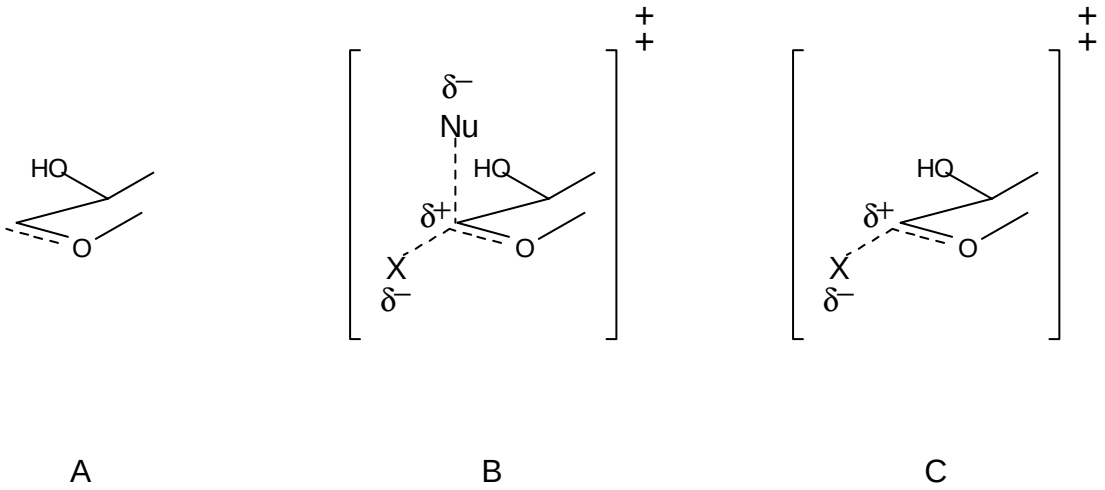


Figura 2.3. Oxocarbênio do substrato glicosídico (A) e intermediários X-enzima de reação de substituição nucleofílica bimolecular (B) e unimolecular (C)[5].

2.4 Ciclo catalítico da β-galactosidase

Nos últimos anos os aminoácidos envolvidos no processo catalítico, assim como os de coordenação do metal ligado à β-galactosidase, principalmente de *Escherichia coli*, foram identificados[1]. Para a caracterização foram empregados inibidores químicos competitivos pelo sítio ativo[6], os resíduos conservados em isozimas de diferentes fontes foram mapeados e identificados, avaliou-se a conseqüência de suas substituições em estudos aplicando-se mutagêneses sítio-dirigidas e identificaram-se as ligações covalentes entre o substrato, ou sondas análogas, com os resíduos resultantes da digestão de enzimas marcadas[1, 5, 13, 16, 17, 18].

Os perfis de atividade e outros dados cinéticos obtidos da enzima selvagem, ou não, foram bem descritos por diversos grupos. Com isso, pode se identificar os resíduos Y-503[15], M-502[2], H-537[17], E-537[16], E-461[13, 1] (M = MET, H = HIS, E = GLU) e seus respectivos papéis no

mecanismo do ataque nucleofílico ao substrato. A figura 2.4 ilustra o processo catalítico proposto para a β-galactosidase[8].

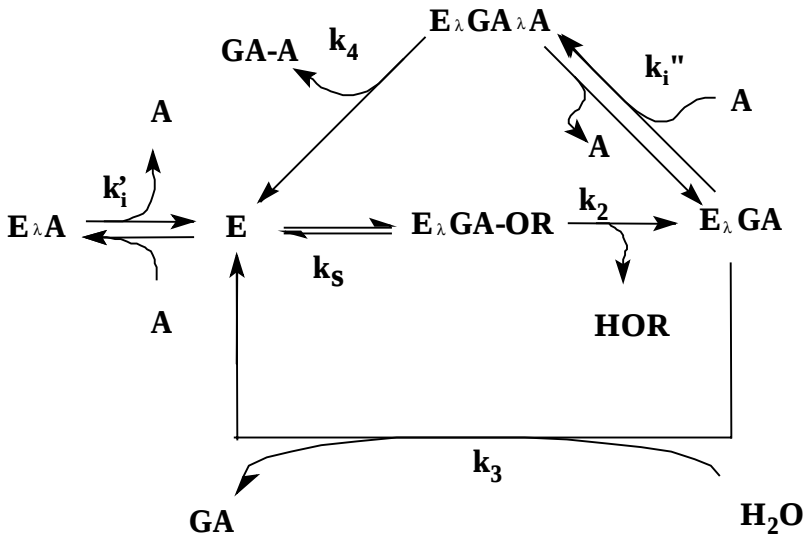


Figura 2.4. Esquema da hidrólise do laço β-galactosídico catalisada pela β-galactosidase.

As reações postuladas para a enzima estão esquematizadas na figura 2.4. A enzima livre sofre inibição competitiva e a enzima galactosilada inibição não competitiva na presença de aceptores (inibidores). Na figura 2.4 E representa a enzima β-galactosidase, GA-OR o substrato β-1,4-D-galactosídico; GA, galactose; HOR, produto aglicona da digestão; A, aceptor (inibidor); GA-A, aducto galactosil-aceptor. A etapa com a constante k_2 é chamada de "galactosilação" e a etapa que possui k3 como constante é chamada "degalactosilação"[8].

2.5 A importância dos metais na atividade da β-galactosidase

A necessidade da coordenação com o metal divalente para a manutenção da estrutura e da atividade catalítica da β-galactosidase de *E. coli*[1, 2, 5, 14] e de *Kluyveromyces spp.*[4, 12] tem sido observada. A enzima requer um íon magnésio, ou manganês, por monômero e ativadores como Na^+ e K^{+12}. Na ausência de Mg^{2+} ou de Mn^{2+} a β-galactosidase apresenta apenas 6% de sua atividade máxima

quando complexado o íon magnésio[8]. O Ca^{2+} compete com esses metais pelo centro metálico sem, no entanto, ativar a enzima[12, 18]. Não obstante o papel dos metais no mecanismo enzimático seja largamente estudado, este ainda não se encontra devidamente detalhado[9]. Na hidrólise de sais de β-D-galactopiranosil-piridínio a remoção de Mg^{2+} aumenta a eficiência catalítica (Km/k_{cat})[14]. Essas considerações remetem às atuais pesquisas no sentido de se esclarecer os menores detalhes da participação do metal na estrutura e na atividade da enzima.

Usando técnicas de mutação sítio-dirigida certos resíduos foram substituídos e as propriedades cinéticas, os perfis de atividade e a capacidade de coordenação das enzimas substituídas foram testados. Com isso foi possível determinar os resíduos coordenados ao metal (histidinas como H-351 E H-453[19] e H-418[18] são fortes candidatas a serem estes agentes coordenantes). A relação molar entre o monômero ativo da galactosidase por íon metálico é de 1:1. As constantes de dissociação, k_d, são da ordem de $2{,}8 \times 10^{-7}$ $mol.L^{-1}$ para o magnésio e de $1{,}1 \times 10^{-8}$ $mol.L^{-1}$ para o manganês, sendo o primeiro, o metal fisiológico da enzima[8, 20]. As informações, ainda que variadas, não concluem o efetivo papel do metal na enzima.

Viratelle[19] e Sinnot[14] indicaram a flexibilidade conformacional da enzima mediada por Mg^{2+} com um modelo a partir de estudos cinéticos[19]. Harada[21], num estudo profundo das ligações metálicas que a enzima de *Saccharopolyspora rectivirgula* apresenta, aponta as possíveis interações, usando uma combinação de técnicas que lhe permitiram retirar, substituir os metais em seus devidos sítios. A figura 2.5 ilustra os sítios propostos, estequiometria e cinética de ligação dos metais em seus respectivos sítios.

Estes resultados devem ser cuidadosamente analisados, pois deve-se levar em conta a biodiversidade das fontes de β-galactosidase e suas características particularidades. A β–galactosidase é uma metaloenzima metaloativada de modo que outros íons estão associados na sua atividade, ainda que não estejam ligados ao seu sítio catalítico[8]. Os metais podem ainda estar associados a efeitos na atividade da enzima, como a formação de monômeros inativos em presença de Ag^{+} a partir de seus dímeros ativos de uma β-galactosidase de *Escherichia coli*[22]. Estes

resultados indicam as funções dos diferentes metais na atividade da enzima e o quanto há por ser esclarecido sobre o papel dos metais na atividade da enzima.

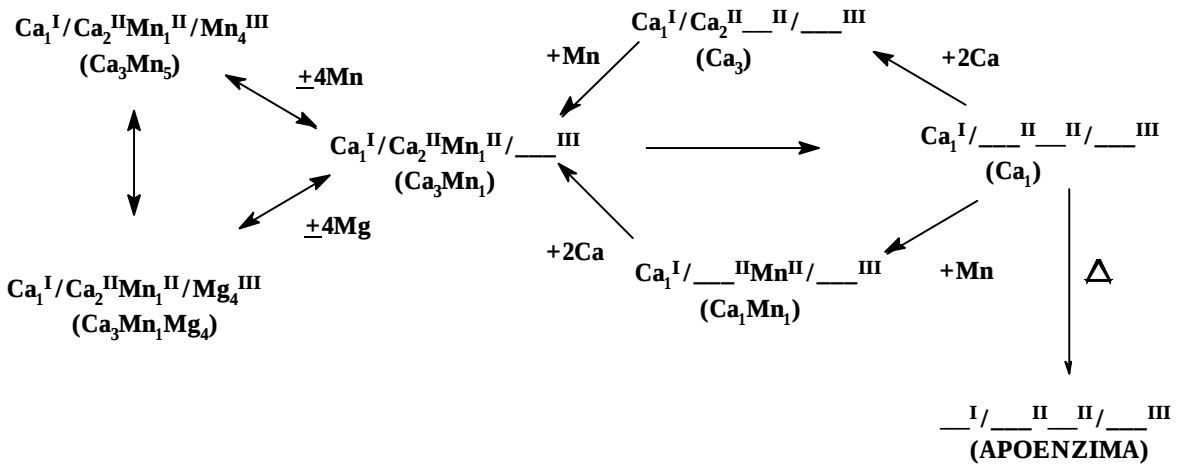


Figura 2.5. A importância metais bivalentes (Ca^{2+}, Mg^{2+} e Mn^{2+}) de β-galactosidase de *Saccharopolyspora rectivirgula*. As setas à direta indicam a remoção do metal e as orientadas à esquerda a adição do metal indicado, △ indica a remoção irreversível do metal por calor[21].

2.6 Diversidade funcional e estrutural da β-galactosidase

A β-galactosidase é uma enzima largamente distribuída na natureza e tem origem em uma grande variedade de fontes, tais como fermentações obtidas com bactérias, leveduras, células animais ou vegetais e mesmo de extratos de fluídos naturais[23]. Além da variedade verificada entre as espécies produtoras, surpreende diferentes genes decodificarem β-galactosidases com propriedades distintas em uma única espécie. Gutshall *et al*[3] descreveram três seqüências que decodificam a enzima em *Arthrobacter*. A abordagem molecular ao ser aplicada no estudo do papel que a β-galactosidase tem na maturação de frutas e germinação de sementes de uma certa espécie de feijão detectou o padrão de acumulação de transcritos durante o processo. A hibridização "Northern blot" reconhece cinco isoformas de β-galactosidase em sementes de *Phaseolus aureus*[24].

Uma questão que se coloca a respeito da variedade de isoformas produzidas pelo mesmo organismo se refere às razões que levam para o fato de uma bactéria conter vários genes codificando diferentes β-galactosidases. Embora uma explanação mais completa aguarde outras possíveis confirmações, isolados de *Bifidobacterium* indicam a regulação de seus genes pela especificidade ao substrato ou por diferente destino na compartimentalização celular[25]. Certas células produzem várias isoformas da enzima provavelmente como reflexo das exigências fisiológicas que o organismo apresenta ao longo de suas funções e indicam a variedade de β-galactosidases[21, 23, 24].

A enzima, além da hidrólise normal da ligação galactosídica, pode também catalisar a transferência de grupos galactosil para produzir galactooligossacarídeos[21]. Os produtos desta atividade transgalactosílica são aproveitados por bactérias da flora intestinal como fator de promoção de crescimento. Esta reação de transgalactosilação pode ser registrada em β-galactosidase expressa por *Bifidobacterim spp* [25].

Não obstante a enzima ser produzida pelas mais distintas linhagens, suas propriedades e estrutura exibem alto grau de conservação. As enzimas de bactérias minimamente relacionadas exibem propriedades estruturais com certa uniformidade estrutural com o tipo de β-galactosidase de *E. coli*. Sob condições nativas, certas enzimas se apresentam como multímeros ou dímeros e são conhecidas formas monoméricas ativas[23]. As espécies de β-galactosidases são , ao que tudo indica, dependentes de íon metálico bivalente. A necessidade de magnésio foi apontada por Jacobson *et al* [2] e avaliada também por Hoyoux *et al*[23].

2.7 Purificação de β-galactosidases

O estímulo dado pela aplicação tecnológica da enzima levou vários laboratórios a investirem em estratégias para sua purificação. Para frações de uso comercial a pureza é um fator de estabilidade. Enzimas quiméricas objetivando uma purificação mais rápida, eficiente e com

menores custos, são disponíveis. Vian *et al* [26] estabeleceram a metodologia de partição a qual procede-se em uma única etapa em coluna de afinidade. Isto se torna possível com uma proteína de fusão expressa com o sitio de ligação de colina da amidase de pneumococo em seu N-terminal.

A cromatografia de um novo tipo de enzima requer exaustivo esforço para selecionar as interações entre as matrizes das fases estacionárias e a proteína. Após essas determinações é que são possíveis as construções de protocolos para a obtenção da enzima pura. Diversos esquemas de produção e purificação são apresentados na literatura com resultados que lhes apontam a eficiência. A tabela 2.1, elaborada por Clemmitt[27], atesta a possibilidade de se proceder, em tempos relativamente curtos, a purificação de quantidades relativamente altas de β-galactosidase.

A riqueza de dados sobre as estratégias de isolamento na literatura nas mais diversas condições [24, 27, 28, 29], é reflexo da diversidade de fontes, modo de produção e das diferenças entre as amostras.

2.8 Metaloenzimas. Investigação do centro metálico

Metais são requeridos em quantidades traço nas células onde se associam especialmente a proteínas[7, 30, 31, 32, 33]. O tipo de interação entre a estrutura quaternária da molécula protéica e o metal distingue as enzimas metaloativadas das metaloenzimas[34, 35]. Enzimas metaloativadas possuem metais fracamente associados, normalmente interagindo na interface da enzima com o meio[12, 36]. O termo metaloenzima não se refere apenas às enzimas cujo sítio catalítico possuem metal, mas a todas aquelas estruturadas com íons metálicos os quais podem participar na catálise, orientar o substrato nos sítios de atividade, ou na estabilização das suas estruturas[37]. Aproximadamente um terço das enzimas conhecidas dependem de metal para sua completa ativação. Os metais são, portanto, essenciais nos processos bioquímicos e a química de coordenação oferece uma contribuição fundamental para decifrar o papel dos metais nas biomoléculas[37].

Tabela 2.1 comparação entre vários métodos de purificação de β-galactosidase

Nº. de etapas	Procedimento	Capacidade (U mL^{-1})	Rendimento (%)	Purificação (X)	U_{esp} (U mg^{-1})	Produtividade (U.mL^{-1}.min^{-1})
1	Cromatografia de afinidade metálica de leito expandido	118 a 140	86,4	5,95	155	2,9 a 10
1	Cromatografia de troca aniônica de leito expandido		83	2,2	37,3	
1	Troca iônica de leito expandido	84	63,0	6,0	28,0	
3	Extração por partição com solventes		78	-	79	
	Cromatografia de troca iônica		68	6,33	500	
	Cromatografia de afinidade de metal imobilizado (Ni^{2+} agarose)		65	8,1	640	
	Centrifugação					
5	Choque térmico					
	Centrifugação					
	Precipitação					
	Centrifugação		62,5	4,33	132	
3	$(NH_4)_2SO_4$					
	Centrifugação					
	Cromatografia de afinidade		87,2	9		
2	Extração por partição de fases		75	12	260	
	Centrifugação					

Fonte: CLEMMITT, R. H.; CHASE, H. A. Immobilized metal affinity chromatography of β-galactosidase from unclarified *Escherichia coli* homogenates using expanded bed adsorption. **J Chromatogr A.** v. 874, n. 1, p. 27-43, 2000

Os detalhes da função dos íons diferem para cada metaloenzima específica, mas a regra generalizada é de que estes íons ligam-se estequiometricamente ao polipeptídio e favorecem o reconhecimento ou a ativação do substrato [33, 38, 39,40]. A compreensão da estrutura fina de uma metaloenzima revelou os detalhes sobre as ligações dos centros metálicos com as biomoléculas. Os centros metálicos são invariavelmente pontos de partida para os estudos mecanísticos e para análises computacionais que orientam a modelagem química[41]. A força e as limitações dos métodos de análises estruturais têm sido aplicadas na determinação das propriedades biológicas

dos centros metálicos e da esfera de coordenação com os ligantes[42]. As estratégias de investigação envolvem os efeitos destes metais na atividade da enzima e se apóiam na complementaridade das técnicas espectroscópicas para obter as informações estruturais. Entre estas a definição da estrutura cristalina oferece a caracterização mais completa de uma metaloenzima[40].

Entre as metas da proteômica estrutural estão as representações tridimensionais de proteínas e seus domínios. Estas informações podem ser encontradas à disposição em base de dados as quais aceitam entradas com estruturas definidas das enzimas ou mesmo de modelos computacionais. A base "Metalloprotein Database and Browser" (MDB) que oferece estes dados de dos sítios metálicos de varias metaloenzimas, foi automaticamente construída com os dados disponíveis no Banco de dados PDB (Protein Data Bank)[43].

Os metais co-purificados com as enzimas podem ser ensaiados em função da concentração de agentes complexantes de metais[30, 44, 45]. A construção de perfis de desativação ilustra aspectos da coordenação metálica. Em muitos casos é possível a remoção dos íons metálicos com a conseqüente desativação da enzima[30, 31, 32]. A enzima cujo metal é eficientemente removido é chamada de apoenzima. Uma vez obtida a apoenzima a adição do metal pode promover restauração da atividade. A estequiometria metal/subunidade pode ser calculada experimentalmente através de diálise de equilíbrio[46, 47], não apenas com o metal fisiológico como também metais que os mimetizem nos sítios de coordenaçãos[6, 30, 44, 45].

2.9 Inibidores suicidas

Uma valiosa técnica para a inspeção da atividade catalítica aplica inibidores[6]. Os 1,2-anidroinositóis com o grupo hidroxil correspondente àqueles dos substratos reagem covalentemente com o sítio catalítico, particularmente com os grupamentos carboxílicos de resíduos ácidos de inúmeras glicosidases[48]. O conduritol C desativa irreversivelmente a β-galactosidase por seus grupos hidroxilados mimetizarem a galacto-configuração dos substratos da enzima[49, 48, 50, 51].

As evidências de que o inibidor reage com o sítio ativo são muitas, entre as quais podem ser citadas a especificidade e a competição da reação. A preferência por determinado isômero revela a especificidade da enzima com relação à orientação espacial do substrato. Isto ocorre tanto com o grupo responsável pelo ataque nucleofílico quanto com o doador de prótons ao oxigênio do epóxido[49]. Outro aspecto importante é o efeito protetor que os substratos naturais têm exibido em testes de inibição por diversos grupos com glicosidases diferentes[51]. Esse fenômeno tem sido explorado por pesquisadores para se estabelecer os papéis dos resíduos entre outros aspectos da atividade catalítica desta classe de enzimas[6].

Os primeiros testes de inibição de glicosidases foram conduzidos com bromo-inositol e a dependência dessa inibição, como foi mais tarde provada, refere-se ao derivado epóxido[48]. De fato, o conduritol B é 10^3 vezes mais eficiente para o teste. A reação normal consiste na abertura do anel epóxido originando um derivado diaxal. As enzimas discriminam entre os enantiômero D e L de modo que apenas o 1-D-1,2-anidro-myo-inositol demonstra a propriedade inibitória do composto[48], este origina o (+)-chiro-inositol após a reação. A figura 2.6 esquematiza a reação do conduritol B com β-glicosidases.

A inibição covalente das glicosidases, chamada de inibição suicida, tornou possível identificar o grupo funcional que age como nucleófilo. Com base nos aspectos estruturais, na proteção da enzima por competidores e na estequiometria (relação enzima/inibidor 1:1) o conduritol C contempla as necessidades para essa inibição[52]. Os 2-desoxi-2-fluoroglicosídeos, por sua vez, apresentam a melhor especificidade da inibição conhecida[53].

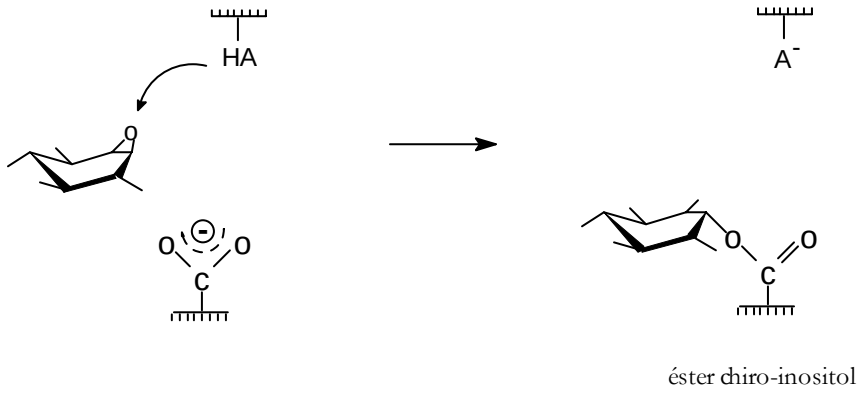


Figura 2.6: Esquema de inibição de uma β-glicosidase por conduritol B[51].

Embora os dados cristalográficos sejam os mais informativos para o estudo de estruturas tridimensionais de enzimas existem algumas limitações para sua aplicação na química bioinorgânica. As técnicas espectroscópicas podem fornecer esses dados complementando as informações necessárias. Por outro lado espera-se que o maior trânsito de informações referentes às sínteses de moléculas menores venha a fornecer muitas destas contribuições, a maioria delas com base em dados espectroscópicos[43, 54]. Este trabalho se insere nas iniciativas de se criar estas possibilidades.

3 PROPOSIÇÃO

A proposição deste trabalho é a investigação das interações de metais com a β-galactosidase de fungos filamentosos. Para tal finalidade foram definidas como metas:

- Selecionar as condições de produção e de isolamento da enzima por linhagens de fungos filamentosos.

- Definir o perfil da produção de β-galactosidase e das características físico-químicas e cinéticas da enzima produzida pelo fungo selecionado.

- Definir as condições de desativação reversível pela manipulação do sitio metálico na enzima.

- Definir condições para a reativação da enzima com magnésio, manganês, cobalto, níquel, zinco e európio.

- Aplicar as condições de desativação definidas para a enzima do microorganismo examinado.

- Avaliar as conseqüências da substituição de metais na atividade de β-galactosidase.

4 METODOLOGIA

4.1 Fontes utilizadas de β-galactosidase

Os microorganismos fontes de β-galactosidase encontram-se depositados na coleção de fungos filamentosos do laboratório de Enzimologia do Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara UNESP. As quatro linhagens utilizadas estão identificadas como:

FAN - isolada pelo Prof. Dr. Rubens Monti, do Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP, de livro atacado por fungos, identificada como *Aspergillus sp;*

FTL - isolada pelo Prof. Dr. Rubens Monti a partir de papel em decomposição, identificada como *Penicillium sp;*

FTKO - da espécie *Trichoderma reesei*, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Luiz Antônio Gallo do Laboratório de Microbiologia do Solo da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz de Piracicaba, ESALQ- USP;

FTRP - da espécie *Trichoderma reesei*, cedida pelo Prof. Dr. João Atílio Jorge do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, FFCLRP-USP.

Extratos enzimáticos, com atividade β-galactosídica, destes fungos foram avaliados e forneceram informações sobre as quais as linhagem foram investigadas. A inclusão das linhagens de *Trichoderma reesei* listadas acima justificou-se pelo registro da atividade β-glicosídica do gênero e por considerar a referência sobre a monomeria de uma de suas α-galactosidases [55].

Posteriormente o extrato enzimático comercial de *Kluyveromyces lactis*, Lactozym 3000 L H PG (lote DKN 08.657), gentilmente doado pela Novozymes Latin America Ltda., foi utilizado e serviu para padronizar a metodologia de desativação da enzima com o agente seqüestrante.

4.2 Condições de cultivo e produção da β-galactosidase

Os meios de cultivo utilizados se distinguem como os de manutenção e de cultura e os de produção de enzima. Para a manutenção das cepas utilizou-se dos meios aveia-ágar e meio Nakao-lactose[28]. Para a produção da enzima as linhagens foram crescidas em caldos de cultivo como o meio sintético de Vogel e meios complexos M_6 ou meio semi-sólido de farelo de trigo.

4.2.1 Meios de manutenção

4.2.1.1 Meio ágar-aveia

ágar	2,0 g
aveia	4,0 g
H_2O qsp	100,0 mL

O meio é dissolvido em banho-maria, homogeneizado e distribuído nos respectivos frascos, sendo em seguida autoclavado por 15 a 20 minutos a 120ºC.

4.2.1.2 Meio Nakao-lactose

NaCl	5,0 g
Peptona	7,0g
KH_2PO_4	3,0 g
extrato de levedura	5,0 g
$MgSO_4$. $7H_2O$	10^{-2} g
$MnCl_2$	4,0. 10^{-3} g
lactose	30,0 g
ágar	20,0 g
H_2O qsp	1,0 L

O crescimento ocorre a 35^{0}C por cinco dias. Os meios complexos oferecem condições apropriadas para a manutenção da cultura, por serem enriquecidos com os constituintes necessários para a produção de β-galactosidase como magnésio, manganês e lactose. O meio Nakao-lactose foi utilizado principalmente para a produção de esporos utilizado nos inóculos em meios de produção.

4.2.2 Meios de Produção

Para a produção de β-galactosidase foram testados os meios líquidos Vogel e M6, assim como o meio semi-sólido de farelo de trigo, apresentados a seguir.

4.2.2.1 Meio Vogel

sais de Vogel	2,00 mL
solução de biotina	0,02 mL
lactose	2g
H_2O	qsp 100 mL
pH	6,0

Sais de Vogel: Citrato de Sódio 150g; KH_2PO_4 50g; NH_4NO_3 100g; $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ 10g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 5g; solução-traço 5mL; H_2O qsp 1000mL.

Solução traço: ácido cítrico 5g; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 5g; $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ 1g; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,25g; $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0,05g; H_3BO_3 0,05g; $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 0,05g; H_2O qsp 100mL (±1mL de clorofórmio).

Solução de biotina: biotina 0,50mg; etanol 50% 10ml.

