



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Emily Colferai Bonfá

Purificação parcial e caracterização bioquímica de uma
isoforma de β -glicosidase do fungo termofílico *Myceliophthora*
thermophila M.7.7.

São José do Rio Preto
2016

Emily Colferai Bonfá

Purificação parcial e caracterização bioquímica de uma isoforma de β -glicosidase do fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* M.7.7.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez.

Co-orientadora: Profa. Dra. Eleni Gomes.

São José do Rio Preto
2016

Bonfá, Emily Colferai.

Purificação parcial e caracterização bioquímica de uma isoforma de β -glicosidase do fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* M.7.7 / Emily Colferai Bonfá. -- São José do Rio Preto, 2016
81 f. : il., tabs.

Orientador: Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez

Coorientador: Eleni Gomes

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Enzimas de fungos - Aplicações industriais.
3. Enzimas de fungos - Purificação. 4. Fungos termofílicos. 5. Celulase.
6. Cinética de enzimas. I. Bonilla-Rodriguez, Gustavo Orlando. II. Gomes, Eleni. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 663.15

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Emily Colferai Bonfá

Purificação parcial e caracterização bioquímica de uma isoforma de β -glicosidase do fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* M.7.7.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Profa. Dra. Patrícia Peres Polizelli
UNIRP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
29 de fevereiro de 2016

RESUMO

As celulasas podem ser utilizadas na bioconversão da fração de celulose de resíduos agro-industriais em açúcares fermentáveis, visando a obtenção de combustíveis renováveis e produtos químicos. As β -glicosidases são cruciais para a total sacarificação da celulose, mas na maioria dos casos elas são fortemente inibidas pelo seu produto, a glicose. Portanto, o conhecimento das cinéticas de hidrólise e as respostas dessa enzima frente a diferentes substratos e produtos pode definir a eficiência de hidrólise e do processo biotecnológico no qual poderia ser incorporada. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar a β -glicosidase de 50 kDa (BG50) produzida pelo fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* M.7.7 cultivado em estado sólido, em mistura de bagaço de cana e farelo de trigo (1:1). O zimograma do extrato bruto evidenciou duas isoformas, de aproximadamente 200 e 50 kDa, as quais foram separadas por cromatografia de filtração em gel. A caracterização da BG50 mostrou atividade ótima a 60 °C e pH 5,0 quando usado o 4-nitrofenol- β -D-glicopiranosídeo (pNPG), enquanto com celobiose o valor da temperatura e pH ótimo foram de 50 °C e pH 4,5, respectivamente. Testes realizados com adição de íons e reagentes mostraram diferenças nos efeitos sobre a atividade da enzima dependendo do substrato, principalmente com a adição de Ditioneitol (DTT) utilizando celobiose, e inibição completa com Cu^{2+} e Fe^{3+} para pNPG e celobiose. Além disso, a enzima não mostrou

efeito inibitório quando testada na presença de nove compostos fenólicos, uma característica significativa. Os estudos cinéticos revelaram um perfil de inibição competitiva pela glicose quando utilizado pNPG com valor de $K_i=1,5$ mM e um K_m significativamente menor (0,52 mM) pelo pNPG do que pela celobiose ($K_m=8,50$ mM). Os parâmetros termodinâmicos mostraram que a BG50 é bastante estável, destacando seu tempo de meia vida de 855,6 minutos a 60 °C, porém desnatura facilmente acima dessa temperatura. Os resultados enfatizam a importância de investigar potencialidades de β -glicosidases baseadas na celobiose, uma vez que no processo industrial a enzima atuará sobre o substrato natural, além da compreensão da termoestabilidade da enzima.

Palavras-chave: Microbiologia. Enzimas de fungos – Aplicações industriais. Enzimas de fungos – Purificação. Fungos termofílicos. Celulose. Cinética enzimática.

ABSTRACT

Cellulases can be used in bioconversion of cellulose from agro-industrial waste into fermentable sugars in order to obtain renewable fuels and chemicals. The β -glucosidases are crucial to the overall saccharification of cellulose, but in most cases, they are strongly inhibited by its product, glucose. Therefore, knowledge of the hydrolysis kinetics of the enzyme and its responses against different substrates and products can set the hydrolysis efficiency and possible incorporation in biotechnological process. This study aimed to characterize the 50 kDa β -glucosidase (BG50) produced by the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* M.7.7 grown in solid state, in a mixture of sugarcane bagasse and wheat bran (1:1). The zymogram of the crude extract showed two isoforms of 200 and 50 kDa, which were separated by gel filtration chromatography. The characterization of BG50 showed optimal activity at 60 °C and pH 5.0 when used pNPG, whereas using cellobiose the values of the optimal temperature and pH were 50 °C and pH 4.5, respectively. Tests with addition of reactants and ions showed differences in the effects on enzyme activity depending on the substrate, especially with the addition of dithiothreitol (DTT) utilizing cellobiose, and complete inhibition with Cu^{2+} and Fe^{3+} for 4-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPG) and cellobiose. Furthermore, the enzyme showed no inhibitory effect when tested in the presence of nine phenolic compounds, a remarkable characteristic. Kinetic studies showed a profile of