4.2.2.2 Meio líquido M6

$CaCO_3$	1,0 g
NaCl	5,0 g
gelatina	2,5 g
peptona	1,0g
extrato de levedura	8,0 g
NH_4Cl	0,5g
lactose	20 g
H_2O	qsp 1L
pH	6,0

4.2.2.3 Meio semi-sólido de farelo de trigo

farelo de trigo	5,0 g
H_2O	10,0 mL
lactose	0,2 g

Os meios eram autoclavados a 120ºC por 15 a 20 minutos. Após o crescimento a atividade β-galactolítica foi dosada e o extrato seguiu o tratamento adequado.

4.3 Produção e extração da β-galactosidase

O inóculo foi produzido a partir das culturas mantidas em meio sólido Nakao. Frascos de Roux com culturas recentes recebiam de 2,0 a 5,0 mL de água estéril e uma leve agitação gerava a suspensão dos esporos. Um volume de 0,5 mL desta suspensão era utilizado para inocular o meio de produção. Os cultivos dos fungos foram testados em meio M6, Vogel e farelo de trigo enriquecido com lactose 2% e Mg^{2+} 1,0 mmol.L^{-1}, em mesa incubadora a 35ºC. Entre estes meios definiu-se pela produção em meio semi-sólido de farelo de trigo.

Após o crescimento do microrganismo, o que ocorria em uma semana de cultivo semi-sólido ou dois dias em meio líquido, era feita a extração. O meio recebia 30,0 mL de tampão fosfato com $MgCl_2$ 10^{-3} mol.L^{-1}, 4ºC e pH 7,0. O procedimento é uma modificação da extração de enzimas endocelulares proposta por Mahoney[55] omitindo-se o agente de lise, o tolueno. O homogeneizado era então filtrado, o qual se mostrou rico em polissacarídeos e pigmentos que poderiam comprometer a eficiência dos procedimentos de isolamento. A suspensão era eliminada por centrifugação a 4ºC, 7200 *g*, por 15 minutos. Obtinha-se assim o extrato cru.

Finalmente, uma filtração em terra diatomácea removia os pigmentos e preparava o extrato para uma diálise contra tampão fosfato 50 mmol.L^{-1}, pH 7,0 (8ºC, 3 trocas de 2h cada). Neste extrato clarificado determinava-se a atividade galactolítica e o teor de proteína. Acondicionado em frascos, estocado em freezer a -4ºC este extrato apresentava boa estabilidade e aguardava o tratamento para purificação da enzima.

4.4 Ensaio enzimático

A atividade da β-galactosidase pode ser acompanhada de dois modos: pelo método que utiliza o substrato cromogênico *o*-nitrofenil-galactopiranosídeo (*o*-NPG), ou pela utilização do "kit" multienzimático" GOD-ANA® para quantificação de glicose, constituído de glicose-

oxidase/peroxidase. O método *o*-NPG foi utilizado para acompanhar as medidas de atividade e para obter os dados cinéticos da enzima. Já o método GOD-ANA foi utilizado para monitorar a atividade da enzima nos eluatos das corridas cromatográficas.

A concentração protéica nas medidas de atividade foi calculada pelo método de Lowry. Nas frações eluídas das corridas cromatográficas, o teor protéico foi medido pela densidade óptica em 280nm.

4.4.1 Determinação da atividade enzimática

4.4.1.1 Atividade com o-*NPG*

Esse é um método direto de medida da atividade da enzima e acompanha a formação de *o*-nitrofenol de acordo com o proposto por Lederberg[56]. A medida baseia-se na variação da densidade ótica a 405nm causada pela digestão do substrato cromogênico *o*-nitrofenil-$\beta_{1,6}$-D-galactopiranosídeo. O comprimento de onda estabelecido mantém a linearidade para as concentrações utilizadas em pH 7,0.

A mistura reagente foi produzida de acordo com a composição definida na tabela 4.1. O pH é ajustado ao se misturar porções adequadas de soluções de fosfato monoácido e de fosfato diácido 0,050 mol L^{-1}. O estoque, assim produzido, é estável por três meses a 4ºC.

Tabela 4.1 composição do tampão de atividade para o método *o*-NPG

Componente	Concentração (mmol.L^{-1})
Na_2HPO_4/ NaH_2PO_4	50,0
$MgCl_2$	1,00
o-NPG	15,0

Na câmara de reação o volume final é de 500μL e contém o substrato e a alíquota da solução com atividade enzimática. A atividade é registrada em 405nm.O volume final é obtido ao se adicionar à solução de enzimas segundo a fórmula:

$V_R = V_E + V_T$ com $V_T = 500\mu L - V_E$

Sendo:

V_E o volume em microlitros de enzima utilizado no ensaio;

V_T o volume do tampão de atividade com o substrato e

V_R 500 μL o volume fixo da câmara de reação

Em intervalos de tempo convenientemente fixados eram registrados os valores de absorbância em um espectrofotômetro Ultrospec 1000 UV/Vis (Amersham-Biosciences) em 405nm. O coeficiente de absortividade molar, $\varepsilon = 3{,}0$ $\mu mol.L^{-1}.\ cm^{-1}$, foi definido com dinitrofenol como referência. A razão entre os diferenciais de produto liberado e de tempo é igual à velocidade inicial (V*i*) de reação. Uma unidade de atividade enzimática de β-galactosidase é definida pela massa de enzima necessária para hidrolisar 1 μmol de *o*-NPG em 1 minuto. A medida do teor de proteína, valor necessário para este cálculo, é apresentado adiante.

4.4.1.2 Medidas de atividade com reagente multienzimático

O método da glicose-oxidase, por sua vez, é baseado na determinação da glicose produzida pela digestão de lactose. A determinação da glicose nas amostras pode ser avaliada pelo "kit" enzimático-colorimétrico (glicose-oxidase/peroxidase), segundo Trinder[57]. Reagentes comerciais para determinação quantitativa de glicose são disponíveis e, não obstante sua diversidade, o método baseia-se na oxidação da glicose seguida da formação de um composto colorido pela ação de peroxidases. O reagente antipirolquinolinimina formado no protocolo God-Ana® (Labtest Diagnóstica), tem seu máximo de absorção em 505 nm.

A glicose-oxidase (β-D-Glicose: oxigênio-1-oxidorredutase) catalisa a oxidação da glicose de acordo com a seguinte reação:

$$\text{glicose} + O_2 + H_2O \longrightarrow \text{ácido glucônico} + H_2O_2$$

O peróxido de hidrogênio formado age como doador de elétrons na reação oxidativa de acoplamento entre 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase (hidrogênio-peróxido-oxidorredutase), formando antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra.

$$2H_2O_2 + \text{4-aminoantipirina} + \text{fenol} \longrightarrow \text{antipirilquinonimina} + 4H_2O$$

O ensaio se processou em tubos de 1,5 mL aos quais se adicionou 50 μL da solução enzimática sob análise a 50 μL tampão de atividade, conforme a tabela 4.2, de modo a se obter um volume final de 100 μL. A reação se processava durante trinta minutos, sob agitação, a 37°C, quando era interrompida ao ser submetida a um choque térmico (banho maria, 100°C por 1 a 2 min). Após resfriamento, aos meios reagentes acrescentavam-se 900 mL do "kit" GOD-ANA, incubados a 37°C por 15 minutos, até a formação da cor característica. A seguir determinam-se as absorbâncias do teste e padrão em 505 nm em um espectrofotômetro Ultrospec 1000 UV/Vis (Amersham-Biosciences). Durante os ensaios foram usados brancos de reação constituídos de 50 μL de água deionizada a 50 mL do tampão de atividade. O ajuste do zero de reação foi feito com este branco. A cor é estável por até 60 minutos.

Tabela 4.2 composição do tampão de atividade para o método GOD/ANA

Componente	Concentração
Na_2HPO_4/ NaH_2PO_4	0,050 mol.L^{-1}
Mg^{2+}	0,0010 mol.L^{-1}
lactose	2,0%

De menor custo, o reagente foi empregado na detecção da atividade galactolítica das frações cromatográficas as quais demandam grandes volumes de reagentes. Também foi utilizado nas investigações dos parâmetros cinéticos tomados do substrato natural.

4.4.2 Cálculo da concentração protéica

Foram usados dois métodos para a dosagem de proteína. O método proposto por Lowry foi empregado quando se exigia maior precisão quantitativa como nas determinações dos parâmetros cinéticos e o método de leitura direta na região do ultravioleta, quando as medidas tinham significado mais qualitativo. Tais métodos são descritos a seguir.

4.4.2.1 Método de Lowry

Complexos protéicos com íons divalentes de cobre, em pH alto, apresentam cor azul característica e tem seu máximo de absortividade molar em 660nm. Para o estabelecimento de suas concentrações uma curva de calibração foi traçada e a referência foi padronizada com soralbunina bovina (SAB).

Nas medidas para a determinação do teor protéico foi utilizado o método de Lowry modificado por Hartree. Triplicatas da solução com atividade enzimática eram diluídas convenientemente, obedecendo à linearidade do teste. Desta diluição utilizava-se 1,0 mL.A solução diluída de proteína recebia então 5,0 mL da solução reagente Lowry A. O branco de reação era produzido misturando-se 5,0 mL da solução de Lowry A com 1,0 mL de água deionizada.

A solução Lowry A era obtida apenas no momento do uso por diluição das soluções-estoque, relacionadas na tabela 4.3, na proporção 100 :1 :1 (v/v).

Tabela 4.3 soluções-estoque para a produção de solução Lowry A

Componentes	Concentrações
Na_2CO_3	2,0% (em NaOH 1 $mol.L^{-1}$)
Tartarato de sódio e potássio	1,0%
$CuSO_4$	1,0%

Após 15 minutos juntou-se ao meio reagente 0,5mL do reagente fenólico Folin-Ciocaulteau diluído (1:1) sob vigorosa agitação. Esperou-se 30 minutos e procedeu-se a leitura em 660 nm utilizando-se um espectrofotômetro Ultrospec 1000 UV/Vis (Amersham-Biosciences). O

coeficiente de extinção foi calculado em 1,94 $mg.mL^{-1}$. cm^{-1} tendo como referência um padrão de soralbumina bovina.

4.4.2.2 Leitura em 280nm

Proteínas absorvem luz ultravioleta devido aos resíduos aromáticos de suas estruturas primárias[58] o que fundamenta o método utilizado na determinação quantitativa de proteínas. O método é satisfatório, não destrutivo, de rápida e simples execução. Medida e realizada através da absorbância em 280 nm da solução-problema, particularmente livre de outras macromoléculas que apresentem atividade óptica nessa região como ácidos nucléicos, em cubetas de quartzo com passo óptico de 1cm. Os valores estão expressos em unidades arbitrárias. O método é usado para a leitura das frações colhidas de colunas e fornecem o perfil das proteínas eluídas das colunas cromatográficas.

4.5 Manipulação do extrato bruto e de suas frações

Os extratos produzidos foram estocados a –4°C até o início do tratamento de purificação da enzima. Neste momento eram determinados novamente o teor protéico e atividade galactosídica para monitorar a estabilidade do extrato.

4.5.1 Diálise

Diálises são comumente usadas para remover sais e outros compostos de soluções de macromoléculas com base nas diferenças de tamanho das partículas. Durante o fracionamento e purificação das biomoléculas, solventes orgânicos ou sais inorgânicos são utilizados, a acetona e o sulfato de amônio são exemplos respectivos. Como a presença destas substâncias interfere nas etapas seguintes da purificação e caracterização, precisam ser removidos. A diálise surge como método eficiente para remoção destas moléculas e íons. De fato, a diálise é também útil na remoção de íons fracamente ligados às biomoléculas. Cofatores protéicos e metais podem ser

dissociados pela diálise sendo esta tarefa facilitada pela presença de agentes coordenantes. Os tubos de diálise de celulose disponíveis são normalmente contaminados com glicerol, metais que precisam ser removidos antes do uso pela lavagem. Estes tubos, após o tratamento, podem ser estocados por meses a 4°C em água com mínima porção de azida sódica.

O procedimento foi aplicado em algumas situações neste trabalho. Num primeiro momento a diálise foi utilizada na clarificação do extrato bruto e mais adiante na dessalinização das soluções protéicas após a precipitação com sulfato de amônio e nas frações eluídas pelos gradientes salinos. Posteriormente, procurou-se aplicá-la na investigação do centro metálico da β-galactosidase. Para tal, diálises foram realizadas contra um tampão contendo um agente seqüestrante e também em um sistema no qual a diálise ocorria na presença de um campo elétrico (eletrodiálise). Estas últimas aplicações tinham como objetivo permitir a remoção do metal coordenado ao esqueleto carbônico

A diálise é realizada em cubas de 2L. Os tubos têm uma de suas extremidades lacradas e recebem as amostras e quando se lacra a outra extremidade são dispostos nas cubas. As cubas recebem a contra-solução em baixa temperatura (-4°C) e assim são mantidas nessa condição durante toda diálise. Uma leve agitação favorece o processo. Os tubos de diálise identificados são suspensos nas cubas e um regime de rodízio é estabelecido, a cada 3 horas a contra-solução é substituída para restabelecer o desequilíbrio do gradiente.

Uma consideração interessante se faz a respeito do *T. reesei*, ser notável fungo celulolítico. No extrato precipitado com $(NH_4)_2SO_4$ as celulases ainda presentes rompem os tubos durante o processo em períodos excessivamente prolongados. Esse empecilho foi contornado com troca do tubo quando da troca da contra-solução. A baixa temperatura é outro fator de proteção contra a atividade celulolítica. As frações obtidas a partir da cromatografia de troca iônica não mais exibiam essa atividade celulolítica.

4.5.1.1 Diálise com EDTA como quelante

Na tentativa de remover o metal da enzima, foram realizadas diálises com EDTA. Nestas diálises a contra-solução apresentava a composição indicada na tabela 4.4 e toda vidraria era lavada com HNO_3 6% de acordo com as instruções indicadas adiante.

Tabela 4.4 composição do tampão de diálise/EDTA

Componente	Concentração ($mol.L^{-1}$)
NaCl	0,145
NaH_2PO_4/Na_2HPO_4	0,033
EDTA	0,010

Fonte: SINNOTT, M.L.; WITHERS, S.G. The necessity of magnesium cation for acid assistance aglycone departure in catalysis by *Escherichia coli* (lacZ) β-galactosidase. **Biochem J.** v. 1, n. 175(2), p539-46, 1978[14]

Três trocas a cada etapa de 3 horas sob refrigeração são indicadas para desativar a amostra que deve ser transferida para frasco livre de metais. Deste material se mediam as atividades, a queda da atividade específica, com subseqüente reativação da enzima, indicando a eficiência da remoção do metal.

4.5.1.2 Eletrodiálise

Como a eletrodiálise apresenta eficiência e maior velocidade de deionizaçao do dialisado[59], tentou-se aplicar a eletrodiálise para investigar o centro metálico da β-galactosidase. Seguindo as instruções de Benaim[59] um aparato bicélula foi construído, tal como o esquema apresentado na figura 4.1.

A montagem bicélula compreende o compartimento (C_2) contendo a solução a ser dialisada (S_2) e o compartimento (C_1) que contém a contra-solução de diálise (S_1) na qual são imersos os eletrodos. A deionização de S2 se realiza pela diálise e, sobretudo, pela migração dos íons difusíveis de S2 para S1, em função da corrente que atravessa o tubo de diálise.

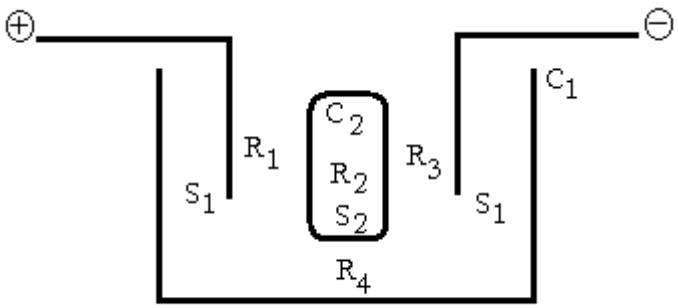


Figura 4.1. Esquema de um aparelho de eletrodiálise, com indicação das resistências (Ri), dos compartimentos e soluções[59].

4.5.2 Precipitação e concentração do conteúdo protéico

Compostos anfóteros tão complexos, como as proteínas, têm a solubilidade dependente de uma série de fatores, como, concentração salina, polaridade do meio, pH e temperatura. Diferentes proteínas reagem de formas diferentes a essas condições e enquanto algumas permanecem solúveis em um dado conjunto de condições outras não. O fenômeno pode ser usado como estratégia de isolamento.

4.5.2.1 Precipitação com sulfato de amônio

A solubilidade de uma proteína decai com o aumento da concentração de íons de alta força iônica. O efeito é conhecido como "salting out". Se os contra-íons de baixa força iônica favorecem a solubilização da amostra protéica por protegerem a molécula com cargas adicionais ("salting in"), os de alta força iônica competem com a molécula por solvatantes e a solubilidade decresce. Ao se ajustar as concentrações características da enzima em estudo, pode-se realizar uma precipitação seletiva. O sulfato de amônio é convenientemente selecionado para isso por ser altamente solúvel (3,9 mol.L^{-1} a 0ºC) e por não desnaturar a proteína como fazem os íons clorato, tiocianato e iodeto entre outros.

A - Considera-se nesse procedimento uma solução 66g/100mL como sendo 100% saturada, para se obter uma solução 70% recorre-se ao cálculo:

$$66 \times 0{,}7 \times \frac{\text{volume da amostra}}{100} = \text{massa(g) de } (NH_4)_2SO_4$$

B - A amostra é colocada em banho de gelo em recipiente com três vezes seu volume e mantida sob agitação leve;

C - O sulfato de amônio a ser utilizado é pulverizado finamente e adicionado lentamente na amostra de proteínas. Não se adiciona sal antes da porção anterior dissolver-se completamente;

D - Assim que a concentração desejada é atingida deixa-se a amostra repousar por 12 horas sob refrigeração. Após este período é centrifugada;

E - O sobrenadante pode receber maiores concentrações de sulfato de amônio e o precipitado é ressuspenso em pequeno volume de água;

F – Após a amostra ser dessalinizada, sob diálise, a atividade e o teor de proteínas são determinados.

4.5.2.2 Precipitação com acetona

Poucos solventes orgânicos solúveis em água aumentam o poder solvatante do meio aquoso. DMSO e formilamida são exemplos. Contudo, a maioria dos solventes orgânicos apresenta baixa constante dielétrica (ε) e produzem o efeito contrário. Álcoois e acetona são esses exemplos e justificam o emprego de baixas temperaturas no tratamento, pois o risco de se desnaturar a enzima torna-se apreciável.

Uma alíquota do extrato tem seu volume determinado e mantido sob cuidadosa refrigeração em um frasco de minimamente cinco vezes seu volume. A seguir mede-se três vezes o volume, da alíquota acima, em acetona gelada. Juntam-se os volumes de acetona e extrato com leve agitação e mantém-se por 15 ou 20 minutos em refrigeração (-8^{o}C). Após este descanso, procede-se à centrifugação refrigerada (20 minutos, 9000 rpm, 4^{o}C). O sobrenadante é desprezado. Os resíduos dos tubos são ventilados para eliminar resíduos do solvente. A atividade e o teor de proteínas são determinados.

4.5.2.3- Liofilização

A sublimação da água a pressões reduzidas concentra a amostra. Isso mantém a integridade da enzima. O material é congelado de modo a formar uma fina lâmina no recipiente o qual é enviado ao liofilizador. Os aparelhos variam o procedimento para os respectivos tipos, ora o material é congelado em placas, ora em balões. Esgotada a água da amostra, o material pulverizado pode ser estocado por longos períodos até ser suspensa em tampão de trabalho. As medidas de atividade indicam a estabilidade da enzima estudada submetida a esse processo.

4.6 Fracionamento das enzimas

Entre as metodologias de purificação de proteínas, os métodos cromatográficos estão entre mais empregados. A migração característica através de diferentes matrizes de cada componente promove a partição dos constituintes. Os métodos cromatográficos são classificados com base nas interações entre as fases móvel e estacionária. O procedimento de isolamento das enzimas utilizou colunas de troca aniônica, filtrações em gel e troca catiônica, como discutido a seguir.

Em todo o processo do fracionamento utilizou-se o tampão de trabalho constituído de fosfato de sódio 10^{-2} mol.L^{-1}, $MgCl_2$ 10^{-3} mol L^{-1} pH 7,0. À exceção da etapa da cromatografia catiônica em S Sepharose cujo tampão de corrida é descrito adiante.

4.6.1 Colunas de fracionamento por troca aniônica - DEAE-Trisacryl

No processo de troca iônica os íons eletrostaticamente ligados a uma matriz inerte são substituídos por íons em solução. Os trocadores podem ser classificados como catiônicos ou aniônicos de acordo com a carga dos íons em solução. A afinidade do trocador e a eficiência da partição são controladas pela identidade e concentração dos íons, além do pH do meio. O grupo

trocador dietilaminoetil (DEAE) é positivamente carregado. A técnica de preparação da matriz segue a metodologia indicada por Vilella *et al*[60].

O fracionamento cromatográfico em DEAE-Trisacryl utilizou o material precipitado por sulfato de amônio devidamente dessalinizado por diálise. Esta amostra foi diluída em com tampão de trabalho (fosfato 0,010 mol.L^{-1}; $MgCl_2$ 0,001 mol L^{-1}; pH 7,0). A resina previamente hidratada foi tratada com ácido clorídrico 0,500 mol.L^{-1}, por uma hora, seguindo-se sucessivos enxagües, com a finalidade de remover o excesso de ânions. Este processo acompanhado pelo monitoramento do pH que cresce até o máximo próximo à neutralidade, tinha por finalidade remover os grupos que ocupassem os sítios trocadores da resina.

Removido o excesso de ácido a resina teve seus grupos trocadores carregados ao sofrer tratamento com NaOH 0,500 mol.L^{-1}. Seguiram-se novas e sucessivas lavagens acompanhadas de medidas do pH até que este atingisse o menor valor possível. Ao fim desse processo, resina era tratada com o tampão de trabalho numa concentração de 0,05 mol.L^{-1} por uma hora. Após três lavagens, com o mesmo tampão diluído a 0,01 mol.L^{-1} condicionou-se a fase estacionária (DEAE-Trisacryl) à fase móvel (tampão de trabalho).

A resina assim condicionada era disposta em frascos de kitassato e submetida a pressões reduzidas para garantir a deaeração eficiente. A resina era empacotada em colunas de 35x150 mm e lavada com um volume de 500 mL de tampão fosfato de sódio pH 7,0 a 0,001mol.L^{-1}. As amostras foram aplicadas sob um fluxo de 15 mL.h^{-1} e eluídas em gradiente de NaCl (0-0,500 mol.L^{-1}) no tampão de trabalho. Nas frações eram determinados o teor protéico e a atividade enzimática. As frações ativas foram reunidas e dialisadas e concentradas por liofilização.

4.6.2- Colunas de filtração em gel Biogel P-100

A filtração em gel exclui as moléculas pelas massas moleculares que apresentam. A migração da amostra pelo gel pode sofrer retardamento caso a forma e o tamanho da molécula seja compatíveis com a porosidade definida do gel. Moléculas maiores por serem excluídas

acompanham a fase móvel. As separações das moléculas pelas suas massas originam o outro termo pelo qual a técnica também é conhecida, ou seja, exclusão molecular. Esta cromatografia também pode ser usada na estimativa da massa molecular de uma dada proteína.

A resina empacotada em coluna de 20x600mm era extensivamente lavada com o tampão de trabalho. O fluxo da fase móvel era ajustado em 15 $mL.h^{-1}$. O eluato dialisado e liofilizado proveniente da troca iônica, com atividade β-galactolítica e concentração de proteína determinadas, era aplicado na coluna. O coletor de frações foi programado para coletar frações de 2,5 mL nas quais a concentração protéica e a atividade eram avaliadas. As frações com atividade confirmada eram reunidas e concentradas por liofilização.

4.6.3 Colunas de fracionamento por exclusão molecular Sephacryl

O procedimento é semelhante ao descrito para a filtração em biogel. Fluxo, dimensões da coluna, volume de coleta da fração, tampão com concentração e pH são os mesmos para a coluna empacotada com o Biogel P-100, assim como o tratamento para as frações ativas. Foram testadas as colunas Sephacryl S-200 HR e Sephacryl S-300 HR que diferem entre si nas faixas de exclusão. Ao tampão de corrida nas últimas cromatografias em Sephacryl S-300 HR foram adicionados Triton 0,02%, como agente surfactante, e EDTA $10^{-4}mol.L^{-1}$, como agente quelante.

4.6.4 Colunas de troca iônica S-Sepharose

Ainda, de acordo com Vilella *et al*[60], a preparação de um trocador catiônico, como é o caso da resina em questão, em que o grupo sulfônico age como trocador fortemente ácido, é equivalente ao método proposto para se equilibrar e empacotar colunas aniônicas. A diferença é marcada apenas pela inversão dos tratamentos por base e ácido.

As frações ativas colhidas da cromatografia em Sephacryl S-200 liofilizadas foram diluídas em mínimos volumes de tampão formiato de amônio 0,010 $mol.L^{-1}$ (Triton 0,02%, EDTA $10^{-4}mol.L^{-1}$, $MgCl_2$ $10^{-3}mol$ $mmol.L^{-1}$ pH 4,5 e posteriormente pH 5,5). A resina, devidamente

lavada com NaOH 0,500 mol.L^{-1} era carregada com HCOOH 0,500 mol.L^{-1}. Estabilizada com o tampão formiato de amônio 0,05 mol.L^{-1}, a resina foi empacotada em colunas de 35x150 mm após efetiva deaeração. As amostras foram aplicadas e eluídas em gradiente de NaCl (0-0,500 mol.L^{-1}) no mesmo tampão. As frações ativas foram reunidas, dialisadas e analisadas.

4.7 Eletroforeses

As soluções protéicas foram examinadas em corridas eletroforéticas em gel de poliacrilamida nas condições nativas e desnaturantes. A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) seguiu o método de Davis[61] e foi aplicado para avaliar o padrão de corrida em gel de atividade. A eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE) foi realizada segundo a metodologia de Laemmli[62] com o propósito de monitorar as frações eluídas das cromatografias.

4.7.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) para proteínas ácidas[60]

Para se obter uma placa de gel de 7 mL com concentração 6% misturou-se 3500 μL da solução G (persulfato de amônio 1,5%), 875 μL de da solução A, (tampão Tris/HCl, 0,100 mol.L^{-1}, pH 8,9; Temed 5%), 875 μL da solução C' (poliacrilamida 48%), indicada na tabela 4.5.

Tabela 4.5 solução C', acrilamida 48%

Componente	Massa (g)
acrilamida	9,6
bis acrilamida	0,32

As soluções A e C' e 1,750 mL de H_2O deionizada foram misturadas e deaeradas sob vácuo. Esta mistura se denomina solução I. A solução G era preparada no momento de seu uso e também era deaerada. Após a mistura, as soluções-estoque (G e I) eram polimerizadas em placas ou em tubos As corridas se realizaram com 200V, 20mA e 1h 30min. em uma unidade Amersham Pharmacia mini VE. e reveladas com Coomassie Brillant Blue.

4.7.1.1 Coloração em Comassie Brillant Blue

Após eletroforese os géis eram fixados em 100 mL de solução fixadora, indicada na tabela 4.6, por uma ou duas horas.

Tabela 4.6 solução fixadora de proteínas corridas em PAGE

Componente	%
acido acético	7
metanol	40

Os géis eram corados após a fixação em solução quatro vezes diluída (de um estoque de Comassie Brillant Blue 20%) por uma hora sob agitação em temperatura ambiente. A seguir, os géis eram descorados por 60 segundos sob agitação em solução descorante de acordo com a tabela 4.7. Os géis, neste momento, eram lavados com metanol 25% e mantidos nessa solução ou seguiam para a secagem, e se procedia ao registro conveniente da corrida.

Tabela 4.7 solução descorante de PAGE

Componente	Volume (mL)
àcido acético	10
metanol	25
H_2O	100

4.7.1.2 Atividade da β-galactosidase em PAGE

A atividade de glicosidases nas bandas de uma corrida eletroforética pode ser revelada pela redução do nitrobluetetrazólio pela Glicose oxidase, marcada pela formação de cor característica nas bandas. Para este experimento foram preparados géis aos pares, sendo um para a coloração com Comassie Blue (gel #1) e outro para a detecção das bandas de atividade (gel #2). Ao gel que se testava a atividade (gel #2) adicionou-se glicose-oxidase 2 $mg.mL^{-1}$ de gel (para um gel de 2mL utilizou-se a massa de 4mg de glicose oxidase). Ambos os géis recebiam as amostras e se procedia a corrida em 20mA 200V a 4°C. O gel #1 seguia protocolo normal de coloração de PAGE.

O gel #2 era lavado com tampão acetato 0,500 mol.L^{-1}, pH 5,3 em dois ciclos de 5 minutos e colocado em repouso por uma hora neste tampão. A solução reveladora era preparada como está indicado na tabela 4.8.

Tabela 4.8 solução reveladora de atividade de lactase

Componente	Massa (mg)
nitrobluetetrazólio	1,6
fenazina bissulfito	0,8
lactose	80

Incubado ao abrigo da luz a 4ºC até o surgimento da banda de atividade, o gel #2 foi extensivamente lavado. Depois se procedeu ao registro fotográfico e foram medidas as mobilidades relativas (R_f) das enzimas.

4.7.2 Eletroforese em condição desnaturante (SDS-PAGE)

A eletroforese em condição desnaturante (SDS-PAGE) foi realizada de acordo com o método de Laemmli[62], em gel 12% usando padrão de massa molecular Pharmacia Biotech. A ruptura das pontes intermoleculares e associação com SDS geram mudanças na geometria e na carga da molécula protéica. Estas mudanças conferem à técnica a capacidade de inferir as massas moleculares das proteínas da amostra. Os coeficientes de mobilidade relativa da amostra podem ser comparados aos de marcadores-padrão. Por essa razão a técnica foi aplicada no monitoramento e na qualificação das amostras eluídas das corridas cromatográficas.

O gel 12% de acrilamida foi preparado com 1,25mL tampão de separação (Tris 1,500 mol.L^{-1}, pH 6,8 mais SDS 0,4%), 2,00mL acrilamida/bisacrilamida, tal como apresentado na tabela 4.9, 1,72mL de H_2O, 7μL TEMED e 25μL de persulfato de amônio10%. Este é preparado na hora do uso e sempre é o último componente a ser adicionado. Sobre este gel se polimerizava o gel de empilhamento que se prepara com 750μL tampão de concentração (Tris 0,500 mol.L^{-1},

pH 6,8, SDS 4 %), 300μL acrilamida/bisacrilamida, 1,550mL H_2O, 200μL Bisacrilamida 2%, 10μL TEMED e por último 15μL persulfato de amônio 10% preparado na hora do uso.

Tabela 4.9 solução de acrilamida 30%

Componente	%
acrilamida	30
bis acrilamida	0,8

Os extratos ou os precipitados protéicos eram diluídos em tampão de ruptura (Tris/HCl 0,500 mol.L^{-1}, pH 6,8 com β-mercaptoetanol 5%) e fervidos por um minuto. Ocorrida a ruptura as corridas se realizaram com 200V, 20mA e 1h 30min, em uma unidade Amersham Pharmacia mini VE. A revelação era feita com Coomassie Brillant Blue.

4.8 Caracterização das isoformas de *T. reesei*

O processo de isolamento das enzimas produzidas pelo fungo revelaram ao menos duas isoformas de β-galactosidases extracelulares, como se verá adiante na apresentação dos resultados. Essas isoformas foram caracterizadas e se revelaram distintas quanto aos seus parâmetros cinéticos e termodinâmicos.

4.8.1 Parâmetros físico-químicos

4.8.1.1 Temperatura ótima

Os ótimos de temperatura de ambas as isoformas de β-galactosidase (BGT I e BGT II) foram determinados pela hidrólise do substrato cromogênico *o*-NPG pelas enzimas em ensaios conduzidos em banho agitado (modelo Dubnoff) nas temperaturas de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, e 90° C, em tampão fosfato de sódio (0,050 mol L^{-1}, pH 7,5, 0,001 mol L^{-1} $MgCl_2$).

4.8.1.2 pH ótimo

Para determinação do pH ótimo, as enzimas foram incubadas em tampões McIlvaine[60]. Este sistema foi utilizado por apresentar ampla faixa de pHs ajustáveis. Os pHs dos testes foram ajustados entre 3,0 e 8,5 (intervalos de 0,5) nas temperaturas ótimas definidas para ambas as enzimas (65°C).

4.8.1.3 Estabilidade em pH

Determinados os ótimos de pH e de temperatura, as enzimas foram incubadas a 65,0°C em tampões McIlvaine, acrescidos de $MgCl_2$ 0,001 mol L^{-1}, com os valores de pH entre 3,0 e 10,0 (intervalos de 1,0). Após incubação de 30 minutos em cada experimento, alíquotas de 20 μL eram diluídas em 180□ μL de tampão fosfato (0,2 mol L^{-1}, pH 4,5 para BGT I e pH 6,5 para BGT II) e refrigeradas em banho de gelo. As atividades residuais, ensaiadas pelo método do *o*-NPG, foram analisadas em função dos valores de pH.

4.8.1.4 Estabilidade térmica

Para as determinações de estabilidade térmica as enzimas foram incubadas em fosfato de sódio 0,050 mol L^{-1} (BGT I pH 4,5 e BGT II pH 6,5), contendo $MgCl_2$ 0,001 mol L^{-1} a 65° C, por três horas. A cada 30 minutos os vials eram transferidos a banhos de gelo e a atividade residual era testada pelo ensaio do *o*-NPG As porcentagens das atividades residuais foram analisadas em função do tempo de incubação.

4.8.2 Parâmetros cinéticos

As constantes de Michaelis-Menten nos ótimos de temperatura e pH foram determinadas em amostras liofilizadas de BGT I e BGT II. As taxas foram determinadas em tampão de trabalho tal como descrito na secção 4.4, em seus respectivos ótimos de pH e temperatura. As soluções de lactose foram preparadas nas concentrações de 0 a 0,200 mol L^{-1} e as de *o*-NPG de 0

a 0,020 molL^{-1}. Os valores das constantes aparentes de Michaelis-Menten (K_m^{app}) e das velocidades máximas (V_{max}) para ambos os substratos foram calculados a partir dos gráficos de Lineweaver-Burk.

4.8.3 Eficiência de imobilização em alginato das isozimas

Foram testadas as eficiências da imobilização das enzimas BGT I e BGT II em gel de alginato de sódio. As soluções das enzimas tiveram atividade e concentração de proteínas devidamente determinadas. Para se obter uma solução de alginato de sódio dissolveu-se o sal, a 80^{o}C, sob suave agitação, até se obter uma concentração de 2% em massa. Esta solução era resfriada à temperatura ambiente e 40mL da solução de alginato 2% eram misturados com 10 mL das soluções das enzimas. Esta solução de alginato/proteína foi lentamente gotejada em 200mL de $CaCl_2$ 0,25mol.L^{-1} para a formação dos "pellets". A seguir os "pellets" foram recolhidos, lavados em H_2O deionizada e mantidos em tampão fosfato em geladeira. A eficiência de imobilização (%) foi determinada pela razão entre as atividades totais obtidas e as esperadas.

4.9 Necessidade de metal na atividade de β-galactosidases

Os metais encontram-se freqüentemente associados a enzimas e têm sido caracterizados em seus diversos modos na estabilização[63, 64] e na ativação[7, 40, 65, 66] destas enzimas. Com a finalidade de se estudar a importância dos metais bivalentes na atividade da β–galactosidase de *T. reesei* um método de desativação da enzima foi padronizado. Na padronização do método utilizou-se o eluato da filtração em gel do extrato comercial de β-galactosidase de *Kluyveromyces lactis* (Novozymes Latin America Ltda), a enzima foi incubada na presença de EDTA e posteriormente testou-se a reativação da enzima[7].

4.9.1 Limpeza do material

Todo material envolvido na manipulação da enzima (vidraria, ponteiras de pipetas e soluções) foi conservado livre de metais. Esse material era lavado com H_2O deionizada e depois imerso por uma noite em HNO_3 1,0 $mol.L^{-1}$. Após a lavagem com ácido o material era enxaguado dez vezes com água mili-Q. Os tampões eram produzidos misturando-se quantidades convenientes de soluções dos pares tamponantes e o pH era conferido de alíquotas da solução resultante.

Os tubos de diálises da metodologia de desativação da enzima foram lavados de acordo com Sinnott[68], substituindo-se a água tratada com Chelex por H_2O mili-Q.

4.9.2 Desativação da enzima com EDTA. Obtenção da apoenzima

Embora a metodologia empregada neste trabalho tenha utilizado como agente quelante o EDTA, outros complexantes podem ser usados como, por exemplo, a *o*-fenantrolina[7]. As razões para a escolha deste método se referem à disponibilidade do EDTA e a indisponibilidade de outros complexantes.

As enzimas foram estudadas em tampão Tris/HCl (0,010$mol.L^{-1}$, pH 7,0) e tampão fosfato (0,010$mol.L^{-1}$, pH 7,0). Para o ensaio de desativação, 50 μL de enzima foram incubados em 5mL do tampão (Tris/HCl ou fosfato) contendo EDTA nas concentrações 0,05, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} $mol.L^{-1}$. A atividade residual, medida a cada 10 minutos, foi representada graficamente em função do tempo de incubação.

4.9.3 Reativação da enzima com diferentes metais

Selecionado o tampão pela eficiência, durante os estudos de desativação, a apoenzima foi obtida por incubação em nove partes de tampão Tris/HCl 0,2 $mol.L^{-1}$ com uma parte de EDTA $2{,}0.10^{-2}mol.L^{-1}$ e 10 partes da enzima ativa. A solução resultante apresentava a concentração

definida nos tratamentos de desativação, 10^{-3} mol.L^{-1}. A enzima foi incubada por 1 hora, sob agitação a 4ºC.

Conferida a desativação 500μL da enzima eram incubadas em 5mL de tampão Tris/HCl contendo as concentrações de 10^{-1}, 10^{-2},10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} mol.L^{-1} do metal estudado. Os íons testados foram: Mg^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+} e Eu^{3+}. A atividade residual foi analisada em função do tempo de incubação.

4.10 Linearidade

Os resultados são apresentados como média de três experimentos independentes, com dispersão 5% significativa.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Seleção da linhagem e do método de cultivo. Produção da enzima

A definição da linhagem produtora de β-galactosidase ocorreu após o crescimento das linhagens FAN, FTL, FTKO, FTRP em meio semi-sólido, Vogel e $M_{6.}$ Os dados de produção das linhagens testadas são apresentados na tabela 5.1. Os crescimentos em meio líquido de Vogel renderam os extratos com as mais baixas taxas de atividades e os cultivos em meio semi-sólido de farelo de trigo os extratos mais produtivos. A produção eficiente da enzima e a facilidade da extração nos permitiram selecionar a linhagem FTKO em meio semi-sólido para a produção da enzima a ser trabalhada na condução do projeto.

Tabela 5.1 atividade de β-galactosidase das linhagens de fungos estudadas.

Linhagem	Volume (mL)	[Proteína] ($mg.mL^{-1}$)	UA ($\mu mol.min^{-1}ml^{-1}$)	U esp ($\mu mol.min^{-1}.mg^{-1}$)
Vogel				
FAN	25	97,60± 2,65	$5,34.\ 10^{-6}$± 0,02	$5,47.\ 10^{-8}$± 0,13
FTL	25	89,80± 5,89	$7,57.\ 10^{-6}$± 0,02	$8,43.\ 10^{-8}$± 0,21
FTKO	25	96,50± 4,65	$9,94.\ 10^{-5}$± 0,01	$1,03.\ 10^{-6}$± 0,02
FTRP	25	106,00± 1,95	$5,19.\ 10^{-5}$± 0,03	$4,90.\ 10^{-7}$± 0,01
M6				
FAN	25	275,47± 3,09	$2,61.\ 10^{-3}$± 0,08	$9,46.\ 10^{-6}$± 0,09
FTL	25	338,51± 1,51	$9,28.\ 10^{-3}$± 0,03	$2,74.\ 10^{-5}$± 0,10
FTKO	25	199,95± 5,75	$1,31.\ 10^{-2}$ ± 0,02	$6,57.\ 10^{5}$± 0,02
FTRP	25	674,86± 8,80	$5,75.\ 10^{-3}$± 0,03	$8,52.\ 10^{-6}$± 0,01
Semi-sólido				
FAN	27	98,70± 4,01	$1,84.\ 10^{-2}$ ± 0,02	$1,86.\ 10^{-4}$± 0,02
FTL	27,5	106,00± 3,05	$2,05.\ 10^{-3}$± 0,04	$1,93.\ 10^{-5}$± 0,06
FTKO	22,5	109,00± 5,62	$4,01.\ 10^{-1}$± 0,02	$3,68.\ 10^{-3}$± 0,01
FTRP	25	113,25± 4,65	$2,81.\ 10^{-3}$± 0,02	$2,48.\ 10^{-5}$± 0,16

Mahoney e colaboradores descrevem linhagens de *Kluyveromyces fragilis* produtoras de β-galactosidases cujas produtividades variam até 60 vezes [55], o presente trabalho mostra variações de 400, 7 e 19 vezes entre as linhagens de acordo com o método de produção. Se a diversidade de

espécies analisadas se reflete na amplitude das diferenças encontradas, por outro lado deve-se ter em conta que a produção destas enzimas em linhagens de *Candida pseudotropicalis* varia mais de dez vezes, de acordo com as condições de cultura[69]. São descritos na literatura valores entre 8,0. 10^{-3} e 1,75. 10^{-3} $\mu mol.min^{-1}.\ mg^{-1}$ para extratos intra e extracelulares de β-galactosidase do trato digestório de ratos[70] e para β-galactosidase purificada de *Aspegillus candidus* [71] atividade de 2,6 $\mu mol.min^{-1}.mg^{-1}$.

5.2 Isolamento da enzima

O procedimento de purificação está esquematizado na figura 5.1. O isolamento se iniciou com o fracionamento do extrato bruto dialisado por precipitação em sulfato de amônio na faixa de 30 a 70%. A seguir, na cromatografia de troca aniônica, dois picos com atividade galactolítica foram individualizados. O primeiro pico passou a ser o objeto de isolamento para condução da purificação, seu eluato sofreu permeação em gel em diferentes resinas com diferentes faixas de exclusão, Biogel P-100, Sephacryl S-200 HR e Sephacryl S-300 HR. O progresso do processo de purificação teve continuidade com a cromatografia de troca catiônica, utilizando-se resina S Sepharose.

As enzimas isoladas na troca aniônica, em DEAE-trisacryl, foram caracterizadas como isozimas distintas e identificadas como BGT I e BGT II. O isolamento revelou a formação de um agregado, em função do qual não foi possível obter a homogeneidade da purificação. A BGT I foi objeto de estudo de desativação com agente quelante e ambas as enzimas foram imobilizadas em alginato de sódio.

5.2.1 Processamento do extrato bruto

Após a seleção da linhagem e método de produção da enzima, foi possível avaliar os efeitos de filtração, diálise, liofilização e precipitação do extrato. Na tabela 5.2 estão apresentados os resultados obtidos. A amostra dividida em duas alíquotas foi precipitada e/ou liofilizada e, em

seguida, diluída em volumes seis vezes menores que os originais. Notou-se a recuperação eficiente das proteínas e das atividades contidas no extrato inicial. Tais resultados nos levam a concluir que esses são métodos convenientes de concentração das proteínas produzidas no cultivo de *T. reesei* FTKO.

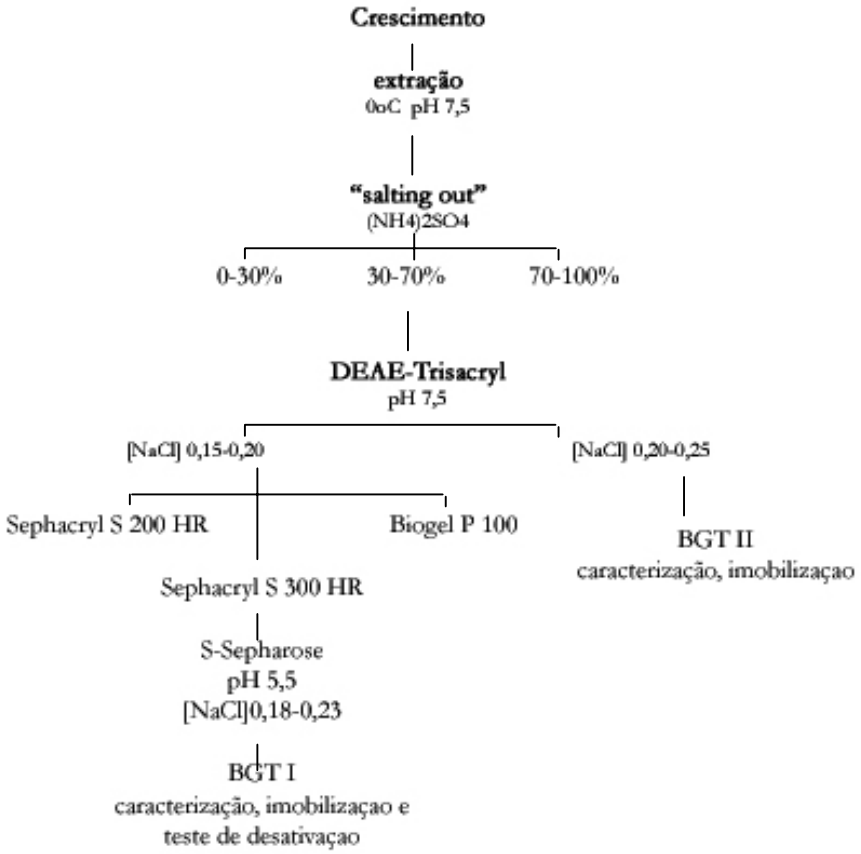


Figura 5.1. Estratégias de isolamento de β–galactosidases de *T. reesei* FTKO.

Tabela 5.2 efeito de diferentes tratamentos sobre o extrato bruto na atividade enzimática

Tratamento	Volume (mL)	Proteínas ($mg.mL^{-1}$)	Unidades de Atividade ($\mu mol.min^{-1}$)	Atividade específica ($\mu mol.min^{-1}.mg^{-1}$)	Eficiência (%)
nenhum	23,0	145,12 ± 21,94	$6{,}10.\ 10^{-1}\pm 0{,}02$	$4{,}20.\ 10^{-3}\pm 0{,}11$	100
filtração em terra diatomácea	22,5	130,54± 15,09	$5{,}40.\ 10^{-1}\pm 0{,}32$	$4{,}14.\ 10^{-3}\pm 0{,}01$	98,5
dialisado	23,1	121,62± 0,52	$4{,}10.\ 10^{-1}\pm 0{,}65$	$3{,}37.\ 10^{-3}\pm 0{,}03$	80,3
liofilização	2,0	807,71± 7,90	3,31 ± 0,18	$4{,}10.\ 10^{-3}\pm 0{,}02$	97,6
precipitação em acetona	2,0	675,52± 14,77	2,81 ± 0,50	$4{,}16.\ 10^{-3}\pm 0{,}10$	99,0

A figura 5.2 mostra a eletroforese (SDS-PAGE) do extrato bruto e de um extrato do meio desprovido de inóculo, no qual se procurou estabelecer o padrão protéico do substrato, assim

como do extrato dialisado. Os diferenciais de corrida permitem a visualização a origem de várias bandas que surgem no extrato. Os extratos provenientes do crescimento sobre farelo de trigo possuem grandes quantidades de pigmentos e a diálise parece favorecer uma primeira limpeza a qual precede a filtração em terra diatomácea.

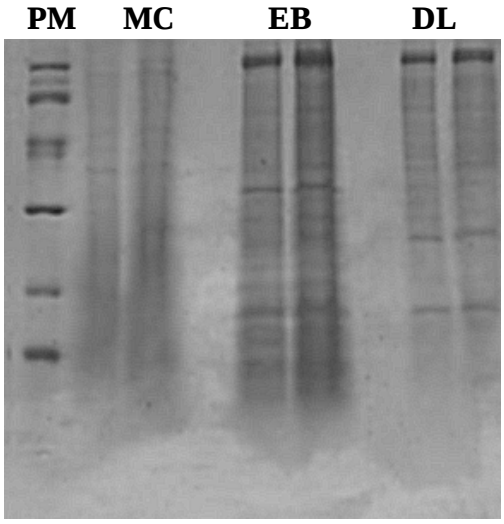


Figura 5.2. Padrão de corrida em eletroforese desnaturante (gel 12%) do extrato de meio de cultura semi-sólido de farelo sem inóculo (MC), do extrato bruto (EB) e dialisado (DL) de *Trichoderma reesei* FTKO. (PM) padrões de massas moleculares: fosforilase= 94kDa; albumina bovina= 76kDa; ovalbumina= 43kDa; anidrase carbônica= 30 kDa; inibidor de tripsina= 20,1 kDa; α-lactalbumina 14,4kDa.

5.2.2 Precipitação diferencial com $(NH_4)_2SO_4$

O extrato dialisado foi submetido ao fracionamento por sulfato de amônio nas faixas 0-30%, 30-70% e 70-100%. A tabela 5.3 mostra os resultados obtidos da recuperação das proteínas e das atividades sob tais tratamentos. Nas faixas 0-30% e 70-100% as atividades recuperadas foram extremamente baixas. Na faixa entre 30 e 70% o "salting out" mostra uma queda no teor protéico acompanhada de aumento na atividade específica, significando uma grande remoção das

proteínas contaminantes do extrato o que aumenta a atividade específica em duas vezes e meia. Esta fração, após a diálise para remover o excesso de sal da amostra, prosseguiu na etapa seguinte do fluxograma de purificação.

Tabela 5.3 precipitação com $(NH_4)_2SO_4$ do extrato dialisado de *Trichoderma reesei* FTKO

Fração	[Proteína] ($mg.mL^{-1}$)	U.A. ($\mu mol.min^{-1}.mL^{-1}$)	Atividade específica ($\mu mol.min^{-1}.mg^{-1}$)	Purificação
extrato bruto	145,12 ± 1,08	$6,09.\ 10^{-1} \pm 0,04$	$4,2.\ 10^{-3} \pm 0,37$	1
0-30 %	26,2 ± 0,26	$7,17.\ 10^{-4} \pm 0,18$	$2,74.\ 10^{-5} \pm 0,07$	< 0,01
30-70%	66,75 ± 0,52	$7,27\ .\ 10^{-1} \pm 0,31$	$1,09.\ 10^{-2} \pm 0,16$	2,6
70-100%	20,48 ± 0,19	$2,45.\ 10^{-5} \pm 0,76$	$1,2.\ 10^{-6} \pm 0,06$	< 0,01

5.2.3 Fracionamento por coluna de troca aniônica DEAE-Trisacryl

A cromatografia em troca iônica foi a segunda etapa aplicada com o objetivo de se fracionar a amostra. O extrato filtrado foi precipitado com sulfato de amônio e dialisado, conforme a metodologia descrita. Três alíquotas diluídas em tampão fosfato 10 $mmol.L^{-1}$ e pH 7,0 foram aplicadas em colunas DEAE-trisacryl. Após o "washout" de 250mL, iniciava-se o gradiente salino. Os resultados destas corridas cromatográficas analíticas encontram-se apresentados nas figuras. 5.3, 5.4 e 5.5.

As enzimas interagiram com o suporte e nenhuma atividade foi registrada na solução de lavagem das resinas. A eluição de uma primeira enzima foi possível com concentrações de NaCl entre 0,15 e 0,20 $mol.L^{-1}$. Os cromatogramas exibem uma segunda banda de corrida com atividade lactolítica recolhida entre as frações eluídas com concentração de NaCl entre 0,20 e 0,25 $mol.L^{-1}$.

As frações ativas foram reunidas e dialisadas. A atividade específica registrada é apresentada e discutida adiante. Uma alíquota foi concentrada por liofilização e avaliada por SDS-PAGE. Todas exibem reprodutibilidade do perfil.

O resultado obtido com as cromatografias deste extrato levou-nos a produzir novos extratos. Os procedimentos dos ciclos de crescimento e extração foram retomados. As figuras 5.6, 5.7 e 5.8 ilustram os resultados da cromatografia de troca iônica destes novos crescimentos. Esses cromatogramas apresentam alta reprodutibilidade com os picos de proteínas e atividades coincidentes com as eluições do crescimento anterior. Isso justificou a reunião dos eluatos para os tratamentos subseqüentes.

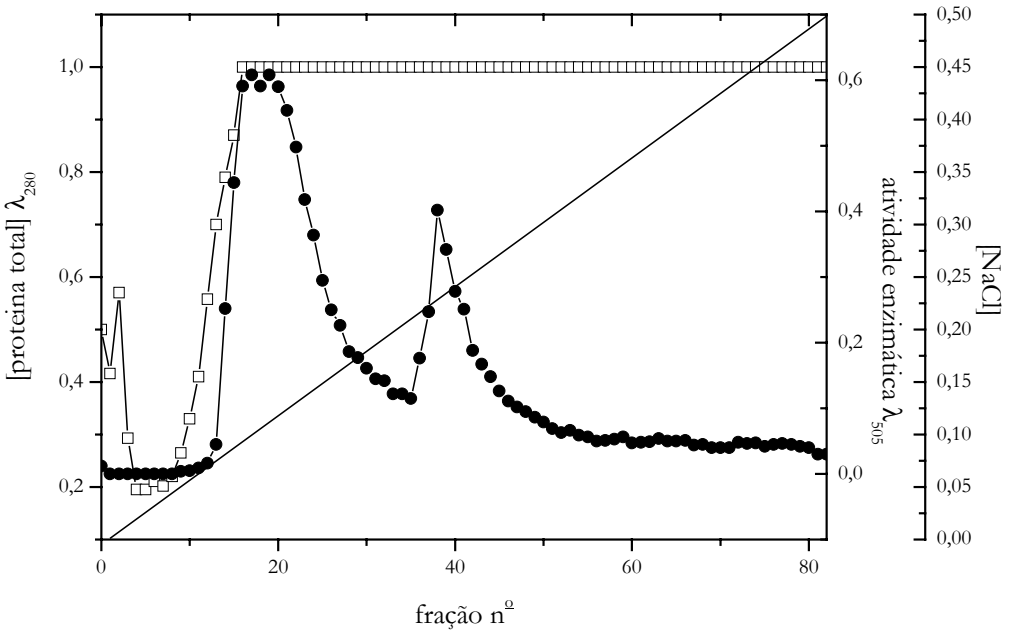


Figura 5.3. Perfil cromatográfico de troca aniônica preparativa, fase estacionária DEAE-Trisacryl, fase móvel tampão fosfato pH 7,5 0,01mol.L^{-1}; —— gradiente salino; –●– atividade enzimática; —□— proteína total.