competitive inhibition by glucose when using pNPG with $K_i = 1.5 \text{ mM}$ and K_m significantly lower (0.52 mM) with pNPG than using cellobiose ($K_m = 8.50 \text{ mM}$). The thermodynamic parameters show that BG50 is quite stable, highlighting its half life of 855.6 minutes at 60°C , but above this temperature easily denatured. The results emphasize the importance of investigating β -glucosidases' potential based on cellobiose, since for the industrial processes the enzyme will function with its natural substrate, in addition to understanding the thermal stability of the enzyme.

Keywords: Microbiology. Fungal enzymes - industrial applications. Fungal enzymes - purification. Thermophilic fungi. Cellulose. Enzyme kinetics.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Biomassa Lignocelulósica	2
2.2 Celulases	5
2.3 β -glicosidases	7
2.4 Importância e aplicação das β -glicosidases	11
2.4.1 Etanol de segunda geração	11
2.4.2 Setor alimentício	12
2.5 Parâmetros cinéticos das β -glicosidases	13
2.6 Microrganismos e enzimas termofílicas	16
2.7 Termodinâmica	18
2.8 Purificação enzimática	20
3. OBJETIVOS	23
3.1 Geral	23
3.2 Específicos	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 Microrganismo	24
4.2 Substratos	24
4.3. Obtenção da enzima para estudos	25
4.3.1 Inóculo	25
4.3.2 Cultivo em estado sólido (CES)	25
4.4 Quantificação de proteínas totais	26
4.5 Determinação da atividade enzimática	26
4.5.1 Atividade de β -glicosidase utilizando pNPG	26
4.5.2 Atividade enzimática de β -glicosidase utilizando celobiose como substrato	27
4.6 Precipitação salina “salting-out”	28
4.7 Análises eletroforéticas: SDS-PAGE	29
4.8 Zimograma de atividade de β -glicosidase	29
4.9 Estimativa da massa molar das isoformas de β -glicosidase	30

4.10 Purificação da isoforma BG50	30
4.10.1 Cromatografia de Filtração em gel Sephacryl S-100 HR	30
4.11 Caracterização da isoforma BG50	31
4.11.1 Teste de linearidade do tempo de incubação para determinação da taxa inicial de reação (Vo)	31
4.11.2 Teste de inativação de Selwyn	31
4.11.3 Efeito da temperatura de conservação sobre a atividade da BG50	32
4.11.4 Efeito do pH e temperatura sobre a atividade e estabilidade da BG50	32
4.11.5 Efeito de íons e reagentes sobre a atividade da BG50	33
4.12 Determinação dos parâmetros cinéticos.....	34
4.12.1 Parâmetros cinéticos da BG50 utilizando pNPG ..	34
4.12.2 Parâmetros cinéticos da BG50 utilizando celobiose	34
4.13 Termodinâmica da termoinativação irreversível	35
4.13.1 Caracterização quanto à temperatura ótima, cálculo de Ea e Q ₁₀	35
4.13.2. Parâmetros termodinâmicos da desnaturação térmica irreversível	36
4.13.3. Determinação do k _d	36
4.13.4 Tempo de meia-vida t ^{1/2}	37
4.13.5 Energia de ativação da desnaturação térmica E _a (kJ.mol ⁻¹)	37
4.13.6 Entalpia de ativação da desnaturação térmica ΔH _d (kJ.mol ⁻¹)	37
4.13.7 Energia livre de Gibbs de ativação da desnaturação térmica ΔG _d (kJ.mol ⁻¹)	38
4.13.8 Entropia de ativação da desnaturação térmica ΔS _d (J.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	38