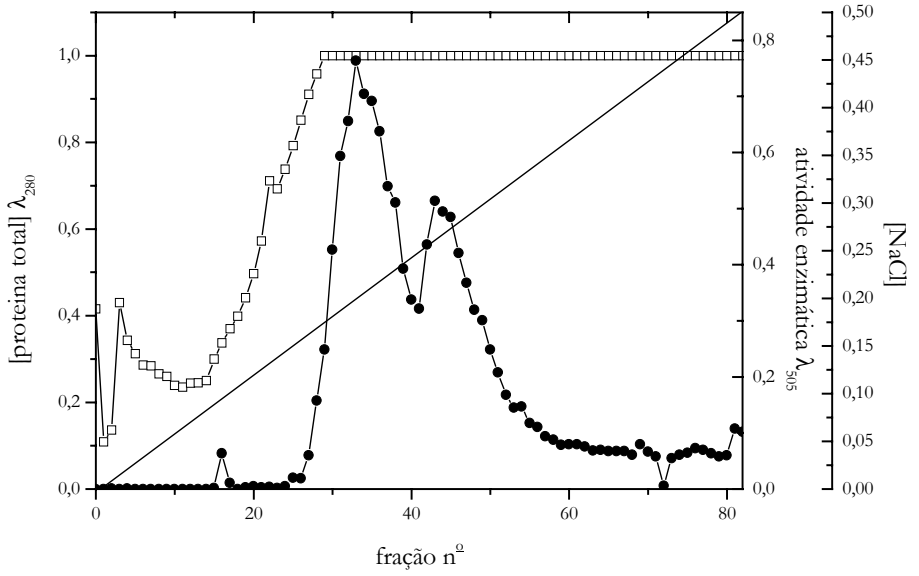


Figura 5.4. Perfil cromatográfico de troca aniônica preparativa, fase estacionária DEAE-Trisacryl, fase móvel tampão fosfato pH 7,5 0,01mol.L^{-1}; —— gradiente salino; –●– atividade enzimática; —□— proteína total

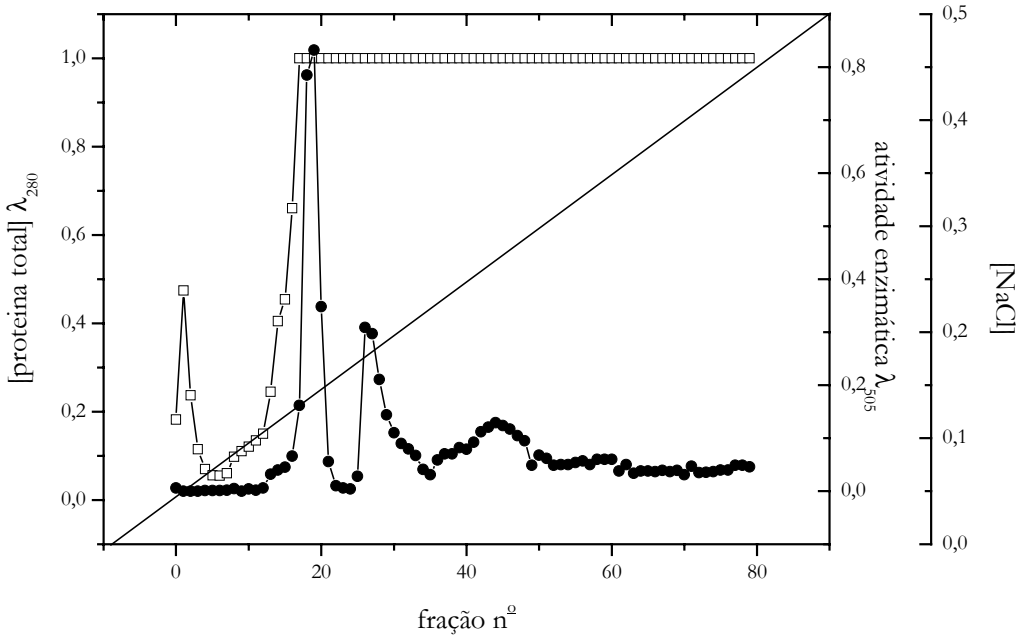


Figura 5.5. Perfil cromatográfico de troca aniônica preparativa, fase estacionária DEAE-Trisacryl, fase móvel tampão fosfato pH 7,5 0,01mol.L^{-1}; —— gradiente salino; –●– atividade enzimática; —□— proteína total

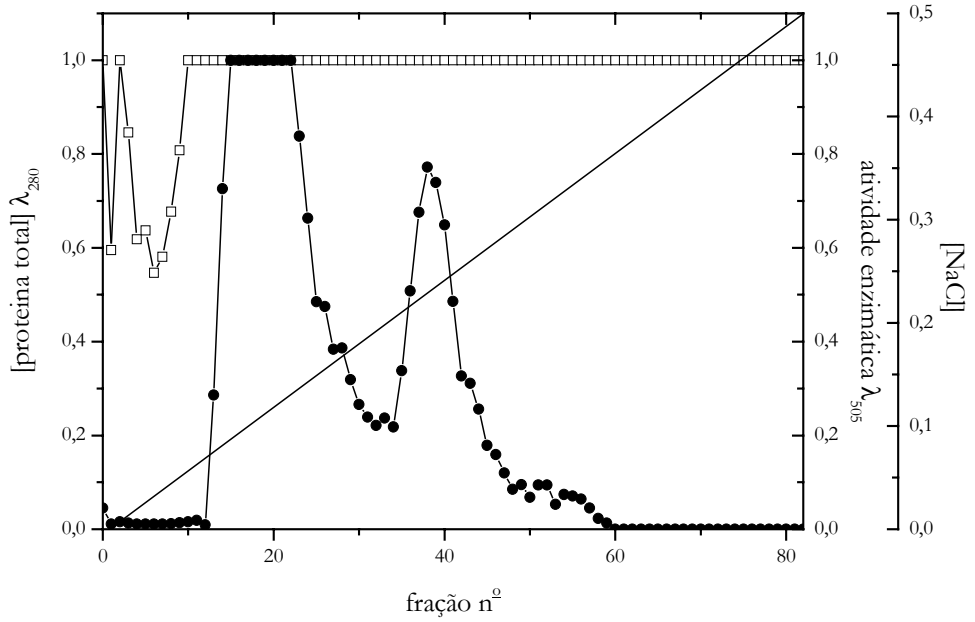


Figura 5.6. Perfil cromatográfico de troca aniônica preparativa, fase estacionária DEAE-Trisacryl, fase móvel tampão fosfato pH 7,5 0,01mol.L^{-1}; —— gradiente salino; –●– atividade enzimática; —□— proteína total.

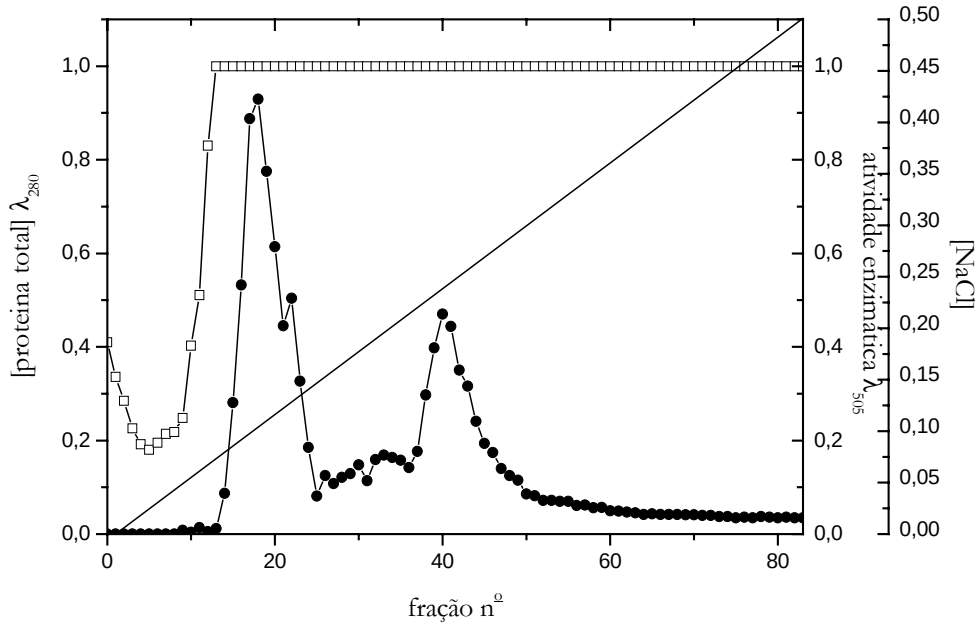


Figura 5.7. Perfil cromatográfico de troca aniônica preparativa, fase estacionária DEAE-Trisacryl, fase móvel tampão fosfato pH 7,5 0,01mol.L$^{-1;}$ —— gradiente salino; –●– atividade enzimática; —□— proteína total

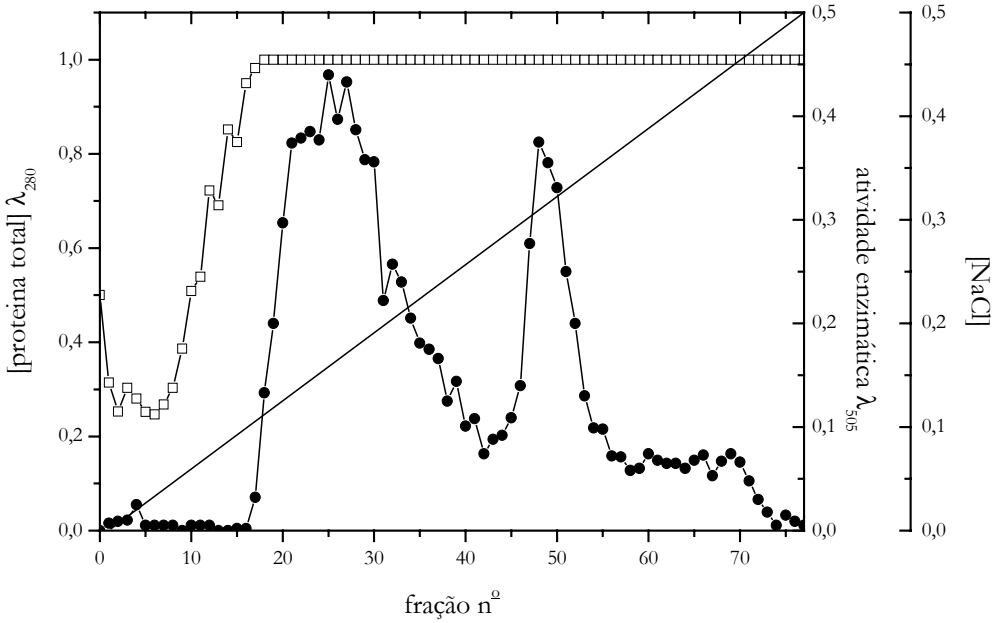


Figura 5.8. Perfil cromatográfico de troca aniônica preparativa, fase estacionária DEAE-Trisacryl, fase móvel tampão fosfato pH 7,5 0,01mol.L^{-1}; —— gradiente salino; –●– atividade enzimática; —□— proteína total

5.2.4 Fracionamento por exclusão molecular em Biogel P-100

As frações ativas de cada crescimento foram reunidas, dialisadas e concentradas por liofilização. As frações do primeiro pico de atividade da cromatografia em DEAE-Trisacryl tiveram três destinos para a filtração, levando-se em conta a faixa de exclusão das resinas filtradoras. O primeiro destes destinos foi uma filtração em gel (Biogel P-100). O resultado da exclusão em Biogel P-100, figura 5.9, indica duas frentes de corridas. A primeira de alta massa molecular é filtrada nas primeiras frações e nessas frações foi detectada a atividade da enzima.

Uma cauda de corrida sem atividade surge ao fim da cromatografia. O cromatograma foi repetido para se avaliar sua reprodutibilidade e esse resultado é apresentado na figura 5.10. Novamente os dois picos de proteína são encontrados atestando a qualidade da cromatografia. No entanto, o tratamento não se mostrou muito eficiente quanto ao procedimento de fracionamento. A causa dessa baixa eficiência da purificação da enzima com Biogel P-100 remete-

nos à sua massa molecular, ainda não estimada, incoerente com a faixa de exclusão mais baixa desta resina.

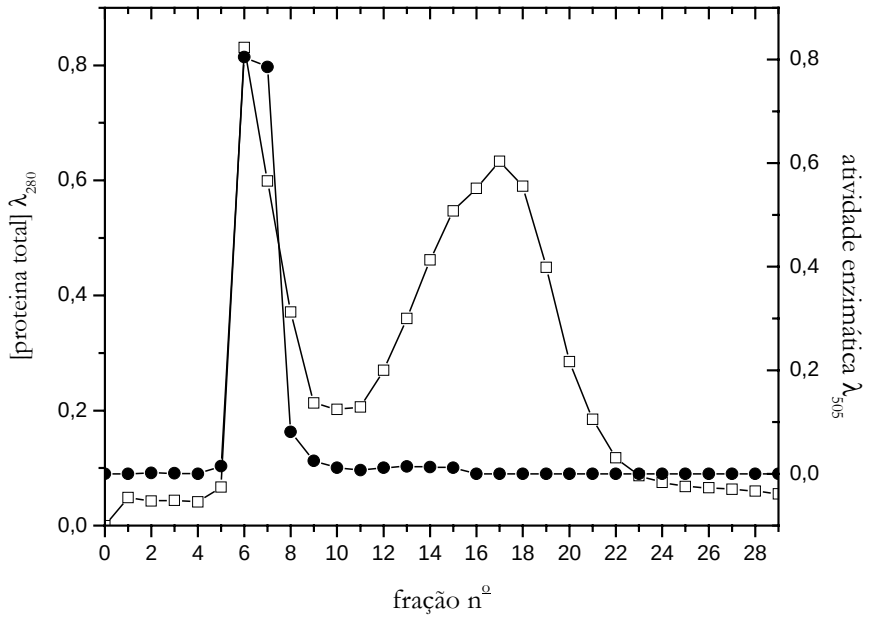


Figura 5.9. Perfil cromatográfico de exclusão molecular, fase estacionária Biogel P-100, fase móvel tampão fosfato pH 7,5 0,01mol.L^{-1}; –●– atividade enzimática; —□— proteína total

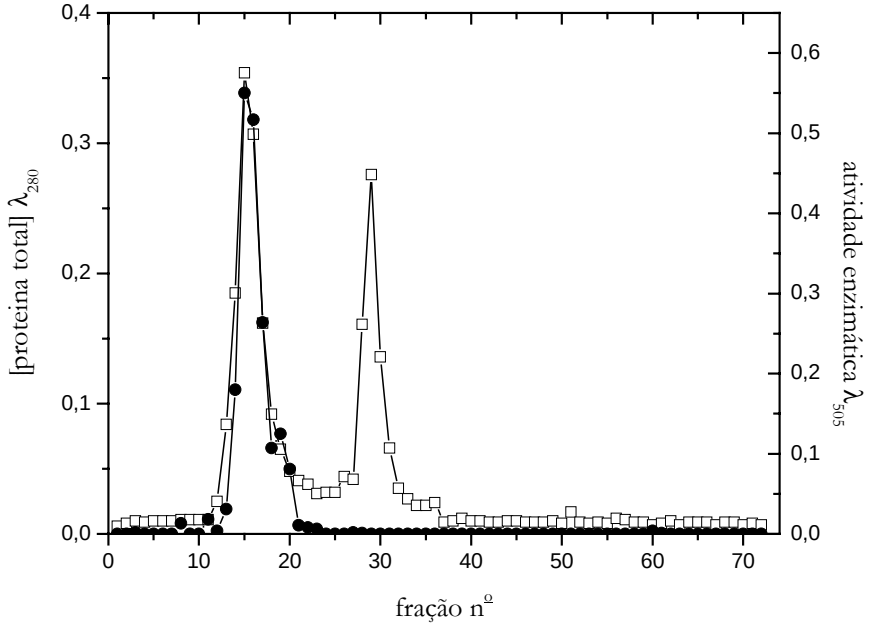


Figura 5.10. Perfil cromatográfico de exclusão molecular, fase estacionária Biogel P 100, fase móvel tampão fosfato pH 7,5 0,01mol.L^{-1}; –●– atividade enzimática; —□— proteína total

Uma vez que a enzima-alvo aparentemente exibia uma massa que exigisse outras condições para a partição por exclusão molecular foi testada, então, a filtração em Sephacryl S-200 HR. As frações ativas foram reunidas e concentradas por liofilização.

5.2.5 Fracionamento por exclusão molecular em Sephacryl S-200 HR

Como os resultados com Biogel P-100 indicaram a necessidade da aplicação de uma resina com faixa de exclusão para massas moleculares mais elevadas, avaliou-se a purificação com a resina Sephacryl S-200 HR. As amostras, provenientes do eluato de DEAE-trisacryl, processadas neste tipo de cromatografia são apresentadas nas figuras 5.11, 5.12 e 5.13.

Nas três corridas há um padrão que se repete com dois picos de proteínas separados, sendo que o primeiro, tão logo recolhido o "void", apresentou atividade de β-galactosidase. O cromatograma se assemelha a eluição de Biogel P 100, porém, com maior seletividade. As frações ativas recolhidas foram reunidas e liofilizadas.

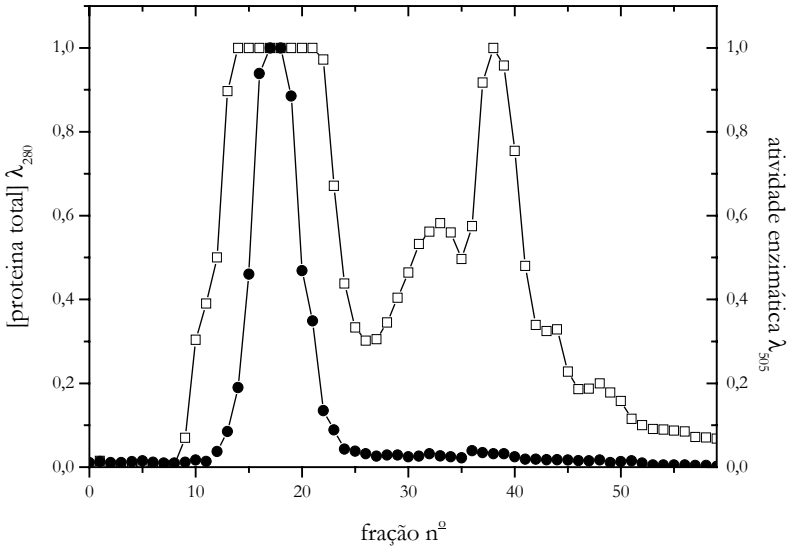


Figura 5.11. Perfil cromatográfico de exclusão molecular, fase estacionária Sephacryl S-200 HR, fase móvel tampão fosfato pH 7,5 0,01mol.L^{-1}; –●– atividade enzimática; —□— proteína total.

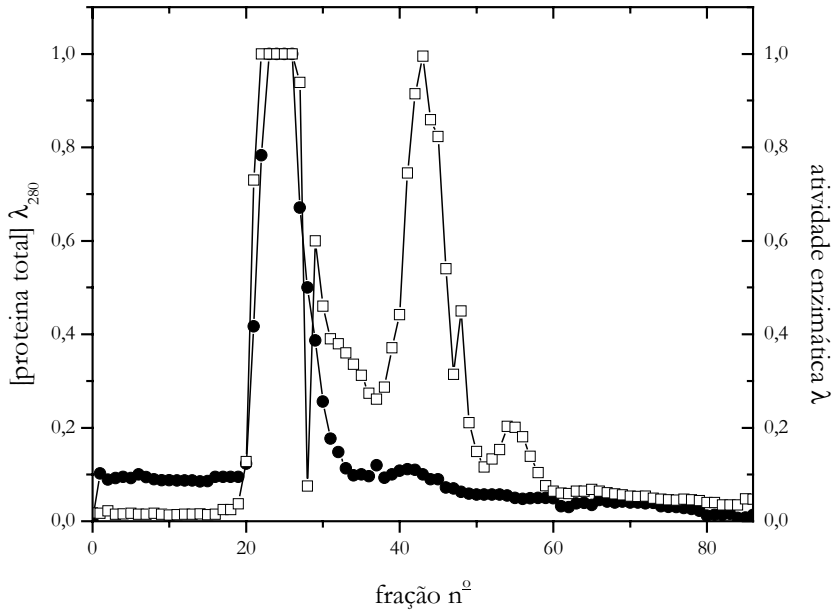


Figura 5.12. Perfil cromatográfico de exclusão molecular, fase estacionária Sephacryl S-200 HR, fase móvel tampão fosfato pH 7,5 0,01mol.L^{-1}; –●– atividade enzimática; —□— proteína total

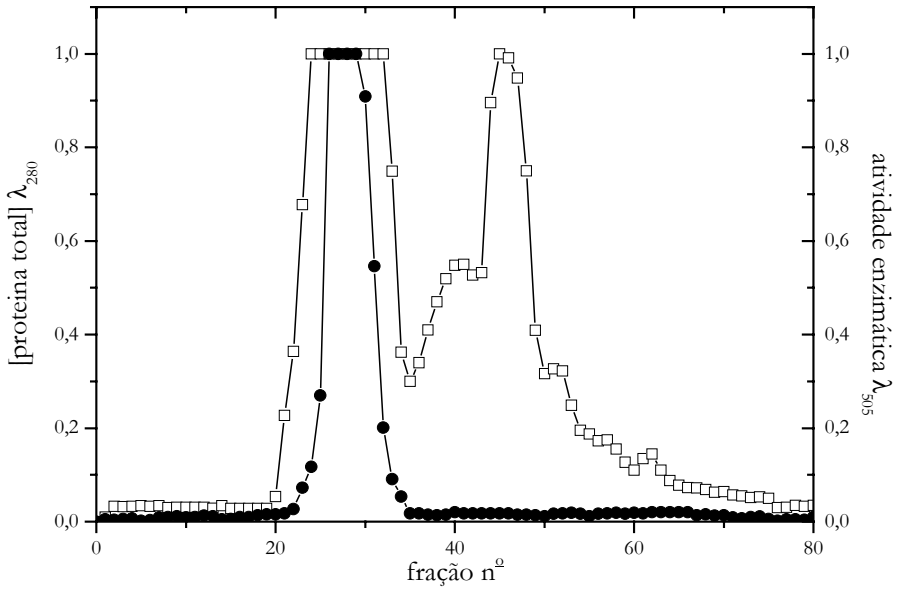


Figura 5.13. Perfil cromatográfico de exclusão molecular, fase estacionária Sephacryl S-200 HR, fase móvel tampão fosfato pH 7,5 0,01mol.L^{-1}; –●– atividade enzimática; —□— proteína total

5.2.6 Fracionamento por exclusão molecular em Sephacryl S-300 HR

Descartada a etapa da filtração em Biogel P-100 e Sephacryl S-200 HR, o eluato de DEAE-Trisacryl foi filtrado em resina de exclusão molecular que se presumia, então, mais adequado para a enzima. O emprego de Sephacryl S-300 HR como fase sólida foi investigado uma vez que as filtrações anteriores indicavam massas moleculares ainda mais elevadas na fração com atividade galactosídica. As figuras 5.14, 5.15 mostram as eluições em exclusão molecular nesta resina.

Ainda que com maior seletividade e com o surgimento de um pico discreto de massa mais elevada que o pico de atividade, a amostra com atividade, para esta resina, repetiu o padrão de migração em Sephacryl S-200 HR. Neste ponto do trabalho já se poderia inferir a formação de um agregado caracterizado pela alta massa exibida e, sobretudo, pela migração eletroforética do eluato desta resina.

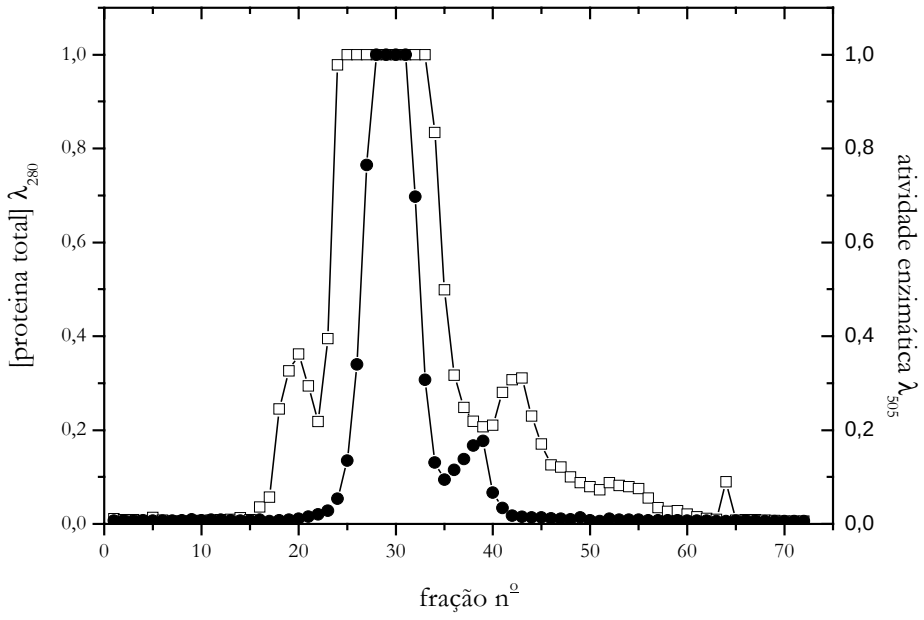


Figura 5.14. Perfil cromatográfico de exclusão molecular, fase estacionária Sephacryl S-300 HR, fase móvel tampão fosfato pH 7,5 0,01 mol.L^{-1}; –●– atividade enzimática; —□— proteína total

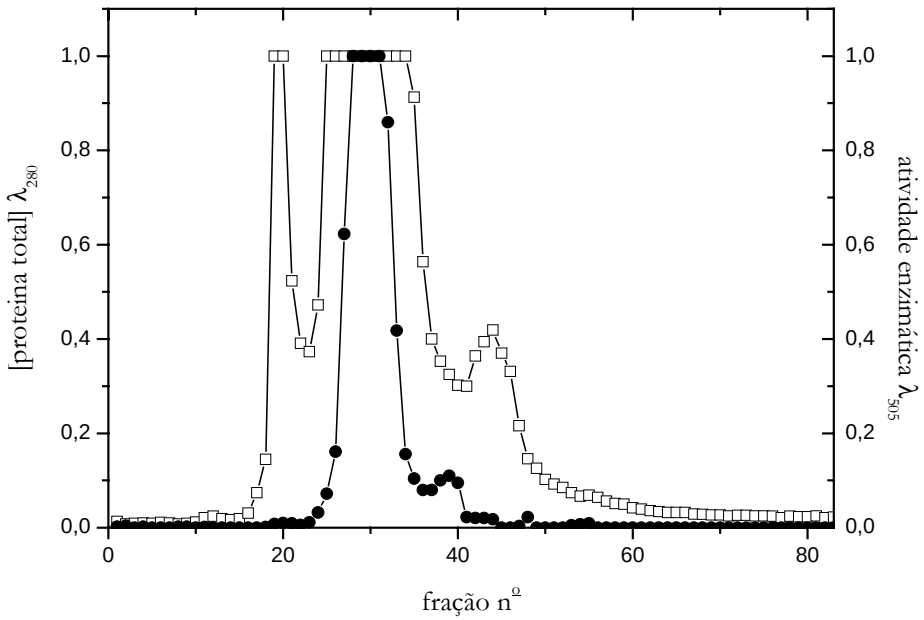


Figura 5.15. Perfil cromatográfico de exclusão molecular, fase estacionária Sephacryl S-300 HR, fase móvel tampão fosfato pH 7,5 0,01 mol.L^{-1}; –●– atividade enzimática; —□— proteína total

A estratégia de romper esse agregado com a adição de Triton X 100 e EDTA 1,00 mmol.L^{-1} foi testada e este material sofreu nova cromatografia em Sephacryl S-300 HR. O perfil cromatográfico encontra-se apresentado na figura 5.16. Novamente o resultado foi a migração de uma frente de corrida de alta massa molecular seguida de uma cauda com características muito semelhantes às corridas sem o surfactante e o quelante.

A amostra, assim obtida, foi submetida à análise pela eletroforese desnaturante (SDS PAGE) das frações colhidas da filtração em Sephacryl S-300 HR (figura 5.17). Com estas corridas, foi possível estabelecer a semelhança entre os perfis obtidos. Atestada a semelhança, reconheceu-se a insuficiência do tratamento pelo qual se esperava a desagregação da massa protéica. A reunião dos eluatos se justificava e procurou-se o isolamento da amostra com uma nova cromatografia de troca catiônica. O material foi dialisado e concentrado por liofilização.

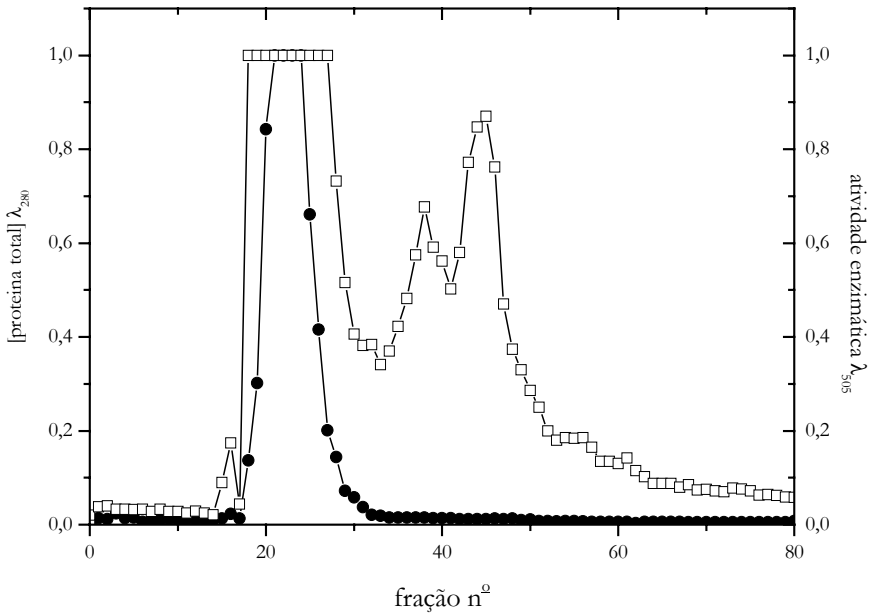


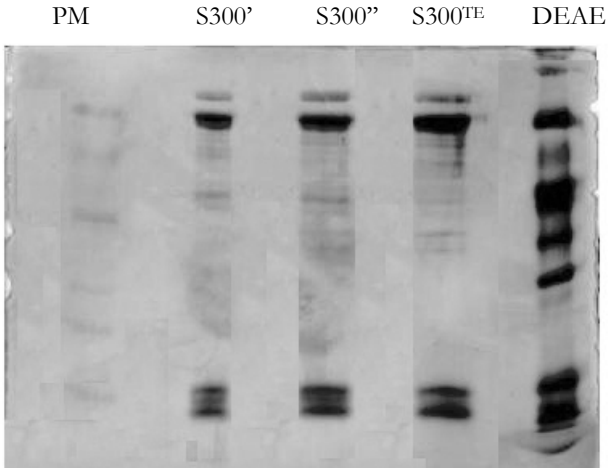
Figura 5.16. Perfil cromatográfico de exclusão molecular, fase estacionária Sephacryl S-300 HR, fase móvel tampão fosfato pH 7,5 0,01mol.L^{-1} adicionado de surfactante Triton X 100 0,02% e EDTA 10^{-3}mol.L^{-1}; –●– atividade enzimática; —□— proteína total.

5.2.7 Fracionamento por coluna de troca catiônica S Sepharose

O material liofilizado foi diluído em tampão formiato de amônio (10,0 mmol.L^{-1}, pH 4,5) e submetido à cromatografia por troca catiônica em S Sepharose. A opção por esse trocador foi tomada com a intenção de ampliar o leque de interações possíveis entre as resinas e a amostra, com o que se objetivou o isolamento da enzima-alvo. Assim, como trocador ácido, a resina foi equilibrada com tampão formiato, 10 mmol.L^{-1}, pH 4,5. O resultado da cromatografia preparativa é expresso na figura 5.18. A resina, tal como tratada, favoreceu uma forte interação de seus grupos com as proteínas aplicadas, sendo necessária alta força iônica para que a troca se realizasse. As frações ativas foram eluídas com concentrações de 0,35 a 0,40 mol.L^{-1} de NaCl.

A forte interação, a baixa recuperação e a mínima eficiência de purificação justificaram uma correção do pH de corrida, passando para 5,5. As figuras 5.19, 5.20 e 5.21 exibem essas corridas neste pH. A cromatografia resultou na confirmação de um agregado que mais tarde viria a criar obstáculos para os testes que se destinavam à produção da enzima. As frações foram

reunidas e o excesso de sal foi eliminado por diálise para que permitisse a liofilização. Concentrada a amostra, registrou-se a atividade específica e procedeu-se à avaliação do seu perfil eletroforético.



.

Figura 5.17. SDS-PAGE das frações ativas reunidas de cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-300 HR. S-300' e S-300": primeira e segunda filtrações com tampão fosfato respectivamente; S^{TE}: corrida com tampão adicionado de surfactante e quelante; DEAE: eluato do pico BGT I de DEAE-Trysacryl; PM: padrões de massas moleculares (fosforilase= 94 kDa; albumina bovina= 76kDA; ovalbumina= 43 kDa; anidrase carbônica= 30 kDa; inibidor de tripsina= 20,1 kDa; α-lactalbumina 14,4kDa)

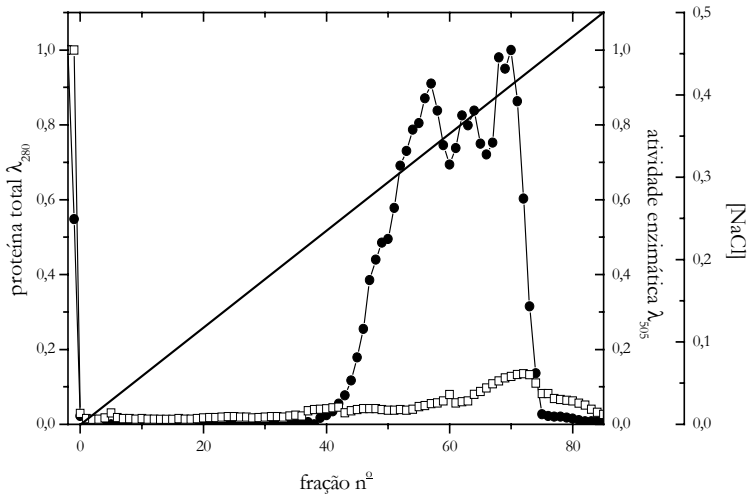


Figura 5.18. Perfil cromatográfico de troca catiônica preparativa, fase estacionária S Sepharose, fase móvel tampão formiato, pH 4,5, 0,01 mol.L^{-1};—— :gradiente salino; –●– atividade enzimática; —□— proteína total

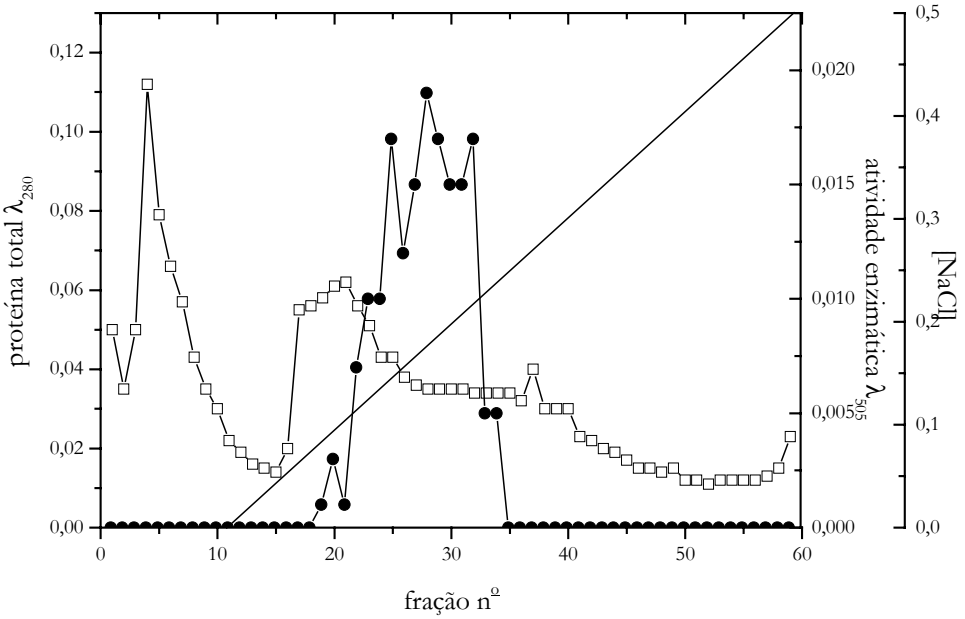


Figura 5.19. Perfil cromatográfico de troca catiônica preparativa, fase estacionária S Sepharose, fase móvel tampão formiato, pH 5,5, 0,01 mol.L^{-1}; —— gradiente salino; –●– atividade enzimática; —□— proteína total.

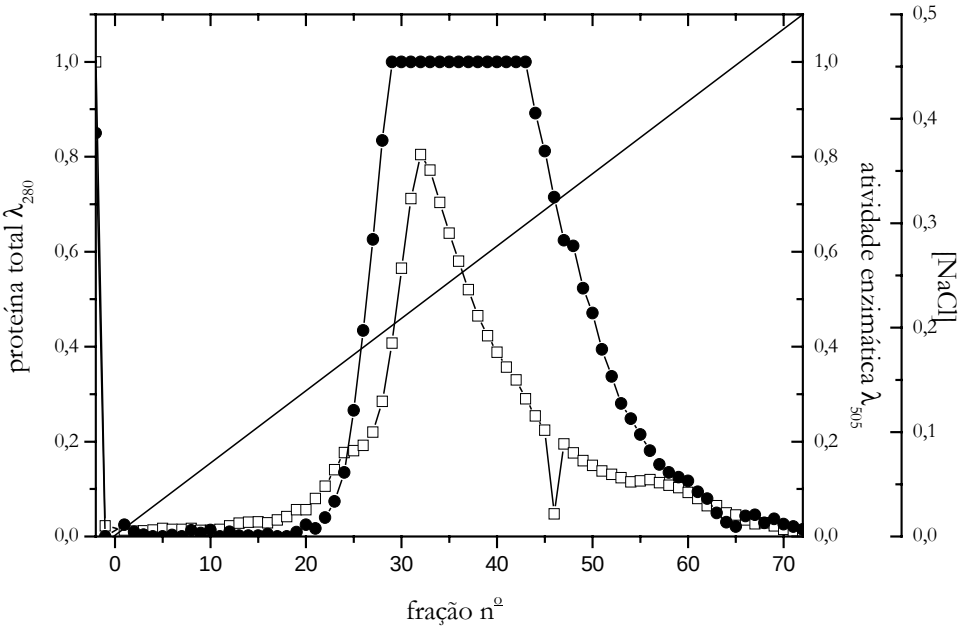


Figura 5.20. Perfil cromatográfico de troca catiônica preparativa, fase estacionária S Sepharose, fase móvel tampão formiato, pH 5,5, 0,01 mol.L^{-1};—— gradiente salino; –●– atividade enzimática; —□— proteína total

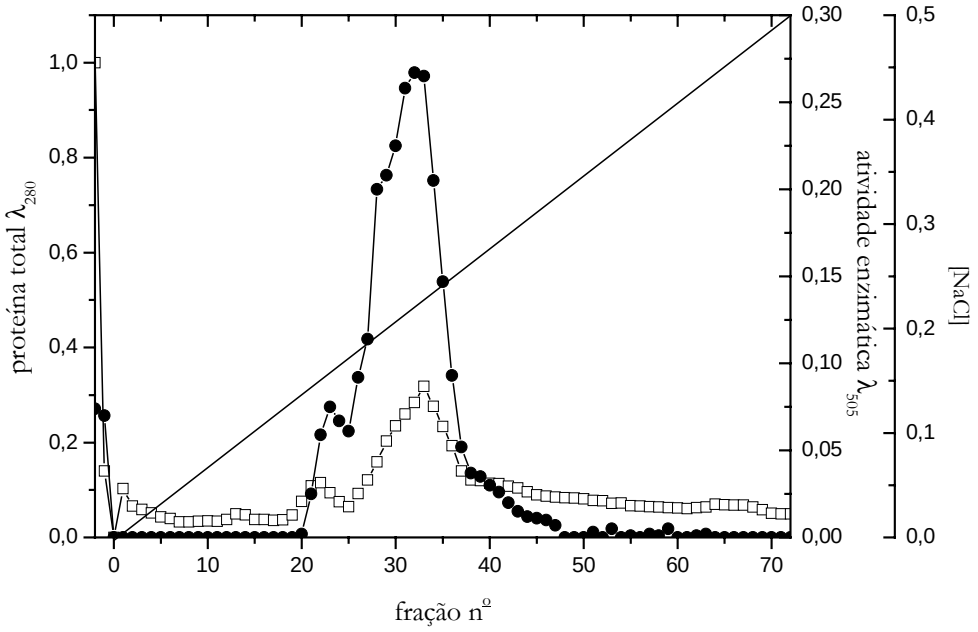


Figura 5.21. Perfil cromatográfico de troca catiônica preparativa, fase estacionária S Sepharose, fase móvel tampão formiato, pH 5,5, 0,01 mol.L^{-1}. —— gradiente salino; –●– atividade enzimática; —□— proteína total.

5.3 Eletroforeses

5.3.1 Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As eletroforeses apresentadas na figura 5.22 ilustram as várias etapas do isolamento das frações. Na amostra originária da precipitação com sulfato de amônio, raia A, a riqueza do extrato provoca alguma sobreposição de bandas. O primeiro procedimento cromatográfico a eluição em DEAE-trisacryl, raia B, destaca bandas com massas moleculares mais altas e o esmaecimento de várias bandas. A raia C se refere ao eluato de Sephacryl S-300 HR. Proteínas de massa molecular menores que 50 kDa, abaixo da faixa de exclusão da resina, eluem com as de mais alta massa molecular indicando a formação do agregado. A cromatografia de troca catiônica, raia D, (S Sepharose) suprime certas bandas, contudo não aquelas que se unem no agregado. Na raia E está registrado o padrão eletroforético do pico de atividade eluído de DEAE-Trisacryl (BGT II).

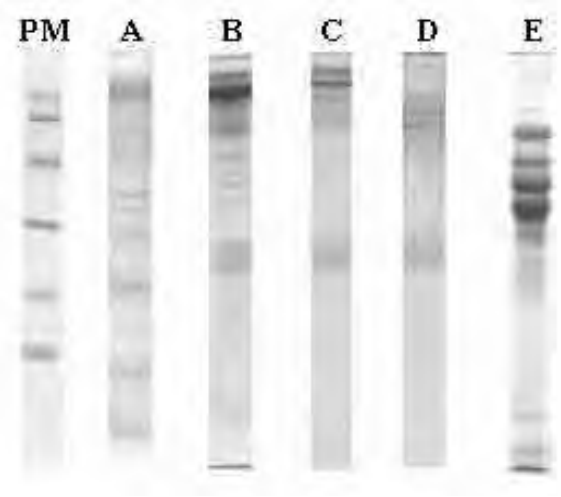


Figura 5.22. Eletroforeses (SDS-PAGE) de frações ativas de β-galactosidase, para as etapas envolvidas no protocolo empregado. PM - marcadores de massa molecular (fosforilase= 94 kDa; albumina bovina= 76kDA; ovalbumina= 43 kDa; anidrase carbônica= 30 kDa; inibidor de tripsina= 20,1 kDa; α-lactalbumina 14,4kDa); A - extrato precipitado com sulfato de amônio; B- troca aniônica DEAE-Trisacryl (1º. pico); C- filtrado Sephacryl S-300 HR; D- troca catiônica S-Sepharose e E- 2ª.fração ativa DEAE-Trisacryl (BGT II).

Embora não tenha sido possível a obtenção da homogeneidade com as enzimas, o perfil salino linear da troca iônica através da DEAE-Trisacryl revelou que a β-galactosidase de *T. reesei* FTKO ocorre em duas isoformas. A variação da força iônica ou o uso de surfactante e quelante não foram eficientes na dissociação do agregado formado, o que foi atingido apenas com o agente redutor β-mercaptoetanol. O agregado se mostra bastante estável a 4º C, sem atividade proteolítica detectável contando com sete ou nove bandas reveladas por SDS-PAGE.

A isoforma BGT I foi eluída da coluna de DEAE-Trisacryl quando a concentração da solução salina atinge 0,15 mol.L^{-1} e a segunda β-galactosidase, BGT II, quando o gradiente atinge concentrações superiores a 0,20 mol.L^{-1}. Na tabela 5.4 estão os resultados da purificação de ambas as enzimas. A produção de mais de uma β–galactosidase por *T. reesei* FTKO é similar a resultados obtidos com β-galactosidases de outras fontes[8, 21, 27, 71] O processo de purificação resultou em uma concentração de 16,4 vezes com um rendimento de 23,0 %, para BGT I, e numa purificação de 5,4 vezes com um rendimento de 25,4 %, para BGT II.

Tabela 5.4 purificação de β-galactosidases extracelulares de *T. reesei* FTKO

Etapa	Teor protéico ($mg.mL^{-1}$)	UA[a] ($\mu mol.min^{-1}.mL^{-1}$)	Uesp [a] ($\mu mol.min^{-1}.mg^{-1}$)	Purificação	Rendimento (%)
extrato bruto	109,54 ± 21,43	0,543 ± 0,05	$4,96.\ 10^{-3}$±0,71	1	100
t. diatomácea[b]	112,65 ± 9,08	0,509 ± 0,01	$4,52.\ 10^{-3}$±0, 18	0,9	93,7
$(NH_4)_2SO_4$	59,89 ± 5,25	6,05± 0,46	$1,0.\ 10^{-2}$±0, 025	2,0	111,4
DEAE-trisacryl[b]					
(BGT-I)	1,97± 0,21	0,12± 0,23	$6,36.\ 10^{-2}$ ±0, 41	12,8	23, 1
(BGT-II)	5,12± 0,14	0,14± 0,20	$2,70.\ 10^{-2}$±0,33	5,4	25,4
S-300 HR[c] (BGT-I)	2,01± 0,25	0,13± 0,81	$6,23.\ 10^{-2}$±0, 57	12,6	23,2
S Sepharose[d] (BGT-I)	1,54± 0,01	0,12± 0,57	$8,12.\ 10^{-2}$ ±0,32	16,4	23,0

[a] em *o*-NPG $1,5.10^{-2}$ $mol.L^{-1}$, tampão fosfato $5,0.10^{-2}$ $mol.L^{-1}$, $MgCl_2$ 10^{-3} $mol.L^{-1}$ (pH 7,5, 30° C)

[b] tampão padrão de fosfato de sódio 10^{-2} $mol.L^{-1}$ e $MgCl_2$ 10^{-3} $mol.L^{-1}$ (4° C, pH 7,5)

[c] tampão fosfato de sódio 10^{-2} $mol.L^{-1}$; 0,02% Triton X 100; EDTA 10^{-4} $mol.L^{-1}$ e $MgCl_2$ 10^{-3} $mol.L^{-1}$ (4° C, pH 7,5)

[c] tampão formiato 10^{-2} $mol.L^{-1}$; 0,02% Triton X 100; EDTA 10^{-4} $mol.L^{-1}$ e $MgCl_2$ 10^{-3} $mol.L^{-1}$ (4° C, pH 5,5)

5.3.2 Atividade da enzima em gel de eletroforese nativa

Extraídas de corridas de eletroforese do extrato bruto e de frações reunidas dos picos de atividade eluídas de DEAE-Trisacryl, as migrações relativas das enzimas estão apresentadas na tabela 5.5. Foram obtidos os valores de mobilidade relativa de 0,640 ± 0,010 para a primeira banda e de 0,515 ± 0,005, para a segunda.

As duas bandas de redução do nitrobluetetrazólio que surgiram devido às reações acopladas a partir da digestão da lactose, por enzimas presentes no extrato, sugerem diferentes enzimas nas frações eluídas da cromatografia. Nota-se que as bandas de atividade das frações isoladas entre si coincidem estatisticamente com as bandas reveladas na corrida do extrato cru. A atividade registrada em gel de eletroforese oferece outra evidência da produção de duas isoformas por *T. reesei* FTKO.

Tabela 5.5 atividade positiva de β-galactosidase em PAGE 6% [a] do extrato cru e das frações parcialmente purificadas em DEAE-Trisacryl

	R_f[b]		
	Extrato cru	DEAE-Trisacryl Pico I	DEAE-Trisacryl Pico II
BGT I	0,630	0,650	- [c]
BGT II	0,520	- [c]	0,510

[a] a atividade enzimática foi monitorada pelo método de coloração acoplado de glicose-oxidase descrito na metodologia

[b] Coeficiente de mobilidade relativa

[c] atividade não detectada

5.4 Caracterização das isoformas de *T. reesei* FTKO

Uma vez que não foi atingida a homogeneidade da purificação da enzima, as informações aqui recolhidas dizem respeito a frações apenas parcialmente purificadas o que implicou na impossibilidade de se aplicar técnicas de investigações estruturais como proposto originalmente no projeto. Os parâmetros físico-químicos e cinéticos das isozimas isoladas foram definidos. As informações termodinâmicas da catálise enzimática oferecem acesso a detalhes conformacionais da hidrólise do substrato[68]. O papel dos metais na enzima poderia assim ser investigado com menores exigências de homogeneidade da amostra.

5.4.1 Parâmetros físico-químicos

5.4.1.1 Temperatura ótima

As enzimas tiveram seus ótimos de temperatura determinados. A figura 5.23 mostra os resultados destes ensaios. É possível inferir para ambas as isozimas um ótimo de 65º C. As energias de ativação (E_A), foram calculadas da porção linear do gráfico de Arrhenius (figura 5.24). Foram obtidos os valores 32.5 kcal. mol^{-1} e 35.2 kcal. mol^{-1} para BGT I e BGT II respectivamente. Desta forma, as enzimas parcialmente purificadas foram caracterizadas como termofílicas.

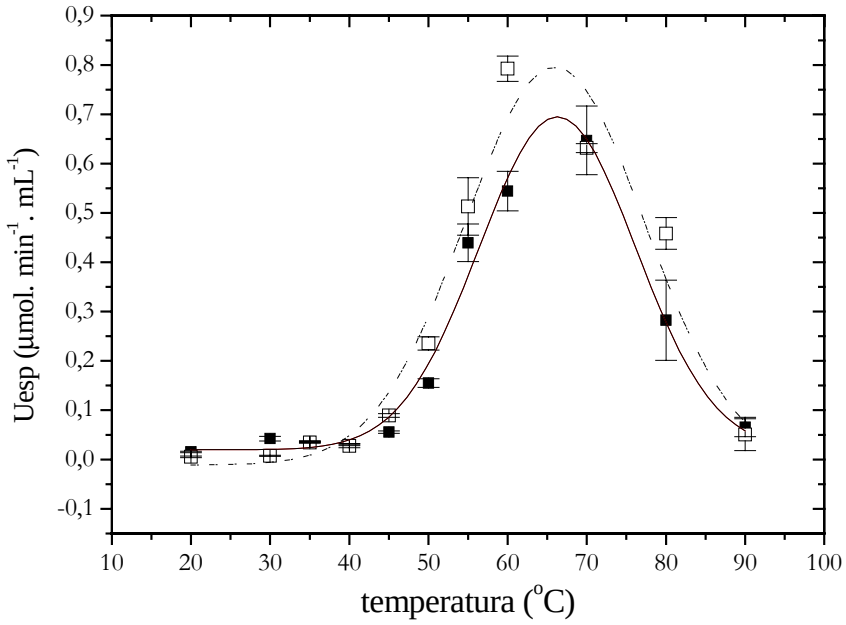


Figura 5.23. Efeito da temperatura sobre a atividade das isozimas BGT I (–■–) e BGT II (---□---) de β-galactosidases de *T. reesei* FTKO..

A variedade de ótimos de temperatura de β-galactosidases das diferentes fontes reflete sua ampla distribuição na vida. Vian *et al*[26] trabalhando com formas quiméricas de β-galactosidase de *Thermus sp*. obteve temperatura ótima de 90º C. Uma β-galactosidase termoestável foi imobilizada e manteve o ótimo de temperatura de 78º C [21]. Li et al.[24.] caracterizaram, em sementes de feijão, cinco diferentes isoformas com temperaturas ótimas de 50 e 53º C. Hoyoux *et al*[23].apontam ótimos de temperatura de 10º C para uma β-galactosidase proveniente de psicrófilos antárticos.

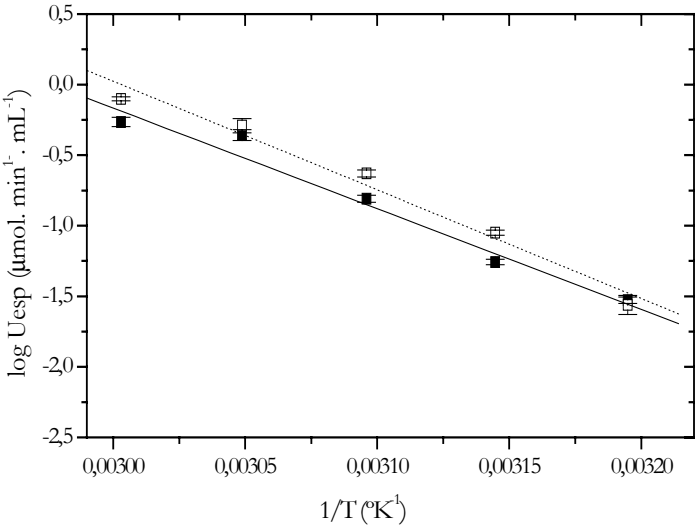


Figura 5.24. Tratamento de Arrhenius para a hidrólise de *o*-NPG por BGT I (–■–) e por BGT II (---□---).