4.14 Acentuação da Purificação Parcial da BG50	39
4.14.1 Clarificação do extrato enzimático com carvão ativado	39
4.14.2 Teste piloto para estabelecer as condições de adsorção e eluição da B50 em resina Q-Sepharose	39
4.14.3 Cromatografia de troca iônica (Q - Sepharose).....	40
4.15 Teste de inibição por compostos fenólicos	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	42
5.1 Obtenção das enzimas para estudos de inibição	42
5.1.1 Cultivo em estado sólido (CES)	42
5.1.2 Precipitação salina “ <i>salting-out</i> ”	42
5.2 Zimograma e estimativa da massa molecular das isoformas de β -glicosidase	44
5.3 Separação e purificação parcial da isoforma BG50	45
5.3.1 Cromatografia de Gel Filtração (S-100)	45
5.4 Caracterização da isoforma BG50	47
5.4.1 Teste de linearidade do tempo de incubação para determinação da taxa inicial de reação (V_0)	47
5.4.2 Teste de estabilidade de Selwyn	48
5.4.3 Efeito da temperatura de conservação sobre a atividade da BG50	49
5.4.4 Efeito do pH e temperatura sobre a atividade e estabilidade da BG50	50
5.4.5 Efeito de íons e reagentes sobre a atividade da BG50	54
5.5. Determinação dos parâmetros cinéticos	56
5.6 Termodinâmica da desnaturação térmica irreversível	61
5.7 Clarificação do extrato enzimático com carvão ativado	66
5.8 Teste piloto para estabelecer as condições de adsorção e eluição da B50 em resina Q-Sepharose	67
5.9 Cromatografia de troca iônica (Q - Sepharose)	68
5.10 Teste de inibição por compostos fenólicos	70

6. CONCLUSÕES	73
7. REFERÊNCIAS	74

ABREVIações

BG50: β -glicosidase de 50 kDa produzida pelo fungo *Myceliophthora thermophila* M.7.7

ΔG_d : Variação da energia livre de Gibbs da desnaturação térmica irreversível

ΔH_d : Variação de entalpia da desnaturação térmica irreversível

DMSO: Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo

ΔS_d : Variação de entropia da desnaturação térmica irreversível

DTT: Ditionitrosol

E_a : energia de ativação da enzima

$E_{a(d)}$: energia de ativação para desnaturação irreversível

EDTA: Ácido etilenodiamino tetracético

h : Constante de Planck ($6,63 \times 10^{-34}$ J.s)

HEPES: Tampão ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-2-etanosulfônico

k_B : Constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23}$ J.K⁻¹)

k_d : Constante de primeira ordem da taxa de reação da inativação térmica

MES: Tampão ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico

PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida

PDA: Potato-dextrose-agar (meio de cultura ágar batata dextrose)

PEG: Polietilenoglicol

pNPG: 4-nitrofenol- β -D-glicopiranosídeo

PVA: Álcool polivinílico

Q_{10} : Coeficiente de temperatura

R: constante universal dos gases ($8.314 \text{ J.mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

SDS: Tensoativo Dodecil Sulfato de Sódio

SDS-PAGE: eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida na presença de SDS

T: Temperatura absoluta em Kelvin

$t_{1/2}$: Tempo de meia vida (em minutos)

TRIS: Tampão Tris (hidroximetil) aminometano

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ilustração esquemática da estrutura da lignocelulose. Fonte: GRAMINHA et. al., 2007. 3
- Figura 2.** Ligações β -1,4 entre as moléculas de glicose do polímero de celulose. Fonte: LU; XU; WANG, 2014. 4
- Figura 3.** Resumo de hidrólise enzimática da molécula de celulose. Fonte: PALMA-FERNANDEZ, 2002. 6
- Figura 4.** Visão global de um processo de conversão bioquímica convencional para produzir combustíveis e produtos químicos a partir de biomassa lignocelulósica. Fonte: PAYNE, 2015. 6
- Figura 5.** Estrutura da BGL1. Em (A), um monómero é mostrado em cinza. (B) é uma figura do monómero. O domínio catalítico TIM (azul), domínio α / β (verde), domínio FNIII (amarelo), região de inserção (vermelho) e regiões ligantes (preto). Em (C) é mostrado o domínio FNIII (colorido). Fonte: SUZUKI, 2013. 8
- Figura 6:** Reação catalisada pela β -glicosidase. R= pode ser glicose no caso da celobiose, ou um resíduo arila no substrato sintético pNPG. Fonte: EYZAGUIRRE, 2005. 9
- Figura 7.** Relação da atividade de β -glicosidase das amostras do teste de “salting-out” das frações precipitadas (▪) e dos sobrenadantes (•). Fonte: Autoria própria. 43
- Figura 8.** Gel de poliacrilamida a 10 % em condições não desnaturantes para amostras de solução enzimática bruta de *M. thermophila* M.7.7. O gel 44

A foi corado para proteínas com *Coomassie Blue* e o gel B corado pelo método esculina/cloreto férrico (zimograma) evidencia a atividade enzimática. **P**: Padrão de massa molecular de proteína, **EB**: solução enzimática bruta. Fonte: Autoria própria.