5.4.1.2 pH Ótimo

Embora as isozimas aqui estudadas apresentem similaridade de comportamento térmico, elas se distinguem claramente em seus ótimos de pH. BGT I apresenta seu máximo de pH em torno de 4,5 e BGT II tem um máximo em pH menos ácido igual a 6,5 (figura 5.25). Mbuyi-Kabala *et al.*[74] isolaram quatro isoformas de *Saccharomyces lactis* as quais exibiam pHs máximos de 7,0. Van Laere *et al.*[75] descrevem uma β–galactosidase com pH em torno de 6,0. Uma β–galactosidase extraída de *Actinomyces viscosus* apresenta uma estreita faixa de ótimo de pH entre 6,0 e 6,5 [76]. Lactase-florizina-hidrolase uma β-galactosidase intestinal de mamíferos demonstra consistentemente pH ótimo de 6,0 [77, 78, 79]. Li *et al.*[24] descreveram cinco ótimos de pH, entre 3,0 e 4,0 para cada espécie isolada durante a germinação de sementes de feijão.

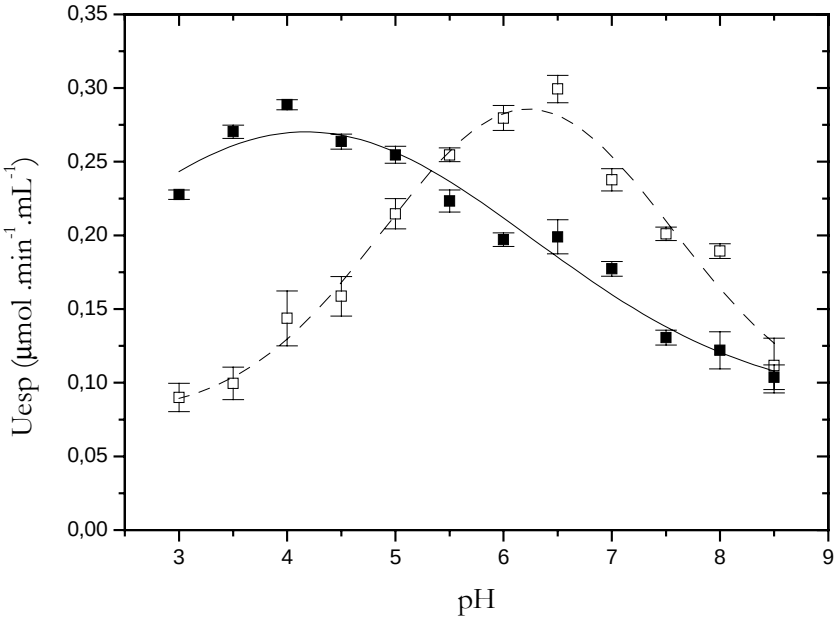


Figura 5.25. Atividade de BGT I (–■–) e de BGT II (---□---) em função do pH. Os experimentos foram conduzidos em tampão McIlvaine a 65º C.

5.4.1.3 Estabilidade térmica

As isozimas exibiam alta estabilidade a 65º C em tampão fosfato de sódio. Para a temperatura testada a atividade de BGT I decresceu até a metade de seu máximo em 128 minutos e com BGT II isso ocorre após 118 minutos, (figura 5.26). O registro de desativação térmica de várias β-galactosidases na literatura são definidos em 10 minutos a 45º C [77], ou 30 minutos a 50º C que se eleva a 160 minutos a 42º C[3]. A bactéria termofílica *Thermus sp.* produz uma β-galactosidase que não é desativada antes de 30 minutos a 90º C. Linhagens de *Saccharopolyspora rectivirgula* mantêm-se estáveis a 22 horas a 60º C na presença de metais divalentes combinados a altas doses de substrato, na omissão de metais e substrato, nesta temperatura, a estabilidade cai para 1 hora[28]. Efetivamente metais coordenados, substrato e ajuste de pH aumentam a estabilidade térmica de muitas β-galactosidases [80, 12, 12, 65].

Na figura 5.26 pode-se notar um aumento de 40% na atividade de BGTII após 30 minutos de tratamento térmico. Este efeito foi apontado em outras β-galactosidases

possivelmente causado por ativação térmica da catálise[26]. A termotolerância de ambas isozimas de *T. reesei* FTKO refletem as necessidades do organismo.

5.4.1.4 Estabilidade em pH

A isoforma BGT II demonstrou ser mais sensível que BGT I às variações de pH. BGT I apresenta boa estabilidade em ambientes mais ácidos e mantém um alto resíduo de atividade perdendo menos de 10% de seu máximo em meio alcalino no tempo testado.Por sua vez, BGT II tolera menores variações fora de seu pH ótimo, assumindo um contorno simétrico. Nos extremos experimentais a medida de atividade retem um resíduo menor que 60% do seu máximo de atividade em pH ótimo, figura 5.27.

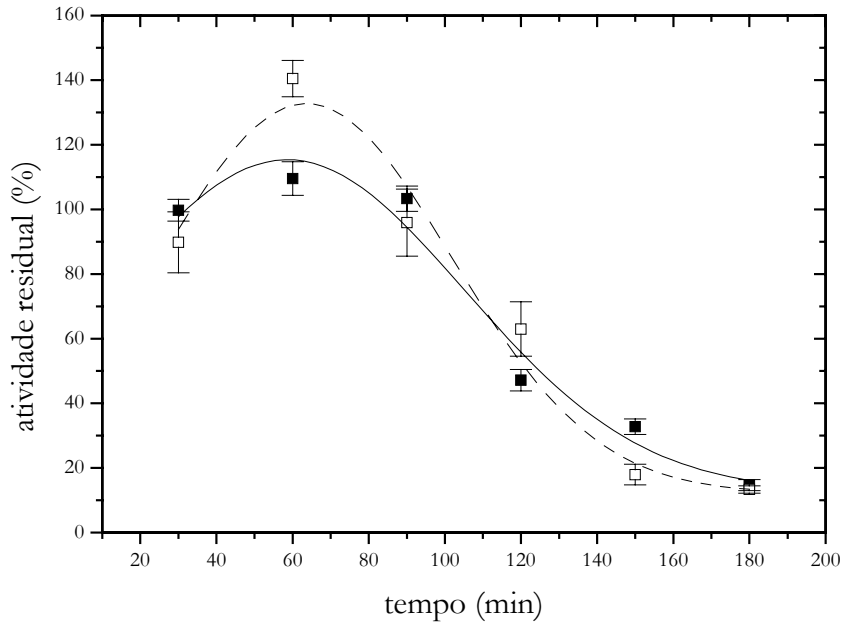


Figura 5.26. Curvas de desativação térmica da hidrólise de *o*-NPG por BGT I (–■–), medida em pH 4,5 e por BGT II (---□---), medidas em pH 6,5.

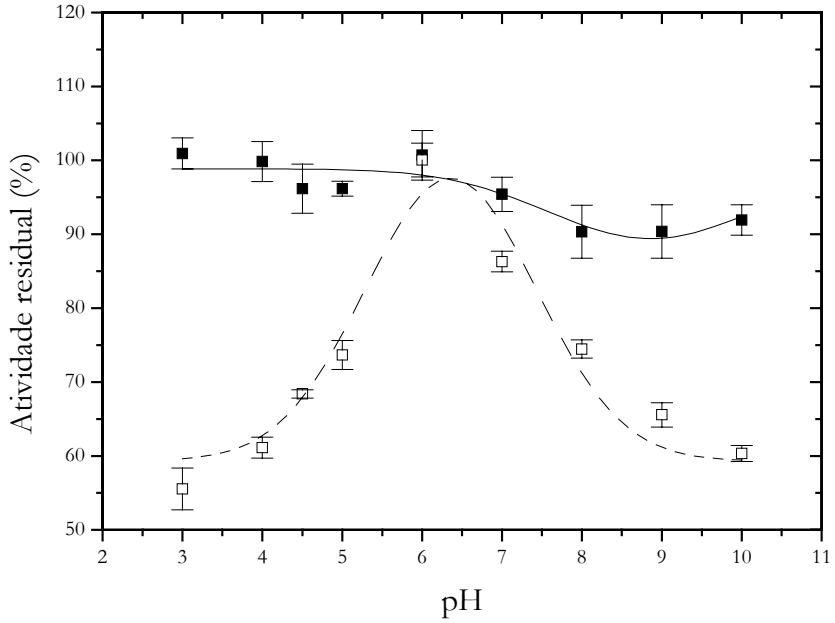


Figura 5.27. Estabilidade ao pH na hidrólise de *o*-NPG por BGT I (–■–) e por BGT II (---□---). O ensaio com *o*-NPG ocorreu após 30 minutos de exposição a 65 ◦ C em tampão McIlvaine com 10^{-4} mol L^{-1} de $MgCl_2$. A atividade residual foi analisada em função dos valores de pH.

5.4.2 Parâmetros Cinéticos

Os valores de K_m e V_{max} de BGT I e BGT II com β-galactosídeos artificiais, figura 5.28, e naturais, figura 5.29, como substratos foram calculados nas respectivas condições ótimas. As eficiências catalíticas, são expressas como V_{max} /K_m , de ambas β-galactosidases para *o*-NPG e lactose respectivamente.

Medidas de ambas enzimas, em ensaios com concentração crescente dos substratos, resultaram em gráficos hiperbólicos, indicando uma típica cinética michaeliana. Os valores obtidos de constantes de Michaelis-Menten (Km) dos agregados contendo BGT I são iguais a 1,65 mmol.L^{-1}, tendo *o*-NPG como substrato, e 21,68 mmol.L^{-1} para lactose (tabela 5.6). Os valores de Km para BGT II são iguais a 2,66 mmol.L^{-1} com *o*-NPG e 19,01 mmol.L^{-1} com lactose (tabela 5.6). A literatura registra para β-galactosidases de diferentes fontes valores de Km tomados com *o*-NPG de 1,7 mmol.L^{-1} [12], 0,1 mmol.L^{-1} , 2,5 mmol.L^{-1} , 2,6 mmol.L^{-1} , 12.6 mmol.L^{-1} [74], 19,1 mmol.L^{-1} [28], 2,3 mmol.L^{-1} [81], 2,4 mmol.L^{-1} [23], 0,17 mmol.L^{-1} [13], 0,12 mmol.L^{-1} [18],

4,9 mmol.L^{-1} [82], 0,17 mmol.L^{-1} [15] e para valores tomados com lactose de 25,8 mmol.L^{-1} [80], 17,3 mmol.L^{-1} [12], 26,1 mmol.L^{-1} [28], 6,0 mmol.L^{-1} [76], 14,8 mmol.L^{-1} [78], 21,0 mmol.L^{-1} [79] e 1,35 mmol.L^{-1} [83].

Os valores de V_{max} de ambas as enzimas foram determinados nas condições de temperatura e pH definidos previamente para cada enzima tendo como substratos *o*-NPG e lactose. Para BGT I os valores obtidos foram 0,55 μmol.min^{-1} mg^{-1} e 0,26 μmol.min^{-1}. mg^{-1} para *o*-NPG e lactose, respectivamente (tabela 5.6). Estes valores obtidos para BGT II com *o*-NPG e lactose como substratos respectivamente foram 0,41 μmol.min^{-1}. mg^{-1} e 0,18 μmol.min^{-1}. mg^{-1} (tabela 5.6). A literatura define, para diferentes β-galactosidases, os valores de Vmax com *o*-NPG de 77,6 μmol.min^{-1}. mg [12], 0,03 μmol.min^{-1}. mg [28], 350 μmol.min^{-1}. mg [13], 467 μmol.min^{-1}. mg [82] e 350 μmol.min^{-1}. mg [15]. Relativos à lactose os valores são: 7,1 μmol.min^{-1}. mg [80], 123,7 μmol.min^{-1}. mg [12], 0,75 μmol.min^{-1}. mg [28].

A caracterização dos agregados contendo cada isoforma de β-galactosidase foi realizada, também com a intenção de se verificar as suas individualidades. Ao se analisar os resultados apresentados na tabela 5.6 pode-se concluir que *T. reesei* FTKO produz duas isozimas de β-galactosidase. A eluição em dois picos em DEAE-Trisacryl, as bandas de atividades em PAGE, apresentadas na tabela 5.5, e a especificidade ao substrato de cada isoforma ilustrada nas medidas cinéticas oferecem evidência de que BGT I e BGT II consistem de duas cadeias polipeptídicas não idênticas.

T. reesei possui um dos mais estudados sistemas de enzimas celulolíticas, contudo suas β-glicosidases não estão bem estabelecidas[55]. Os resultados obtidos neste trabalho contribuiu para o estabelecimento da produção de diferentes isozimas β-galactosidase por *T. reesei* FTKO. Salienta-se que esta contribuição está de acordo com os registros de que β-galactosidases podem ser codificadas por outros organismos a partir de uma família multigênica[24, 74, 25]. Uma justificativa

para o organismo produzir isozimas com diferenças nas propriedades passa pelo melhor aproveitamento dos nutrientes presentes no meio em que o organismo cresce.

Tabela 5.6 parâmetros comparados de ambas isozimas de β-galactosidases produzidas por *Trichoderma reesei* FTKO determinados a 65ºC e pH 4,5 para BGT I ou 6,5 para BGT II usando-se *o*-NPG e lactose como substratos

Substrato	BGT I			BGT II		
	K_m [a]	V_{max} [b]	V_{max} / K_m	K_m [a]	V_{max} [b]	K_m/V_{max}
o-NPG	1,65	0,55	0,33	2,66	0,41	0,15
Lactose	21,68	0,26	0,01	19,01	0,18	0,01

[a] ($mmol.L^{-1}$)

[b] ($\mu mol.min^{-1}.mg$)

A isoforma BGT I entre as enzimas produzidas por *T. reesei* FTKO foi definida como objetivo dos estudos da importância do metal na atividade da β-galactosidases. O trabalho se direcionou para a investigação no estabelecimento dos efeitos da substituição do centro metálico na atividade desta enzima.

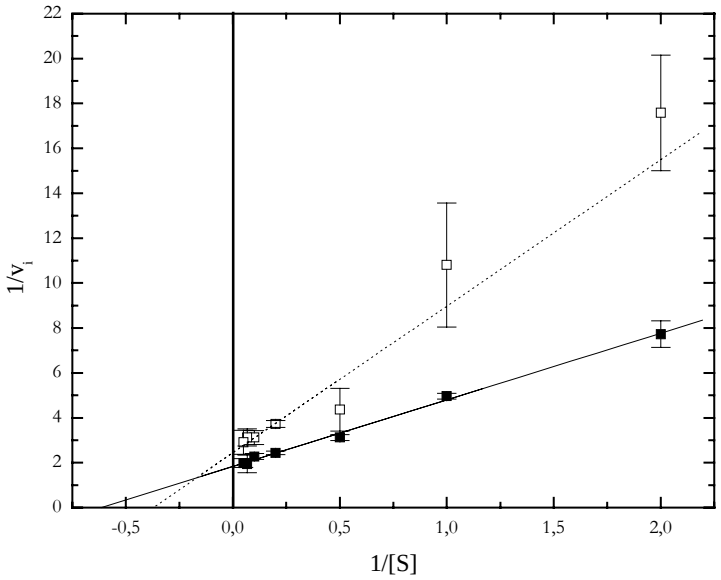


Figura 5.28. Curvas de Lineweaver-Burk obtidas com *o*-NPG de ambas β-galactosidases isoladas. Para BGT I (–■–) as reações ocorreram em pH 4,5 e a 65ºC. Para BGT II (---□---) as reações ocorreram em pH 6,5 e a 65ºC .

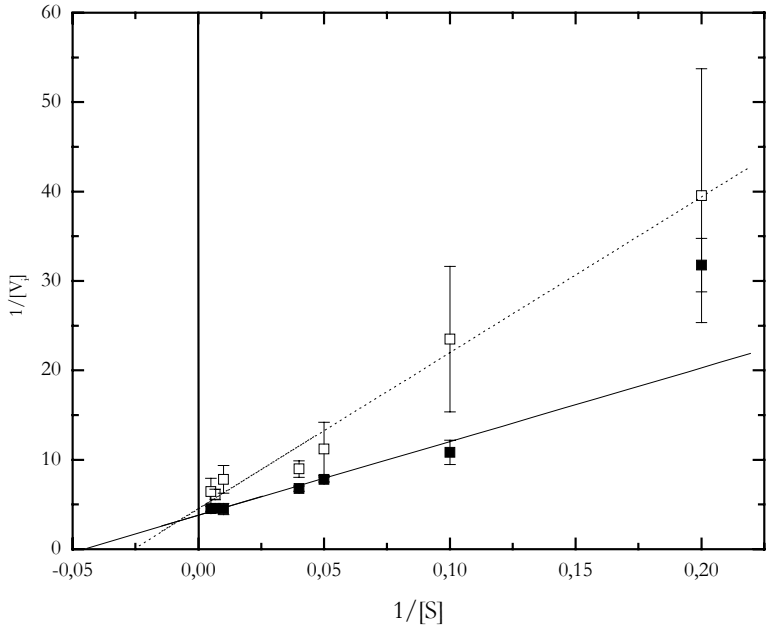


Figura 5.29. Curvas de Lineweaver-Burk obtidas com lactose de ambas β-galactosidases isoladas. Para BGT I (–■–) as reações ocorreram em pH 4,5 e a 65ºC. Para BGT II (---□---) as reações ocorreram em pH 6,5 e a 65ºC.

5.5 Necessidade de metal na atividade de β–galactosidases

5.5.1 Testes de desativação de BGT I: diálise com EDTA como quelante e eletrodiálise

As β-galactosidases para atingir seu ótimo de atividade necessitam de metais como Mg^{2+}, Mn^{2+}e outros[30]. Agentes quelantes como o EDTA e a *o*-fenantrolina promovem a inativação reversível da enzima por competir com a enzima pela coordenação do metal[7, 72, 73]. Por isso a diálise contra agentes quelantes tem demonstrado sua eficiência na desativação de algumas metaloenzimas[74].A proposição de avaliar a mediação metálica da catálise enzimática das preparações parcialmente purificadas demandou o emprego de protocolos de desativação.

Os registros obtidos em diálises contra EDTA atestam a eficiência do método, além de ser conduzido com equipamento relativamente simples[72]. Uma proposta para se aumentar a eficiência dessa metodologia sob uma corrente elétrica (eletrodiálise) fez-nos lançar mão destas alternativas. Os resultados são apresentados na tabela 5.7.

Tabela 5.7 eficiência dos tratamentos de desativação de BGT I pela remoção do metal coordenado à enzima

Tratamento	BGT I			
	UA[1] (μmol.min.mL^{-1})	UA[2] (μmol.min.mL^{-1})	Atividade Residual (%)	Desativação (%)
diálise	0,482 ± 0,015	0,497 ± 0,012	1,031	-3,1
diálise contra EDTA	0,510 ± 0,021	0,489 ± 0,025	0,959	4,1
eletrodiálise	0,472 ± 0,012	0,443 ± 0,017	0,939	6,1

[1]- atividade pré-tratamento
[2] – atividade pós-tratamento

A ineficiência dos métodos empregados ficou comprovada para amostras testadas. A diálise simples, com tampão fosfato sem o agente quelante não desativou a enzima e estimulou um ligeiro aumento na atividade da enzima, ainda que pouco significativo para se inferir a esse tratamento um efeito ativador. Os tratamentos que incluíam o EDTA e a eletrodiálise promovem uma leve desativação, dentro da margem de erro experimental. Os registros na literatura apontam, contudo, para efeitos de desativação de grande eficiência nas enzimas como β-galactosidases [68, 72] e outras [40,73].

5.5.2 Padronização da desativação da enzima. Extrato Lactozym 3000

As adversidades na condução do plano para se obter informações sobre a mediação metálica da atividade catalítica da β-galactosidase de *T. reesei* FTKO provavelmente se referem ao fato do agregado que se formou interferir na eficiência da remoção do íon metálico. Foi necessário, então, estabelecer uma metodologia padronizada de desativação de β-galactosidase. Na padronização desta metodologia empregou-se a β-galactosidase de *Kluyveromyces lactis* e EDTA, como quelante, nas soluções tampão de fosfato de sódio e Tris/HCl. Esta metodologia forneceu insumos para se avaliar as causas dos obstáculos enfrentados com a enzima da linhagem estudada de *T. reesei*.

5.5.2.1 Caracterização de atividade e purificação do extrato Lactozym 3000

Para padronizar a técnica de desativação da enzima empregou-se o extrato enzimático comercial de *Kluyveromyces lactis*, Lactozym 3000. O extrato teve sua atividade estabelecida e, em seguida, foi purificado por cromatografia de filtração em gel, Sephacryl S-200HR (tampão fosfato de sódio 0,010 mol.L^{-1}, 0,02% Triton X 100, EDTA 10^{-4} mol.L^{-1} e $MgCl_2$ 10^{-3} mol.L^{-1}, 4º C, pH 7,5). Os resultados estão apresentados na tabela 5.8. O cromatograma está ilustrado na figura 5.30. As frações de 20 a 26 apresentaram atividade de β-galactosidase. Recolhidas e reunidas tiveram o teor de proteína e a atividade quantificada e os resultados de purificação estão apresentados na tabela 5.8. O tratamento de purificação elevou em três vezes a atividade específica do extrato, com um rendimento de 13 %.

Tabela 5.8 purificação do extrato comercial Lactozym 3000

Etapa	Teor protéico (mg.mL^{-1})	UA[a] (μmol.min^{-1}.mL^{-1})	Uesp [a] (μmol.min^{-1}. mg^{-1})	Purificação	Rendimento (%)
extrato bruto	1,14 ± 0,13	9,44 ± 1,10	6,70 ± 0,78	1,0	100
S-300 HR[c]	6,40. 10^{-2} ± 0,54	1,24 ± 0,81	19,38 ± 3,41	2,89	13,2

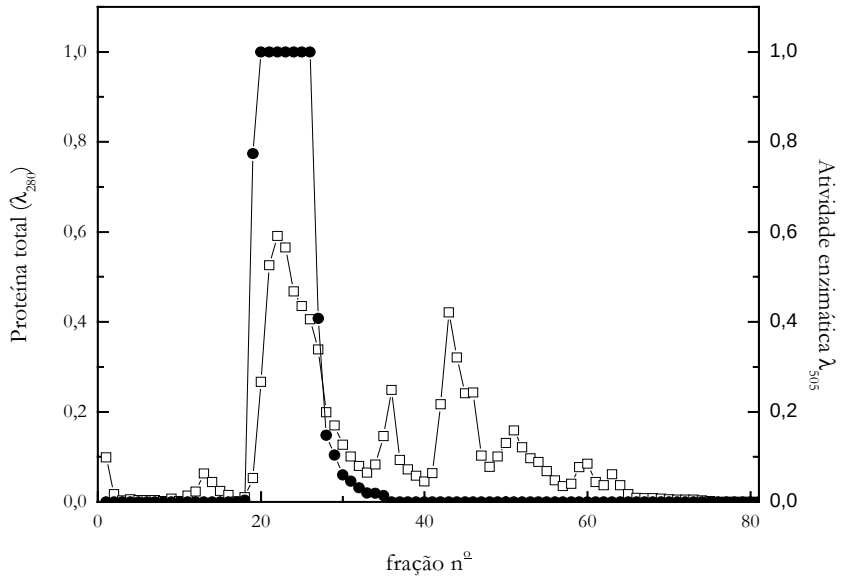


Figura 5.30. Cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S 200 HR) do extrato comercial Lactozym 3000, fase móvel fosfato de sódio 0,010 mol.L^{-1}, 0,02% Triton X 100, EDTA 10^{-4} mol.L^{-1} e $MgCl_2$ 10^{-3} mol.L^{-1} (4º C, pH 7,5), –●– atividade enzimática, –□– proteína total.

5.5.2.2 Desativação da enzima com EDTA

No eluato obtido da filtração em gel do extrato Lactozym 3000 foi testada a desativação da enzima. As frações ativas reunidas foram incubadas na presença de concentrações crescentes de EDTA, em dois sistemas tamponantes: tampão Tris/HCl (0,010mol.L^{-1}, pH 7,0) e tampão fosfato (0,010mol.L^{-1}, pH 7,0). A atividade residual foi analisada em função do tempo. Os efeitos do sistema tamponante e das concentrações de EDTA sobre desativação da β-galactosidase de *Kluyveromyces lactis* são apresentados nas figuras 5.31 e 5.32.

Em ambos os tratamentos as curvas declinam rapidamente e em menos de cinco minutos a atividade atinge taxas de 50% de atividade. A queda da atividade enzimática mostra-se tempo dependente. Com pequena diferença entre os sistemas utilizados, a desativação em tampão Tris/HCl mostra-se eficiente para as concentrações mais baixas de quelantes, razão pela qual este sistema foi adotado nos experimentos seguintes.

Para os tratamentos com 50 mmol.L^{-1} de EDTA um efeito de leve recuperação da atividade foi notado. A reativação ocorria entre quinze e vinte minutos, e isso foi válido para os dois tampões utilizados. Este efeito provavelmente é devido aos mecanismos do equilíbrio da competição pelo metal. No decorrer do experimento a desativação era logo compensada e ocorria até seu máximo Para todas as outras concentrações de quelantes, nos dois sistemas, a desativação ocorre de acordo com o tempo e com a concentração de EDTA. Em todos os tratamentos os máximos de desativação se aproximaram de 30 minutos.

Com esses dados obtínhamos um tratamento de desativação que, para se estabelecer como metodologia, necessitava de testes de reativação da enzima, o que ocorreu após as determinações do tampão Tris/HCl e da concentração de quelante no ensaio.

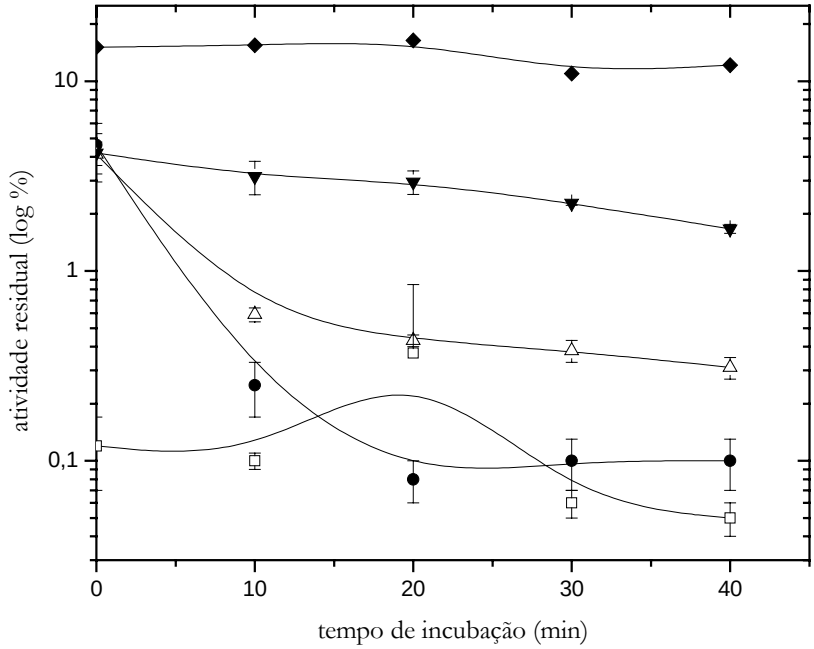


Figura 5.31. Desativação tempo dependente das frações ativas da filtração em gel (Sephacryl S200 HR) do extrato Lactozym 3000, parcialmente purificado, em tampão fosfato de sódio. EDTA −□− 5,0. 10^{-2} mol.L^{-1}, ●− 10^{-2} mol.L^{-1},−8− 10^{-3} mol.L^{-1},−B− 10^{-4} mol.L^{-1} e −Λ− controle.