Figura 9. Zimograma das isoformas de β -glicosidase parcialmente purificadas por filtração em gel em Sephacryl S-200. A partir do tubo 35 = BG50. A figura não mostra as frações além do tubo 35, que continham apenas a isoforma BG50. Fonte: Autoria própria. 46

Figura 10. Perfil cromatográfico da solução bruta e concentrada por *salting-out* com sulfato de amônio produzida pelo fungo *M. thermophila* M.7.7. em coluna XK16 com Sephacryl – S200. Valores de absorbância proteica em 280 nm (linha preta) e atividade enzimática de β -glicosidase (linha azul), expressa como absorbância em 410 nm do produto p-nitrofenol. Fonte: Autoria própria. 47

Figura 11. Determinação do tempo de incubação para os ensaios de cinética enzimática, representado pela linha vermelha. (a) para teste com pNPG e (b) para teste com celobiose. Fonte: Autoria própria. 48

Figura 12. Teste de inativação de Selwyn (a) ensaio com pNPG (b) ensaio com celobiose. Fonte: Autoria própria. 49

Figura 13. Efeito da temperatura de estocagem da BG50 sobre a atividade enzimática. A atividade foi testada utilizando (a) pNPG como substrato (b) celobiose como substrato. Fonte: Autoria própria. 50

Figura 14. Efeito da temperatura sobre a BG50 utilizando como substrato celobiose (•) e pNPG (◦): (A) Variação da atividade da BG50 em diferentes 52

valores de temperatura; (B) Atividade residual da BG50 quando incubada a diferentes temperaturas por 1 hora, na ausência de substrato. Nos gráficos são representados as médias (pontos) e desvios padrões (barras). Fonte: Autoria própria.

Figura 15. Efeito do pH sobre a BG50 utilizando como substrato celobiose (-) e pNPG (•): (A) Variação da atividade da BG50 em diferentes valores de pH; (B) Atividade residual da BG50 quando incubada a diferentes pHs por 24 horas à temperatura ambiente, na ausência de substrato. Nos gráficos são representados as médias (pontos) e desvios padrões (barras). Fonte: Autoria própria. 53

Figura 16. Curva de Michaelis-Menten da BG50 utilizando como substrato o pNPG na presença (vermelho) e na ausência (preto) de glicose. Fonte: Autoria própria. 60

Figura 17. Curva de Michaelis-Menten da BG50 utilizando como substrato a celobiose. Fonte: Autoria própria. 60

Figura 18. Gráfico de Arrhenius para o cálculo da energia de ativação (E_a) e temperatura ótima da BG50. No gráfico são representados as médias (pontos). Fonte: Autoria própria. 61

Figura 19. Gráfico de primeira ordem do efeito da temperatura na atividade da BG50: 60 °C (▲); 63 °C (▼) e 65 °C (◀). No gráfico são representados as médias (pontos) e desvios padrões (linhas verticais). Fonte: Autoria própria. 63

Figura 20. Gráfico de Arrhenius de primeira ordem para o cálculo da energia de ativação da desnaturação térmica (E_{ad}) da BG50. Fonte: Autoria própria. 63

Figura 21. (A) Amostra bruta (B) Amostra bruta após filtração com carvão ativado. Fonte: Autoria própria. 66

Figura 22. Perfil cromatográfico da amostra selecionada após gel filtração em coluna XK16 com Q-Sepharose. Valores de absorbância proteica em 280 nm (linha preta), atividade enzimática de β -glicosidase (linha azul) e concentração salina (linha vermelha). Fonte: Autoria própria. 69

Figura 23. Gel de poliacrilamida 10% em condições desnaturantes, corado com nitrato de prata. **P:** Padrão de massa molecular de proteína, **B:** solução enzimática bruta, **C:** solução enzimática após filtração com carvão ativado, **S:** amostra após precipitação salina, **G:** amostra após filtração em gel, **I:** amostra após troca iônica. Fonte: Autoria própria. 69

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Valores da constante de inibição K_i de β -glicosidases de diferentes fungos. Fonte: Autoria própria. 15
- Tabela 2.** Protocolos de purificação de β -glicosidases de diferentes fungos termofílicos. 21
- Tabela 3.** Efeito de íons sobre a atividade enzimática da BG50. (*) 55
diferenças significantes ($p < 0,05$) no teste t de Student. Fonte: Autoria própria.
- Tabela 4.** Efeito de reagentes sobre a atividade enzimática da BG50. 56
(*) diferenças significantes ($p < 0,05$) no teste t de Student. Fonte: Autoria própria.
- Tabela 5.** Coeficiente de temperatura (Q_{10}) estimados com base no 62
Gráfico de Arrhenius. Fonte: Autoria própria.
- Tabela 6.** Parâmetros cinéticos e termodinâmicos da termoinativação 64
irreversível. Fonte: Autoria própria.
- Tabela 7.** Valores de absorvância do ensaio enzimático utilizando 67
pNPG em diferentes pHs para a adsorção da BG50 na resina Q-Sepharose.(ND: não detectado). Fonte: Autoria própria.
- Tabela 8.** Valores de absorvância do ensaio enzimático utilizando 68
pNPG em diferentes concentrações de sal para a eluição da BG50 na resina Q-Sepharose. Fonte: Autoria própria.

Tabela 9. Etapas da purificação parcial da β -glicosidase BG50 do 70
fungo termofílico *Myceliophythora thermofila* M.7.7.. Fonte: Autoria
própria.

Tabela 10. Efeito de fenóis sobre a atividade enzimática da BG50 com 71
os substratos pNPG e celobiose, medida como atividade residual %
(média e desvio padrão).

1. INTRODUÇÃO

De acordo com o Conselho Mundial de Energia o petróleo, gás natural e carvão (fontes de energia não renováveis) , que são a boa fonte de energia , contribuem coletivamente com quase 82 % das necessidades energéticas mundiais e um quinto das emissões de CO₂ é 60% devida aos combustíveis fósseis baseados no petróleo (SHAHEEN et. al., 2013). Assim, para reduzir a dependência desses recursos uma mudança promissora considerável é necessária, como por exemplo utilizar alternativas sustentáveis e renováveis, bem como energia solar, eólica, hídrica, biomassa e calor geotérmico. A indústria química pode depender de biomassa como uma fonte alternativa de energia em um futuro próximo (KARP; SHIELD, 2008).

A sacarificação enzimática da celulose cristalina por enzimas de fungos e bactérias com o objetivo de obter açúcares fermentáveis para a produção de bioetanol ou etanol de segunda geração em processos em batelada requer a ação de várias enzimas altamente específicas, cujo produto final é, principalmente, o monômero de glicose. O complexo celulolítico é composto por uma grande variedade de enzimas hidrolíticas e de oxirredução que agem sinergicamente, sendo as principais do primeiro grupo as endoglicanases, as exoglicanases e as β -glicosidases (RIEDEL, 1997; GÓMEZ, 1985).

É conhecido que as enzimas do complexo celulolítico são inibidas pela celobiose ou pelo produto final da hidrólise, a glicose (RABELO, 2010).

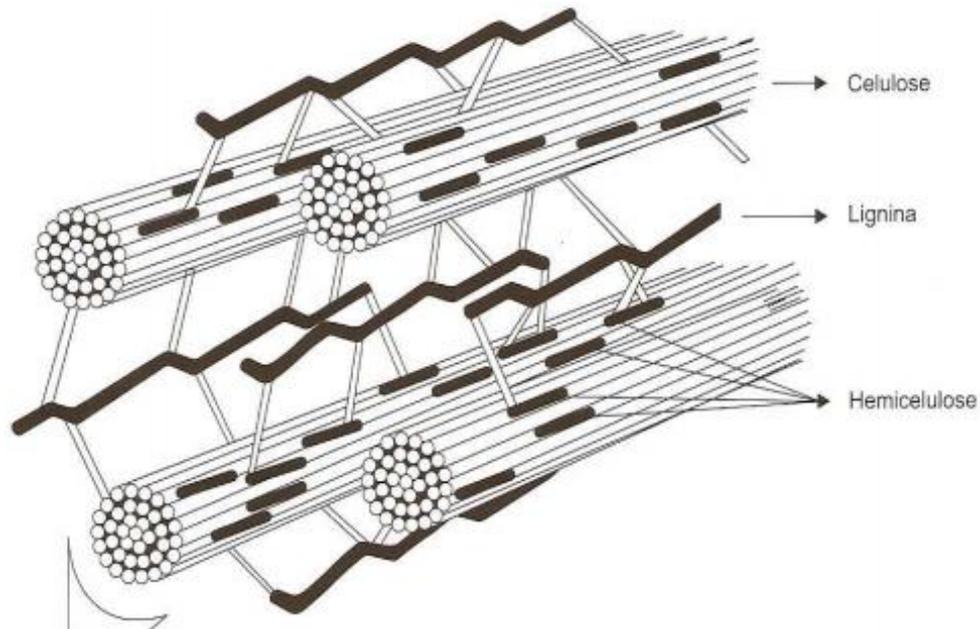
O entendimento dos mecanismos inibitórios da β -glicosidase pela glicose permite propor rotas de remoção dos inibidores, resultando em processos mais eficientes, de menor custo econômico e o uso de menores quantidades de enzimas quando aplicadas a processos de sacarificação (JEFFRIES; JIN, 2000; SRIVASTAVA; GOPALKRISHNAN; RAMACHANDRAN, 1984; SUN; CHENG, 2002).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomassa Lignocelulósica

Os materiais lignocelulósicos (Figura 1) incluem subprodutos (palha de cereais, bagaço de cana, resíduos florestais), resíduos (componentes orgânicos dos resíduos sólidos urbanos), e matérias-primas dedicadas a produção de gramíneas vegetativas, florestas de curta rotação e outras culturas energéticas (SIMS et al., 2010), os quais são constituídos principalmente de celulose (35-50%), hemicelulose (19-25%) e lignina (23-32%) (HAMELINK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005), ou seja, compostos que podem ser convertidos em açúcares fermentáveis por meio de pré-tratamentos e processos de hidrólise (DIAS et al., 2011).