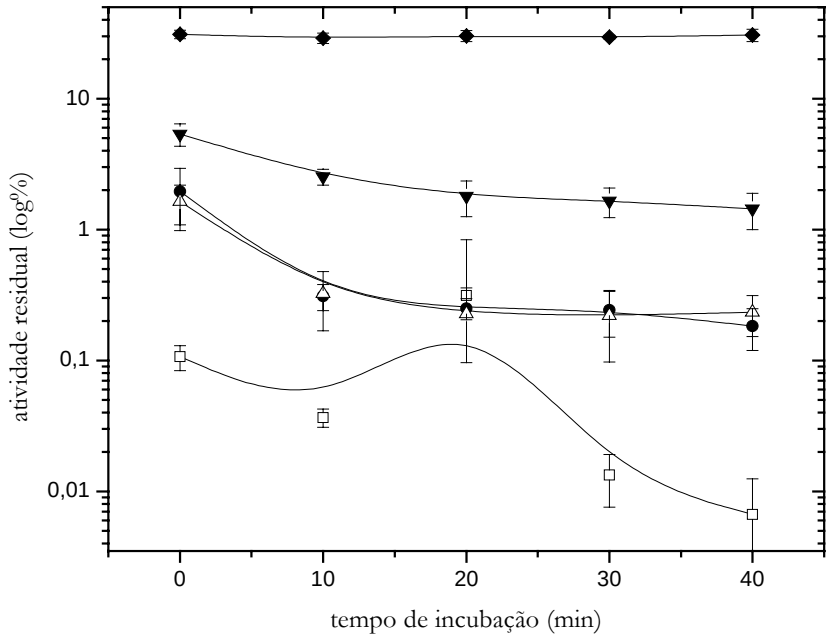


Figura 5.32. Desativação tempo dependente das frações ativas da filtração em gel (Sephacryl S200 HR) do extrato Lactozym 3000 em tampão Tris/HCl.(100 mmol.L^{-1} EDTA −□− 5,0 10^{-2} mol.L^{-1}, -●- 10^{-2} mol.L^{-1},−8− 10^{-3} mol.L^{-1},−B− 10^{-4} mol.L^{-1} e −Λ− controle.

5.5.2.3 Titulação da enzima com metais divalentes

A verificação da reversibilidade da desativação pelo quelante é necessária para se confirmar o efeito de remoção do íon de seu sítio de coordenação. Selecionadas as condições de desativação (tampão Tris/HCl 0,l0 mmol.L^{-1}, concentração de EDTA de 10^{-3} mol.L^{-1} e uma hora sob agitação refrigerada) o ensaio se iniciava após a medida da atividade residual deste meio.

Nas figuras 5.33, 5.34, 5.35, 5.36, 5.37 5.38 e estão apresentados os resultados obtidos nestes ensaios para a reativação da β-galactosidase parcialmente purificada do extrato comercial Lactozym 3000 por Mg^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} e Eu^{3+} respectivamente. As concentrações de metal foram ajustadas em 10^{-5} 10^{-4}, 10^{-3} , 10^{-2} e 10^{-1} mol.L^{-1} em tampão Tris/HCl (0,10 mol.L^{-1}, pH 7,0, EDTA 10^{-3} mol.L^{-1}).

A enzima reverteu em 10 minutos em 50% sua atividade na presença de Mg^{2+}em concentrações superiores a 10mmol.L^{-1} (figura 5.33). Este resultado antecipa a eficiência do método por indicar a associação do íon magnésio no controle da atividade da enzima. Essa reativação se mostra dependente da concentração do metal. Em todas as concentrações a atividade foi recuperada e em concentrações do metal inferior ao quelante no meio a reativação permanece abaixo de 30%. O resultado é semelhante a outros sobre a ativação de β-galactosidases de diversas fontes na literatura[30, 74, 68].

A figura 5.34 ilustra o papel do Mn^{2+}. O efeito de ativação é registrado nas concentrações intermediárias do metal testado. Muito embora na mais alta concentração experimental do metal a enzima não sofra alteração significativa, esta apresenta uma pronta reabilitação de sua atividade na presença de manganês, nas concentrações 10,0 mmol.L^{-1} e 0,10 mmol.L^{-1}. A reativação efetivamente magnifica em até 300% quando se atinge a concentração adequada de metal. Baixas concentrações, menores que o agente quelante, não surtem efeito na reativação, pois estão submetidas à competição pelo metal entre o quelante e o sítio da enzima.

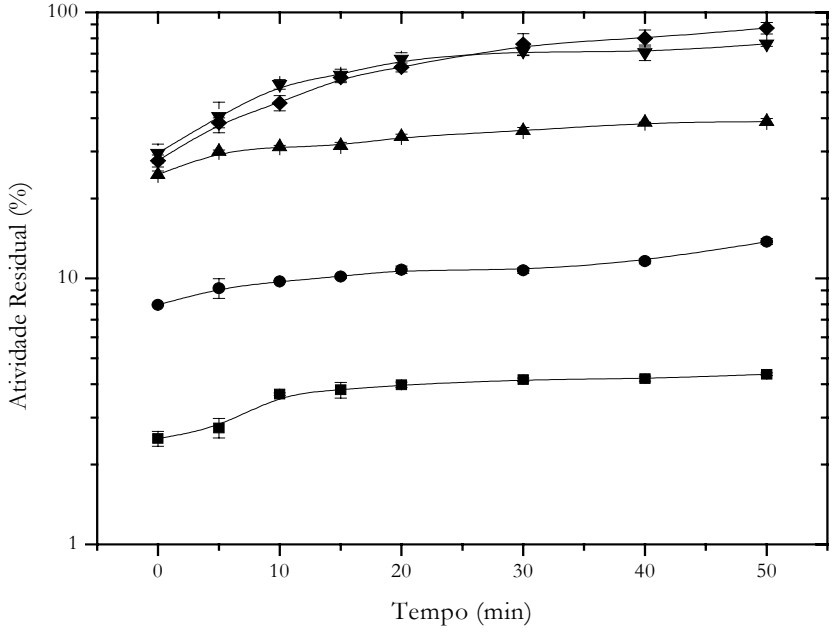


Figura 5.33. Reativação de β-galactosidase (Lactozym 3000) por Mg^{2+} em tampão Tris/HCl (0,100 mol.L^{-1}, pH 7,0, EDTA 10^{-2} mol.L^{-1}). [$MgCl_2$]:−!−10^{-5} mol.L^{-1}, −,−10^{-4} mol.L^{-1},−7− 10^{-3} mol.L^{-1}, − B− 10^{-2} mol.L^{-1} e −Λ−. 10^{-1} mol.L^{-1}.

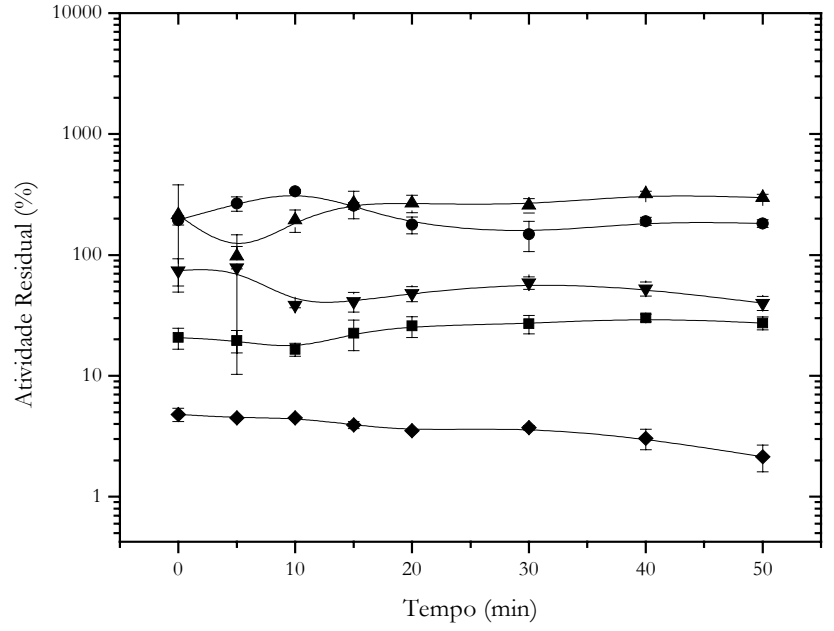


Figura 5.34. Reativação de β-galactosidase (Lactozym 3000) por Mn^{2+} em tampão Tris/HCl (0,100 mol.L^{-1}, pH 7,0, EDTA 10^{-2} mol.L^{-1}). [$MnCl_2$]:−!−10^{-5} mol.L^{-1}, −,−10^{-4} mol.L^{-1},−7− 10^{-3} mol.L^{-1}, − B− 10^{-2} mol.L^{-1}, −Λ−. 10^{-1} mol.L^{-1}.

O resultado com o manganês permite afirmar que o metal foi eficiente na reativação da enzima, ainda que o meio não tenha oferecido condições para uma plena reativação da hidrólise enzimática do *o*-NPG. O efeito do manganês sobre a β-galactosidase Lactozym 3000 é consistente com os resultados obtidos na ativação da enzima extraída em outras fontes [30, 68].

A figura 5.35 remete ao efeito de Co^{2+} sobre a apoenzima. As observações destacadas nos experimentos com manganês são retomadas para esse íon com as devidas particularidades. Novamente o efeito ativador é obtido com o metal e este parece ser responsável pela restituição da atividade β-galactolítica. As mínimas concentrações experimentais do cobalto não são suficientes para a reativação da enzima e as altas concentrações surtem um efeito imediato no restabelecimento da atividade. Para o cobalto, valendo-se a mesma linha de raciocínio é possível inferir um efeito ativador.

Após dez minutos de tratamento um outro efeito é notado, na atividade enzimática. Atinge-se um patamar de reativação ou subitamente a enzima perde grande parte da atividade até se tornar virtualmente inativa. A situação se explica pelo tratamento que a enzima sofre para atingir este estágio do experimento. Na cromatografia, por exemplo, o tampão utilizado como fase móvel pode ser responsável pelo enriquecimento de fosfatos que eventualmente ocasionam a formação de compostos insolúveis na respectiva faixa de pH.

Assim, se por um lado as concentrações intermediárias mostram o efeito ativador do cobalto, a indisponibilidade do metal pela precipitação de seus fosfatos, nas concentrações mais altas, não permite a reversão da desativação. O íon analisado neste ponto se torna rapidamente indisponível, mas, no entanto, antes de precipitar promove a reativação da enzima.

O papel de ativação do níquel sobre a atividade é possível ser observado na figura 5.36. O efeito da concentração do íon reativa a enzima na seguinte ordem: 10^{-5} mol.L^{-1} > 10^{-3} mol.L^{-1} ≈

10^{-4} mol.L^{-1}. Para 10^{-2} mol.L^{-1} e 10^{-1} mol.L^{-1} ocorre a precipitação dos respectivos fosfatos e, por conseqüência, o meio se mostra desfavorável para o teste com o metal.

Com efeito, à medida que a massa atômica do íon cresce nos testes, a reativação da enzima fica cada vez mais comprometida. Isso pode ser notado nas figuras 5.37 e 5.38 que registram o efeito de zinco e európio respectivamente nos testes de reativação. Nestes dois testes, cada um com sua particularidade, podem ser notados os mesmos efeitos de desativação da enzima à medida que a concentração do metal cresce.

Estes resultados devem ser interpretados com a reserva de que não houve plenas condições nos ensaios. Entretanto, foi possível definir a desativação e a reativação para a β-galactosidase de *Kluyveromyces lactis* presente no extrato Lactozym 3000. Os resultados também indicam a necessidade de controle do ambiente do teste. Assim sendo, ainda que para desativação da enzima os tampões testados apresentaram eficiências similares, a desativação com Tris/HCl é mais apropriada para a etapa seguinte do experimento. Isso reforça também a necessidade de se estudar outros sistemas tamponantes e mesmo outros agentes quelantes para uma definição mais adequada das condições experimentais.

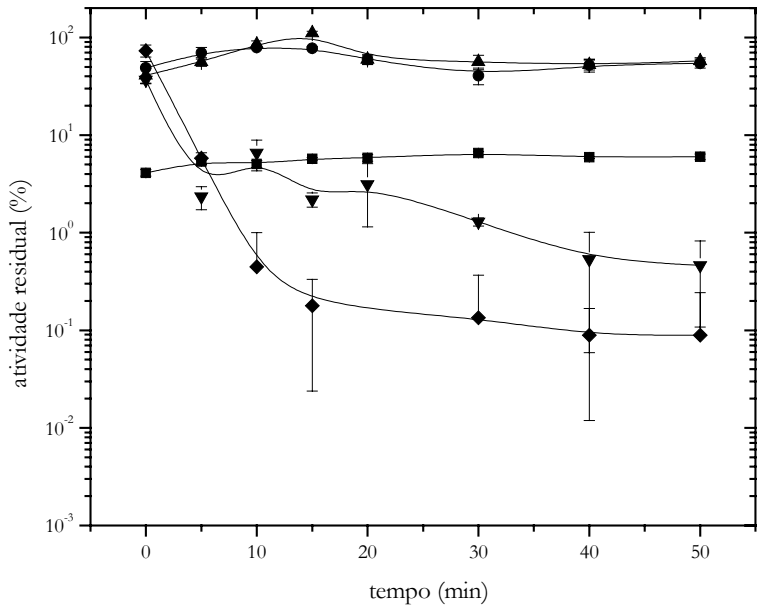


Figura 5.35. Reativação de β-galactosidase (Lactozym 3000) por Co^{2+} em tampão Tris/HCl (0,100 mol.L^{-1}, pH 7,0, EDTA 10^{-2} mol.L^{-1}). [$CoCl_2$]:−!−10^{-5} mol.L^{-1}, −,−10^{-4} mol.L^{-1},−7− 10^{-3} mol.L^{-1}, − B− 10^{-2} mol.L^{-1} e −Λ−. 10^{-1} mol.L^{-1}.

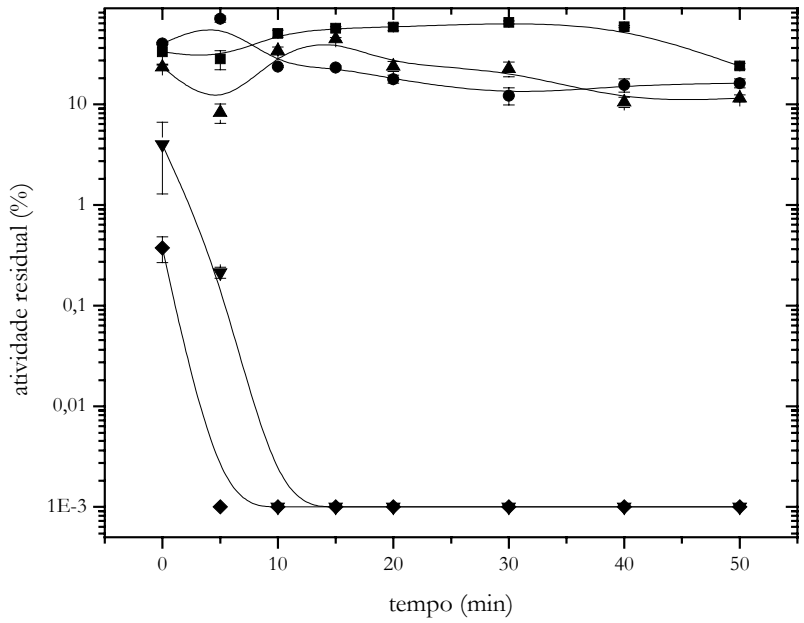


Figura 5.36. Efeito do Ni^{2+} sobre a atividade de β-galactosidase (Lactozym 3000) em tampão Tris/HCl (0,100 mol.L^{-1}, pH 7,0, EDTA 10^{-2} mol.L^{-1}). [$NiCl_2$]−!−10^{-5} mol.L^{-1}, −,−10^{-4} mol.L^{-1},−7− 10^{-3} mol.L^{-1}, − B− 10^{-2} mol.L^{-1} e −Λ−. 10^{-1} mol.L^{-1}.

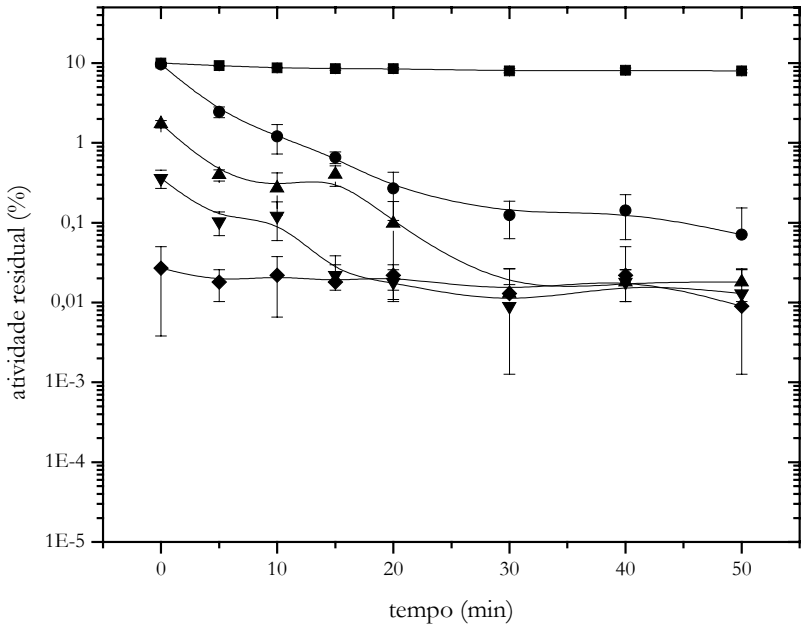


Figura 5.37. Reativação de β-galactosidase (Lactozym 3000) por Zn^{2+} em tampão Tris/HCl (0,100 mol.L^{-1}, pH 7,0, EDTA 10^{-2} mol.L^{-1}). [$ZnCl_2$]:−!−10^{-5} mol.L^{-1}, −,−10^{-4} mol.L^{-1},−7− 10^{-3} mol.L^{-1}, − B− 10^{-2} mol.L^{-1} e −Λ−. 10^{-1} mol.L^{-1}.

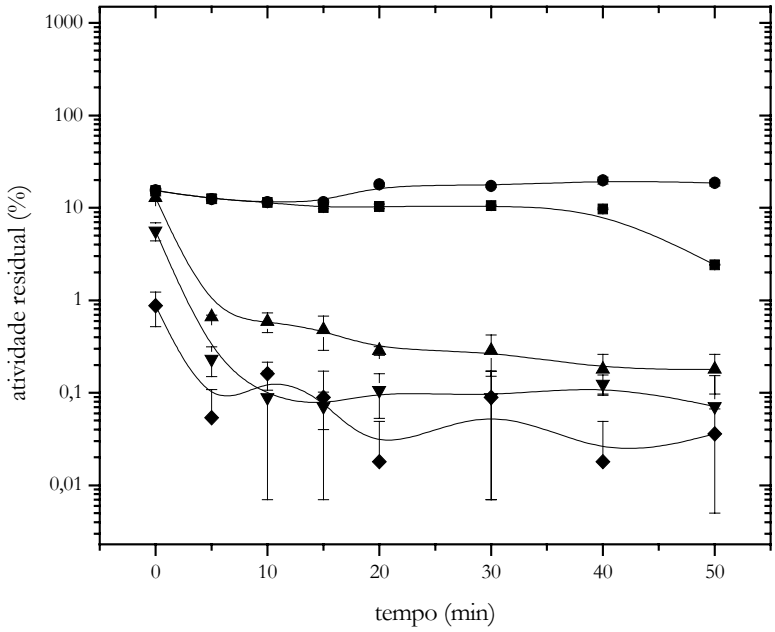


Figura 5.38. Reativação de β-galactosidase (Lactozym 3000) por Európio em tampão Tris/HCl (0,100 mol.L^{-1}, pH 7,0, EDTA 10^{-2} mol.L^{-1}). [$EuCl_3$]−!−10^{-5} mol.L^{-1}, −,−10^{-4} mol.L^{-1},−7− 10^{-3} mol.L^{-1}, − B− 10^{-2} mol.L^{-1} e −Λ−. 10^{-1} mol.L^{-1}.

5.5.3 Titulação de BGT I com EDTA

Determinadas as condições para um protocolo de desativação da β-galactosidase tentou-se, então, a remoção do metal da enzima que representava o material de estudo, ou seja, a β-galactosidase de *T. reesei* FTKO. As figuras 5.39 e 5.40 mostram os resultados para os ensaios de desativação da BGT I em tampão fosfato e em tampão Tris/HCl, respectivamente. Para ambos os casos, a desativação não ocorre em qualquer concentração do quelante. Com isso tínhamos à nossa disposição uma consideração-chave para a condução do projeto: a enzima estudada não se mostrava suscetível aos testes empregados. Não só pelas prováveis ineficiências destes métodos como também pela própria característica da amostra. Sobre essa característica não seria menos correto afirmar que o agregado que impossibilitou o isolamento da enzima à homogeneidade

também pode bloquear o acesso ao metal, tornando a enzima resistente aos tratamentos aos quais foi submetida ao longo do trabalho.

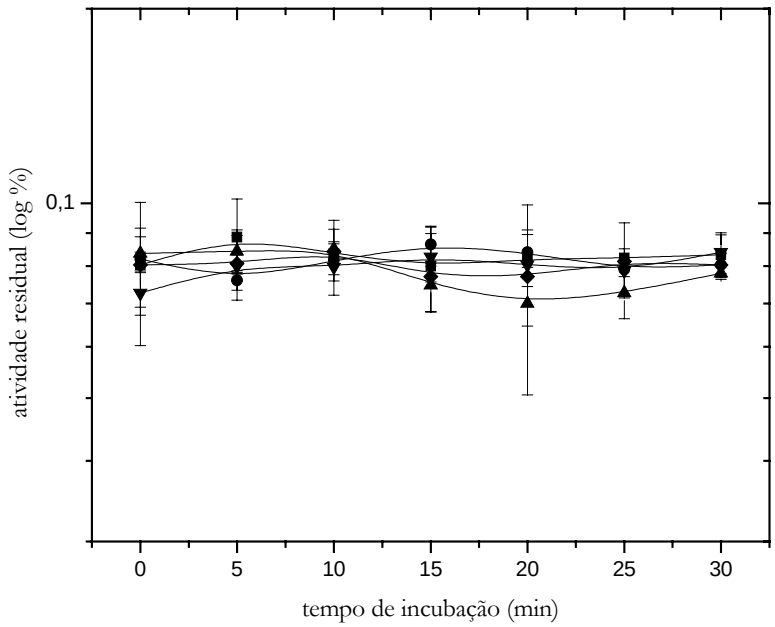


Figura 5.39. Teste de desativação de β-galactosidase de *Trichoderma reesei* FTKO, BGT I, (eluída de S Sepharose) em tampão fosfato 100 mmol.L^{-1}. EDTA −■ − 5,0. 10^{-2} mol.L^{-1}, ●− 10^{-2} mol.L^{-1},−7− 10^{-3} mol.L^{-1},−B− 10^{-4} mol.L^{-1} e −Λ− controle.

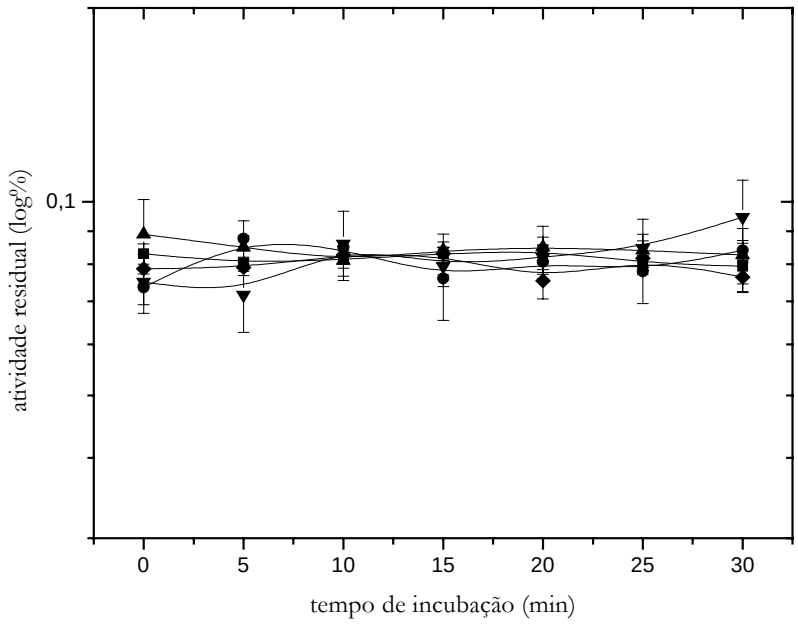


Figura 5.40. Teste de desativação de β–galactosidase de *Trichoderma reesei* FTKO, BGT I, (eluída de S Sepharose) em tampão Tris/HCl 100 mmol.L^{-1}. EDTA −■− 5,0. 10^{-2} mol.L^{-1}, −●− 10^{-2} mol.L^{-1},−7− 10^{-3} mol.L^{-1},−B− 10^{-4} mol.L^{-1} e −Λ− controle.

5.5.4 Eficiência de imobilização em alginato das isozimas

Com o propósito de avaliar o emprego das enzimas BGT I e BGT II no processamento de produtos lácteos as enzimas foram imobilizada, sendo este resultado particularmente interessante ao laboratório de enzimologia de alimentos ao qual o trabalho esteve associado durante toda sua execução[11]. Durante a imobilização alguns dos tratamentos aplicados podem comprometer a eficiência como a perda da enzima ou devido ao bloqueio do acesso do substrato ao sítio catalítico. As atividades totais da fração contendo as isozimas BGT I e BGT-II e das mesmas imobilizadas são apresentadas na tabela 5.9.