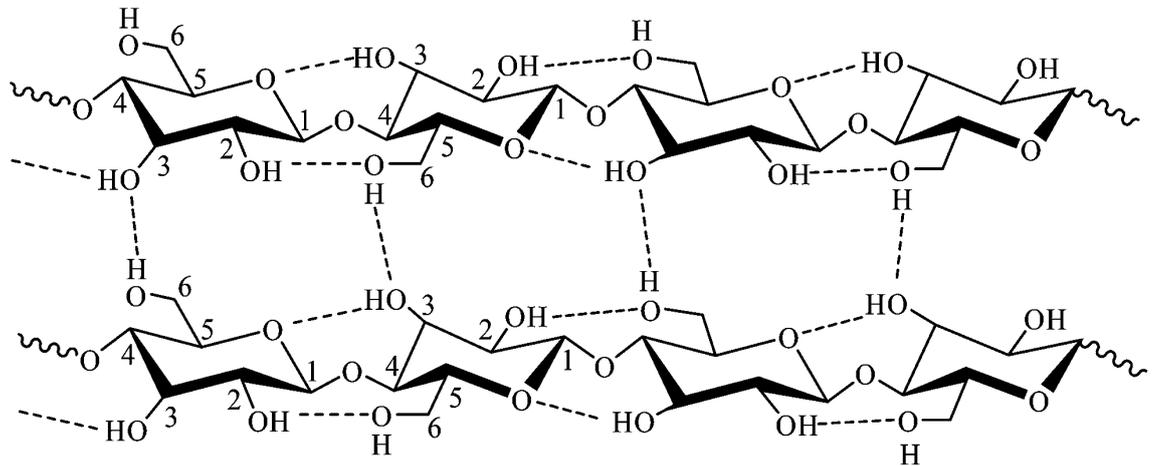
Figura 1. Ilustração esquemática da estrutura da lignocelulose.



Fonte: GRAMINHA et. al., 2007.

A celulose é um homopolímero constituído por monômeros de glicopiranosose ligados entre si por ligações glicosídicas β -1,4. Cada molécula de glicose se relaciona com a seguinte por uma rotação de 180 graus, onde o átomo de oxigênio do anel estabelece uma ligação de hidrogênio com o grupo 3-OH da molécula seguinte (Figura 2). A conformação β permite que a celulose forme cadeias retas bem longas. Várias cadeias retas dispostas paralelamente e interligadas por ligações de hidrogênio formam as microfibrilas que são muito resistentes. As fibras de celulose apresentam regiões cristalinas e amorfas, sendo que estas últimas são mais facilmente hidrolisáveis enzimaticamente (DA-SILVA; GOMES; FRANCO, 1997).

Figura 2. Ligações β -1,4 entre as moléculas de glicose do polímero de celulose.



Fonte: LU; XU; WANG, 2014.

Em 2011, por exemplo, as mais de 400 usinas brasileiras produziram 169 milhões de toneladas de bagaço e 97 milhões de toneladas de palha, um volume enorme de dejetos (RAIZEN, 2012). Devido à sua abundância e sua riqueza em sua constituição, os materiais lignocelulósicos representam uma alternativa promissora para suprir o aumento na demanda pelo bioetanol. Porém, a fim de viabilizar o processo de produção do etanol lignocelulósico, tornando o seu valor competitivo com o etanol produzido a partir do caldo da cana, maiores estudos são necessários. É necessária uma tecnologia mais eficiente de conversão da biomassa, o que está diretamente ligado às estratégias de pré-tratamento dessa biomassa, bem como a identificação de coquetéis enzimáticos adequados (LIMA, 2013).

2.2 Celulases

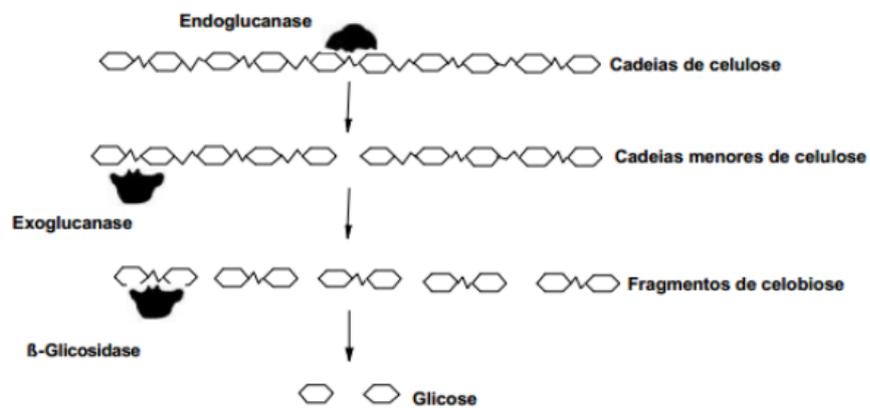
A sacarificação enzimática da celulose cristalina, presente na biomassa lignocelulósica por enzimas de fungos e bactérias requer a ação de várias enzimas altamente específicas, as chamadas celulases, cujo produto final é, principalmente, o monômero de glicose (SØRENSEN et al., 2013). É necessária, no mínimo, a ação de três diferentes enzimas, em sinergia: endoglicanases (EC 3.2.1.4), exoglicanases (EC 3.2.1.91) e a β -glicosidases (EC 3.2.1.21), conforme mostrado pela figura 3 (DA-SILVA; GOMES; FRANCO, 1997); PALMA-FERNANDEZ, 2002).

As celulases podem ser utilizadas para converter a porção de celulose da biomassa não alimentar, tal como resíduos de culturas agrícolas, em açúcares fermentáveis para posterior conversão em combustíveis renováveis e produtos químicos, dentro do conceito de biorrefinarias (PAYNE et al., 2015) (Figura 4).

As endoglicanases hidrolisam ligações internas (β -1,4), preferencialmente nas regiões amorfas que são mais suscetíveis, reduzindo o grau de polimerização deste substrato, produzindo terminais redutores e não-redutores. Sua atuação expõe as microfibrilas ao ataque subsequente de outras enzimas, além de aumentar o número de oligossacarídeos com terminações susceptíveis ao ataque das exoglicanases (MAHESHWARI;BHARADWAJ;BATH, 2000; FUKUDA; KONDO; TAMALAMPUDI, 2009). As exoglicanases removem monômeros ou dímeros das porções terminais das cadeias. (RIEDEL, 1997). Por fim,

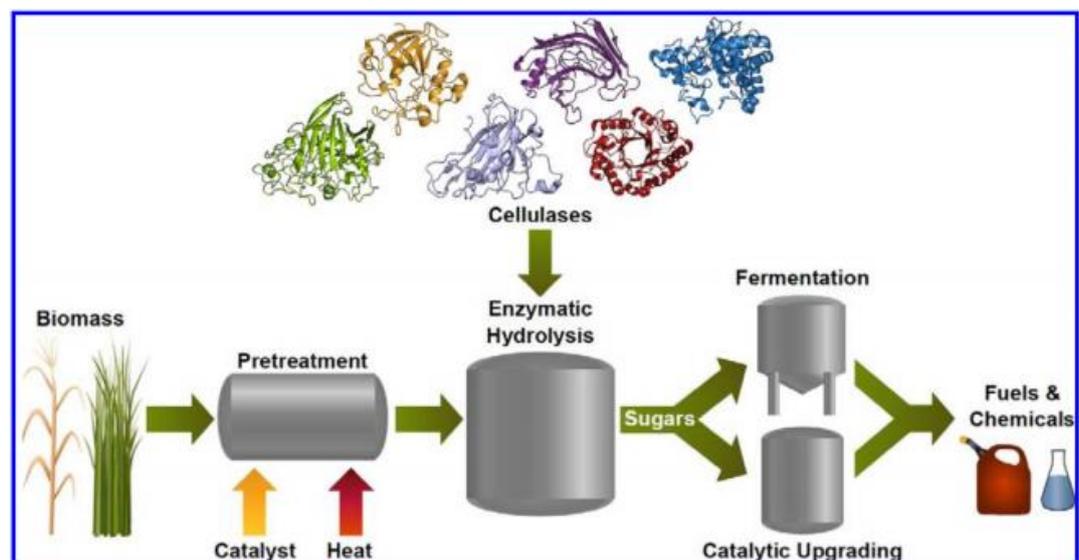
as β -glicosidades hidrolisam celobioses e, em alguns casos, outros oligossacarídeos curtos em glicose (MAHESHWARI; BHARADWAJ; BATH, 2000; FUKUDA; KONDO; TAMALAMPUDI,, 2009).

Figura 3. Resumo de hidrólise enzimática da molécula de celulose.



Fonte: PALMA-FERNANDEZ, 2002.

Figura 4. Visão global de um processo de conversão bioquímica convencional para produzir combustíveis e produtos químicos a partir de biomassa lignocelulósica.