Tabela 5.9 eficiência da imobilização das isoforma de β-galactosidases purificadas de *T. reesei* FTKO (BGT I e BGT II)

Enzima	Livre	Imobilizada	Eficiência (%)
	Atividades Totais (U.mL^{-1})	Atividades Totais (U.mL^{-1})	
BGT I	5,20. 10^{-1} ± 0,021	4,79. 10^{-1} ± 0,025	92,1
BGT II	9,05. 10^{-2}± 0,01	7,40. 10^{-2}± 0,01	81,80

A análise da tabela mostra que a eficiência da imobilização foi de aproximadamente 82%. Uma segunda razão foi a de procurar uma via de desativação das enzimas com o tratamento com EDTA das enzimas já imobilizadas, mas o resultado não foi satisfatório e não é apresentado aqui.

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O fungo *T. reesei* mostrou ser produtor da enzima β-galactosidase e as instâncias do isolamento da enzima limitou o resultado cromatográfico. Ainda que não tenha sido atingida a homogeneidade na purificação duas isoformas de β-galactosidase de *T. reesei* foram isoladas. A caracterização físico-química de ambas as enzimas revelou-as termofílicas, com um ótimo de temperatura de 65ºC e, também, termotolerantes, pois mantém boa atividade após 30 minutos de tratamento térmico. As medidas cinéticas, usando substratos naturais e artificiais, foram usadas para individualizar as enzimas. Uma outra evidência da produção de isozimas diferentes foi fornecida pelas eletroforeses em gel de atividade cujas bandas distinguem-se no extrato bruto e nos isolados. As isoformas foram identificadas como BGT I e BGT II. De modo semelhante às medidas de dependência do pH das atividades das isoformas foram usadas na distinção das isoformas. A BGT I se mostrou mais acídica (pH 4,5) e mais tolerante às variações do pH que a BGT II. Esta segunda enzima tem um ótimo de pH menos ácido (pH 6,5) e tolera menor variação de pH.

Os procedimentos testados para a obtenção da apoenzima foram ineficientes, o que exigiu a padronização de um método de desativação da metaloenzima. A alternativa escolhida foi a de submeter a enzima à competição com EDTA pelo metal. Para isso foi utilizada a β-galactosidase comercial Lactozym 3000 de *Kluyveromyces lactis*. A enzima teve seu metal removido como sugere a inibição dependente do tempo e da concentração de EDTA. A enzima desativada pode ser completamente restaurada na presença de Mg^{2+} e Mn^{2+}. Foi observada, também uma menor reativação com Co^{2+} e Ni^{2+}. Os íons metálicos Zn^{2+} e Eu^{3+} não reativaram a enzima nas condições utilizadas.

Estes resultados devem ser avaliados com cuidado, pois as condições experimentais, o pH e os íons dissolvidos favoreceram a precipitação dos metais. A metodologia se mostra exigente

com relação às condições experimentais. Estas condições envolvem as interações químicas dos metais e da enzima com os sistemas tamponantes de trabalho. Somam-se a estas observações que a escolha inadequada do solvente compromete as propriedades do metal, por exemplo, a água é um supressor de fluorescência. Os resultados revelam a atividade de β-galactosidase do extrato Lactozym 3000 ser dependente de metal, atestam o método de desativação pretendido e estabelecem a metodologia para o estudo do centro metálico.

Um dos possíveis papéis do centro metálico da β-galactosidase se refere a indução do sitio de catálise a substituição do magnésio ligado pelo manganês, que tem uma constante de dissociação menor, é uma indicação desta indução. A definição destes atributos como manifestado pela β-galactosidase implica a importância da ligação metálica para a função desta hidrolase. A β-galactosidase de *Kluyveromyces lactis* se comporta como enzima definida pelos mecanismos de coordenação vicinal dos átomos de oxigênio aos centros metálicos de catálise.

A investigação do centro metálico da isoforma BGT I foi comprometida pelas condições de isolamento a qual foi submetida. A pureza homogênea é condição fundamental para a definição de dados como o coeficiente de extinção, a massa relativa da enzima e as propriedades termodinâmicas e constantes da interação metal/enzima. Os testes de inibição não foram conduzidos por não ter sido atingida a pureza da enzima. Às dificuldades de se obter enzimas puras acrescentam-se as exigências quantitativas dos métodos espectroscópicos propostos para a avaliação estrutural deste centro metálico. O desdobramento quadrupolar do magnésio oferece picos muito discretos no espectro de ressonância magnética, por exemplo.

A integração de biomateriais, como enzimas, anticorpos, ou mesmo ácidos nucléicos, em suportes eletrônicos é uma realidade que constitui o *corpus* da biotecnologia de microsistemas. Nesta linha de pesquisa os biomateriais e elementos eletrônicos são integrados. Um eletrodo protéico, a base dos dispositivos bioeletrônicos, é produzido quando enzimas são integradas ao eletrodo-suporte em contatos elétricos. Sensores fotoativados atuam como sistemas optobioeletrônicos e realizam transduções fotônicas e são usados no registro e manipulação de

informações eletrônicas agindo como memórias lógicas, amplificadores biomolecular ou portas lógicas luz induzidas Os biomateriais podem atuar no controle das propriedades de transdutores por bioreconhecimento razão pela qual apresentam sensibilidade e especificidade.

Microeletrodos são testados em matrizes de imobilização de enzimas formando microcâmaras de reação contendo hidrogéis bioativos de alta precisão. Métodos de imobilização de enzimas em eletrodos *via* ligação covalente, ou *via* complexos supramoleculares, permitem construções de circuitos de ampla aplicação na nanotecnologia. Esquemas alternativos podem ser obtidos por ligações não covalentes e conferem a organização na superfície destes sensores. Alguns eletrodos podem ser construídos usando a reconstituição de apoenzimas em suas superfícies funcionalizadas. Estes aparatos podem ser inspecionados com técnicas histoquímica.

Era a proposição deste trabalho incluir estudos estruturais para a construção de modelos da mediação metálica na catálise enzimática. As contingências encontradas na purificação e na desativação da β-galactosidase de T. ressei impediram estes estudos, contudo foi adicionalmente foi testada a imobilização das enzimas em alginato de sódio. Outras técnicas de imobilização estão sendo investigadas pelo laboratório de enzimologia de alimentos tendo em vista os muitos aspectos de inibição e ativação desempenhados pelos metais durante a imobilização de enzimas.

7 REFERÊNCIAS

1 MARTINEZ-BILBAO, M.; HUBER, R. E. Substitutions for Gly-794 show that binding interactions are important determinants of the catalytic action of beta-galactosidase (*Escherichia coli*). **Biochem. Cell. Biol.**, v. 72, n. 7/8, p. 313-19, 1994.

2 JACOBSON, R. H.; ZHANG, X. J.; DUBOSE, R. F.; MATTHEWS, B. W. Three-dimensional structure of β -galactosidase from *E. coli*. **Nature**, v. 369, n. 6483, p. 761-6, 1994.

3 GUTSHALL, K.; WANG, K.; BRENCHLEY, E. A novel *Arthrobacter* β-galactosidase with homology to eucaryotic β-galactosidases. **J. Bacteriol.**, v. 179, n. 9, p. 3064-7, 1997.

4 BREUNIG, K. D.; DAHLEMS, U.; DAS, S.; HOLLENBERG, C. P. Analysis of a eukaryotic beta-galactosidase gene: the N-terminal end of the yeast *Kluyveromyces lactis* protein shows homology to the *Escherichia coli* lacZ gene product. **Nucleic Acids Res.**, v. 12, n. 5, p. 2327-41, 1984.

5 RICHARD, J. P.; HUBER, R. E.; HEO, C.; AMYES, T. L.; LIN, S. Structure-reactivity relationships for beta-galactosidase (*Escherichia coli*, lac Z). 4. Mechanism for reaction of nucleophiles with the galactoyl-enzime intermediates of E461G and E461Q β-galactosidase. **Biochemistry**, v. 35, n. 38, p. 12387-401, 1996.

6 LEGLER, G.; HERRCHEN, M. Active site-directed inhibition of galactosidases by conduritol C epoxides (1,2-anhydro-epi- and neo-inositol). **FEBS Lett.**, v. 135, n. 1, p. 139-44, 1981.

7 PIZAURO, J. M.; DEMENIS, M. A.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F. A. Kinetic characterization of a membrane-specific ATPase from rat osseous plate and its possible significance on endochodral ossification. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1368, n. 1, p. 108-14, 1998.

8 HUBER, R. E.; ROTH, N. J.; BAHL, H. Quaternary structure, Mg^{2+} interactions, and some kinetic properties of the beta-galactosidase from *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1. **J. Protein. Chem.**, v. 15, n. 7, p. 621-9, 1996.

9 NICHTL, A.; BUCHNER, J.; JAENICKE, R.; RUDOLPH, R.; SCHEIBEL, T. Folding and association of beta-Galactosidase. **J. Mol. Biol.**, v. 282, n. 5, p. 1083-91, 1998.

10 HOOD, J. M.; FOWLER, A. V.; ZABIN, I. On the evolution of β-galactosidase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 75, n. 1, p. 113-6, 1978.

11 TREVISAN, H. C.; BERGAMO, E. P.; CONTIEIRO, J.; MONTI, R. β-galactosidase immobilization on controlled pore silica. **Braz. J. Chem. Eng.**, v. 14, n. 4, p. 315- 20, 1997.

12 CAVAILLE-LEFEBVRE, D.; COMBES, D. Irreversible high pressure inactivation of β-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: comparison with thermal inactivation. **J. Biotech.**, v. 61, n. 2, p. 85-93, 1998.

13 BADER, D. E.; RING, M.; HUBER, R. E. Site-directed mutagenic replacement of glu-461 with gln in β-galactosidase (*E. coli*): evidence that glu-461 is important for activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 153, n. 1, p. 301-6, 1988.

14 SINNOTT, M. L.; WITHERS, S. G. The necessity of magnesium cation for acid assistance aglycone departure in catalysis by *Escherichia coli* (lacZ) β-galactosidase**. Biochem. J.**, v. 175, n. 2, p. 539-46, 1978.

15 RING, M.; BADER, D. E.; HUBER, R. E. Site-directed mutagenesis of beta-galactosidase (*E. coli*) reveals that tyr-503 is essential for activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 152, n. 3, p. 1050-5, 1988.

16 GEBLER, J. C.; AEBERSOLD, R.; WITHERS, S. G. Glu-537, not Glu-461, is the nucleophile in the active site of (lac Z) β-galactosidase from *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 16, p. 11126-30, 1992.

17 ROTH, N. J.; HUBER, R. E. The β-galactosidase (*Escherichia coli*) reaction is partly facilitated by interactions of His-540 with the C6 hydroxyl of galactose. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 24, p. 14296-311, 1996.

18 ROTH, N. J.; HUBER, R. E. Site directed substitutions suggest that His-418 of beta-galactosidase (*E. coli*) is a ligand to Mg2+. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 201, n. 2, p. 866-70, 1994.

19 VIRATELLE, O. M.; YON, J. M. Comparison of the β-galactosidase conformations induced by D-galactal and by magnesium ions. **Biochemistry**, v. 19, n. 18, p. 41-3, 1980.

20 HUBER, R. E.; PARFETT, C.; WOULFE-FLANAGAN, H.; THOMPSON, D. J. Interaction of divalent cations with beta-galactosidase (*Escherichia coli*). **Biochemistry**, v. 18, n. 19, p. 4090-5, 1979.

21 HARADA, M.; INOHARA, M.; NAKAO, M.; NAKAYAMA, T.; KAKUDO, A.; SHIBANO, Y.; AMACHI, T. Divalent metal ion requirements of a thermostable multimetal

beta-galactosidase from *Saccharopolyspora rectivirgula*. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 35, p. 22021-6, 1994.

22 KANESHIRO, C. M.; ENNS, C. A.; HAHN, M. G.; PETERSON, J. S.; REITHEL, F. J. Evidence for an active dimer of *Escherichia coli* β-galactosidase. **Biochem. J.**, v. 151, n. 2, p. 433-4, 1975.

23 HOYOUX, A.; JENNES, I.; DUBOIS, P.; GENICOT, S.; DUBAIL, F.; FRANCOIS, J. M.; BAISE, E.; FELLER, G.; GERDAY, C. Cold-adapted β-galactosidase from the Antarctic psychrophile *Pseudoalteromonas haloplanktis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n. 4, p. 1529-35, 2001.

24 LI, S. C.; HAN, J. W.; CHEN, K. C.; CHEN, C. S Purification and characterization of isoforms of beta-galactosidases in mung bean seedlings. **Phytochemistry**, v. 57, n. 3, p. 349-59 2001.

25 MOLLER, P. L.; JORGENSEN, F.; HANSEN, O. C.; MADSEN, S. M.; STOUGAARD, P. Intra- and extracellular β-galactosidases from *Bifidobacterium bifidum* and *B. infantis*: molecular cloning, heterologous expression, and comparative characterization. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n. 5, p. 2276-83, 2001.

26 VIAN, A.; CARRASCOSA, A. V.; GARCIA, J. L.; CORTES, E. Structure of the β-galactosidase gene from *Thermus sp*. strain T2: expression in *Escherichia coli* and purification in a single step of an active fusion protein. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 6, p. 2187-91, 1998.

27 CLEMMITT, R. H.; CHASE, H. A. Immobilised metal affinity chromatography of beta-galactosidase from unclarified *Escherichia coli* homogenates using expanded bed adsorption. **J. Chromatogr. A.**, v. 874, n. 1, p. 27-43, 2000.

28 NAKAO, M.; HARADA, M.; KODAMA, Y.; NAKAYAMA, T.; SHIBANO, Y.; AMACHI, T. Purification and characterization of a thermostable β-galactosidase with high transgalactosilation activity from *Saccharopolyspora rectivirgula*. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 35, p. 22021-30, 1994.

29 MATEO, C.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; PESSELA, B. C.; VIAN, A.; CARRASCOSA, A. V.; GARCIA, J. L.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. Affinity chromatography of polyhistidine tagged enzymes. New dextran-coated immobilized metal ion affinity chromatography matrices for prevention of undesired multipoint adsorptions. **J. Chromatogr. A.**, v. 915, n. 1/2, p. 97-106, 2001.

30 MARTINEZ-BILBAO, M.; GAUNT, M. T.; HUBER, R. E. E461H β-galactosidase (*Escherichia coli*): altered divalent metal specificity and slow but reversible metal inactivation. **Biochemistry**, v. 34, n. 41, p. 13437-42, 1995.

31 DESCHAVANNE, P. J.; VIRATELLE, O. M.; YON, J. M. Functional properties of β-galactosidase from mutant strain 13 PO of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 75, n. 4, p. 1892-6, 1978.

32 STORY, S. V.; SHAH, C.; JENNEY JR., F. E.; ADAMS, M. W. Characterization of a novel zinc-containing, lysine-specific aminopeptidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. **J. Bacteriol.**, v. 187, n. 6, p. 2077-83, 2005.

33 GARRITY, J. D.; BENNETT, B.; CROWDER, M. W. Direct evidence that the reaction intermediate of metallo-β-lactamase L1 is metal bound. **Biochemistry**, v. 44, n. 3, p. 1078-87, 2005.

34 BERTHOMIEU, C.; HIENERWADEL, R. Vibrational spectroscopy to study the properties of redox-active tyrosines in photosystem II and other proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1707, n. 1, p. 51-66, 2005.

35 CUERO, R.; OUELLET, T. Metal ions modulate gene expression and accumulation of the mycotoxins aflatoxin and zearalenone. **J. Appl. Microbiol.**, v. 98, n. 3, p. 598-605, 2005.

36 ATHANASOPOULOS, V. I.; NIRANJAN, K.; RASTALL, R. A. The production, purification and characterization of two novel alpha-D-mannosidases from *Aspergillus phoenicis*. **Carbohydr. Res.**, v. 340, n. 4, p. 609-17, 2005.

37 COTTON, F. A.; WILKINSON, G. Bioinorganic chemistry. In : _____. **Advanced inorganic chemistry.** 5th ed. New York: John Wiley & Sons, 1988. cap. 30, p. 1335-76.

38 KALYANARAMAN, C.; BERNACKI, K.; JACOBSON, M. P. Virtual screening against highly charged active sites: identifying substrates of alpha-beta barrel enzymes. **Biochemistry**, v. 44, n. 6, p. 2059-71, 2005.

39 KUHNL, J.; BOBIK, T.; PROCTER, J. B.; BURMEISTER, C.; HOPPNER, J.; WILDE, I.; LUERSEN, K.; TORDA, A. E.; WALTER, R. D.; LIEBAU, E. Functional analysis of the methylmalonyl-CoA epimerase from *Caenorhabditis elegans*. **FEBS J.**, v. 272, n. 6, p. 1465-77, 2005.

40 LEONE, F. A.; CIANCAGLINI, P.; PIZAURO, J. M. Effect of calcium ions on rat osseous plate alkaline phosphatase activity. **J. Inorg. Biochem.**, v. 68, n. 2, p. 123-7, 1997.

41 WOGGON, W. D. Metalloporphyrines as active site analogues--lessons from enzymes and enzyme models. **Acc. Chem. Res.**, v. 38, n. 2, p. 127-36, 2005.

42 VARROT, A.; YIP, V. L.; LI, Y.; RAJAN, S. S.; YANG, X.; ANDERSON, W. F.; THOMPSON, J.; WITHERS, S. G.; DAVIES, G. J. NAD+ and metal-ion dependent hydrolysis by family 4 glycosidases: structural insight into specificity for phospho-β-D-glucosides. **J. Mol. Biol.**, v. 346, n. 2, p. 423-35, 2005.

43 DEGTYARENKO, K.; CONTRINO, S. COMe the ontology of bioinorganic proteins. **BMC Struct. Biol.**, v. 4, n. 3, 2004. Disponível em: < http://www.biomedcentral.com/1472-6807/4/3 >. Acesso em: 30 out. 2005.

44 JUERS, D. H.; JACOBSON, R. H.; WIGLEY, D.; ZHANG, X. J.; HUBER, R. E.; TRONRUD, D. E.; MATTHEWS, B. W. High resolution refinement of β-galactosidase in a new crystal form reveals multiple metal-binding sites and provides a structural basis for alpha-complementation. **Protein Sci.**, v. 9, n. 9, p. 1685-99, 2000.

45 DUNN, I. S.; JENNINGS, P. A. Mutant forms of beta-galactosidase with an altered requirement for magnesium ions. **Protein Eng.**, v. 5, n. 5, p. 441-6, 1992.

46 SINHA, A. M.; HALDAR, S.; CHATTERJEE, G. C. Studies on alkaline phosphatase, catalase and z-galactosidase in Vibrio el tor under normal and rifampicin resistant conditions. **Acta Microbiol. Pol.**, v. 31, n. 3/4, p. 271-8, 1982.

47 GANEVA, V.; GALUTZOV, B.; EYNARD, N.; TEISSIE, J. Electroinduced extraction of beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 56, n. 3/4, p. 411-3, 2001.

48 RAHIM, K. A.; LEE, B. H. Specificity, inhibitory studies, and oligosaccharide formation by β-galactosidase from psychrotrophic *Bacillus subtilis* KL88. **J. Dairy Sci.**, v. 74, n. 6, p. 1773-8, 1991.

49 LU, J. X. Magnesium chelation inactivates β-galactosidase in -20 degrees C storage. **Biotechniques,** v. 12, n. 2, p. 177-81, 1992.

50 HERRCHEN, M.; LEGLER, G. Identification of an essential carboxylate group at the active site of lacZ β-galactosidase from Escherichia coli. **Eur. J. Biochem.**, v. 138, n. 3, p. 527-31, 1984.

51 BRAUN, H.; LEGLER, G.; DESHUSSES, J.; SEMENZA, G. Stereospecific ring opening of conduritol-B-epoxide by an active site asparatate residue of sucrase-isomaltase. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 483, n. 1, p. 135-40, 1977.

52 WHITE, W. J. J.; SCHRAY, K. J.; LEGLER, G.; ALHADEFF, J. A.Active-site-directed inactivation of human liver alpha-L-fucosidase by conduritol C trans-epoxide. **Biochim. Biophys. Acta.,** v. 873, n. 2, p. 198-203, 1986.

53 McCARTER, J. D.; BURGOYNE, D. L.; MIAO, S.; ZHANG, S.; CALLAHAN, J. W.; WITHERS, S. G. Identification of Glu-268 as the catalytic nucleophile of human lysosomal β-galactosidase precursor by mass spectrometry. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 1, p. 396-400, 1997.

54 DEGTYARENKO, K. Bioinorganic motifs: towards functional classification of metalloproteins. **Bioinformatics**, v. 16, n. 10, p. 851-64, 2000.

55 MAHONEY, R. R.; NICKERSON, T. A.; WHITAKER, J. R. Selection of strain, growth condition and extraction procedures for optimum production of lactase from *Kluyveromyces fragilis*. **J. Diary Sci.**, v. 58, n. 11, p. 1620-6, 1975.

56 LEDERBERG, J. The beta-d-galactosidase of *Escherichia coli*, strain k-121. **Bacteriol.**, v. 60, n. 4, p. 381–392, 1950.

57 TRINDER, P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. **J. Clin. Pathol.**, v. 22, n. 2, p. 158-61, 1969.

58 TABAK, M.; NASCIMENTO, O. R.; SAY, J. C. Temperature-induced conformational changes in spin-labelled myoglobins: myoglobin of Aplysia brasiliana. **FEBS Lett.**, v. 140, n. 2, p. 241-4, 1982.

59 BENAIM, M. Montage simple dicellule d'electrodialyse. **Ann. Biol. Clin.**, v. 24, n. 7, p. 1005-12, 1966.

60 VILLELA, G. G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. **Técnicas e experimentos em Bioquímica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1961. p. 527-529.

61 DAVIS, B. J. Disc electrophoresis. Method and application to human serum proteins. **Ann. N. Y. Acad. Sci**, v. 28, n. 121, p. 404-27, 1964.

62 LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, 1970.

63 COUGHLIN, R. T.; TONSAGER, S.; MCGROARTY, E. J. Quantitation of metal cations bound to membranes and extracted lipopolysaccharide of *Escherichia coli*. **Biochemistry**, v. 22, n. 8, p. 2002-7, 1983.

64 JANEWAY, C. M.; XU, X.; MURPHY, J. E.; CHAIDAROGLOU, A.; KANTROWITZ, E. R. Magnesium in the active site of *Escherichia coli* alkaline phosphatase is important for both structural stabilization and catalysis. **Biochemistry**, v. 32, n. 6, p. 1601-9, 1993.

65 CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; HOURS, R. A.; VOGET, C. E.; MIGNONE, C. F. *Aspergillus kawachii* produces an acidic pectin releasing enzyme activity. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 88, n. 1, p. 48-52, 1999.

66 TANAKA, A.; HOSHINO, E. Secondary calcium-binding parameter of *Bacillus amyloliquefacien*s alpha-amylase obtained from inhibition kinetics. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 96, n. 3, p. 262-7, 2003.

67 KACHURIN, A. M.; GOLUBEV, A. M.; GEISOW, M. M.; VESELKINA, O. S.; ISAEVA-IVANOVA, L. S.; NEUSTROEV, K. N. Role of methionine in the active site of α–galactosidase from *Trichoderma reesei*. **Biochem. J.**, v. 308, n. 3, p. 955-64, 1995.

68 SINNOTT, M. L.; SMITH, P. J. Affinity labelling with a deaminatively generated carbonium ion. Kinetics and stoicheiometry of the alkylation of methionine-500 of the lacZ β-galactosidase of *Escherichia coli* by β-D-galactopyranosylmethyl-p-nitrophenyltriazene. **Biochem. J.**, v. 175, n. 2, p. 525-31, 1978.

69 PEDRIQUE, M.; CASTILLO, F. J. Regulation of β-D-galactosidase synthesis in *Candida Pseudotropicalis*. **Appl. Envir. Microb.**, v. 43, n. 2, p. 303-10, 1982.

70 ARMADA, L. J.; MACKEY, A. D.; GREGORY, J. F. Intestinal brush border membrane catalyzes hydrolysis of pyridoxine-5'-ß-D-glucoside and exhibits parallel developmental changes of hydrolytic activities toward pyridoxine-5'-β-D-glucoside and lactose in rats1. **J. Nutr.**, v. 132, n. 9, p. 2695-9, 2002.

71 ZHANG, W.; FAN, Y. L.; YAO, B. Overexpression of *Aspergillus candidus* lactase and analysis of enzymatic properties. **Wei Sheng Wu Xue Bao**, v. 45, n. 2, p. 247-52, 2005.

72 MOON, K.; YOAST, S.; PALOMBELLA, A. L.; MAINZER, S. E.; SCHMIDT, B. F. Two histidines are essential for the activity of the β-galactosidase from *Lactobacillus delbruckii* subsp. *bulgaricus*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 201, n. 3, p. 1167-87, 1994.

73 MARTINEZ-BILBAO, M.; GAUNT, M. T.; HUBER, R. E. E461H-β-galactosidase (*Escherichia coli*), p. altered divalent metal specificity and slow but reversible metal inactivation. **Biochemistry**, v. 34, n. 41, p. 13437-42, 1995.

74 MBUYI-KALALA, A.; SCHNEK, A. G.; LEONIS, J. Separation and characterization of four enzyme forms of β-galactosidase from *Saccharomyces lactis*. **Eur. J. Biochem.,** v. 178, n. 2, p. 437-43, 1988.

75 VAN LAERE, K. M. J.; ABEE, T.; SCHOLS, H. A.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A. G. J. Characterization of a novel β-galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083 active towards transgalactooligosaccharides. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 4, p. 1379-84, 2000.

76 KIEL, R. A.; TANZER, J. M.; WOODIEL, F. N. Identification, separation, and preliminary characterization of invertase and beta-galactosidase in *Actinomyces viscosus*. **Infect. Immun.**, v. 16, n. 1, p. 81-7, 1977.

77 LAU, H. K. Physicochemical characterization of human intestinal lactase. **Biochem. J.**, v. 241, n. 2, p. 567-72, 1987.

78 COUSINEAU, J.; GREEN, J. R. Isolation and characterization of the proximal and distal forms of lactase-phlorizin hydrolase from the small intestine of the suckling rat. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 615, n. 1, p. 147-57, 1980.

79 SKOVBJERG, H.; NOREN, O.; SJOSTROM, H.; DANIELSEN, E. M.; ENEVOLDSEN, B. S. Further characterization of intestinal lactase/phlorizin hydrolase. **Biochim. Biophys. Acta,** v. 707, n. 1, p. 89-97, 1982.

80 SURVE, S. S.; MAHONEY, R. R. Kinetic stabilization of *Kluyveromyces marxianus* β-galactosidase by histidine and other amino acids. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 20, n. 5, p. 55-65, 1994.

81 SAITO, T.; YOSHIDA, Y.; KAWASHIMA, K.; LIN, H. K.; MAEDA, S.; KOBAYASHI, T. Immobilization and characterization of a thermostable the β-galactosidase from thermophilic anaerobe on a porous support. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 40, n. 6, p. 618-21, 1994.

82 SHERIDAN, P. P.; BRENCHLEY, J. E. Characterization of a salt-tolerant family 42 β-galactosidase from a psycrophilic antartic *Planococcus* isolate. **Appl. Envirom. Microbiol.**, v. 66, n. 6, p. 2438-44, 2000.

83 HUBER, R. E.; GAUNT, M. T. Importance of hydroxyls at positions 3, 4, and 6 for binding to the "galactose" site of beta-galactosidase (*Escherichia coli*). **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 220, n. 1, p. 263-71, 1983.