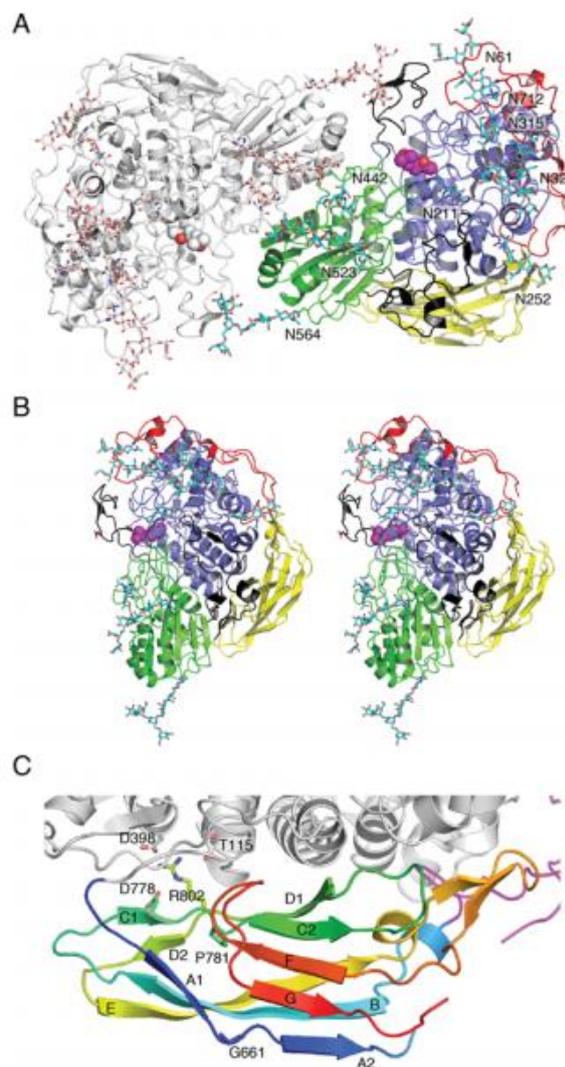
Fonte: PAYNE et al., 2015.

2.3 β -glicosidases

Uma vez que as β -glicosidases fúngicas são responsáveis pela hidrólise da celobiose durante a sacarificação da celulose, são também chamadas celobiasas, o que muitas vezes gera confusão de conceitos, pois este nome sugere especificidade pela celobiose, o que não é o caso, pois existem β -glicosidases que também são capazes de hidrolisar outros oligossacarídeos β -1,4 com comprimentos de cadeia de até oito unidades de glicose (celo-octaose). Tem sido descrito ainda, que para algumas enzimas a velocidade de hidrólise diminui com o aumento do grau de polimerização (DP) do substrato (HOUNSELL, 1986; SADANA; SHEWALE; PATIL, 1983; YAZAKI et al. 1997).

A informação estrutural da enzima é essencial para entender e melhorar a estabilidade e atividade enzimática. Porém, apenas algumas estruturas de β -glicosidases foram publicadas, sendo apenas uma de fungo filamentosos (*Aspergillus aculeatus*) (SØRENSEN et al., 2013). A estrutura da BGL1 do fungo *A. aculeatus* consiste em três domínios: um domínio TIM (triosefosfatisomerase) (forma de barril), um domínio α/β (forma de sanduíche) e um domínio FNIII (fibronectina de tipo III) (Figura 5). Estes domínios estão ligados com duas regiões ligantes. O sítio ativo e os resíduos catalíticos da AaBGL1 estão localizados na interface entre o domínio de barril e o domínio α/β (SUZUKI et al., 2013).

Figura 5. Estrutura da BGL1. Em (A), um monômero é mostrado em cinza. (B) é uma figura do monômero. O domínio catalítico TIM (azul), domínio α/β (verde), domínio FNIII (amarelo), região de inserção (vermelho) e regiões ligantes (preto). Em (C) é mostrado o domínio FNIII (colorido).

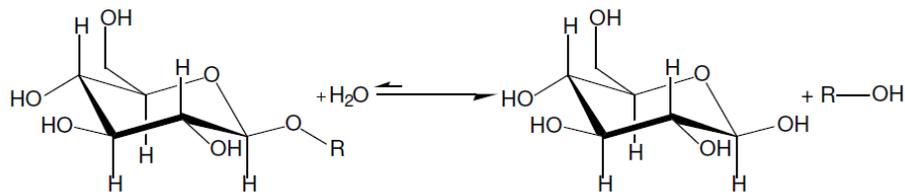


Fonte: SUZUKI et al., 2013

Em função da diversidade na especificidade pelo substrato, as β -glicosidases podem ser classificadas em dois grupos, com base em suas atividades relativas para os substratos celobiose e 4-nitrofenol- β -D-

glicopiranosídeo (pNPG) representado na figura 6 (EYZAGUIRRE; HIDALGO; LESCHOT, 2005).

Figura 6: Reação catalisada pela β -glicosidase. R= pode ser glicose no caso da celobiose, ou um resíduo arila no substrato sintético pNPG.

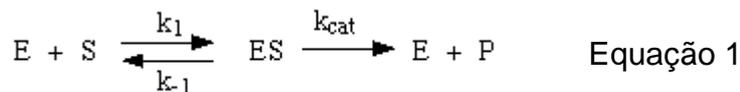


Fonte: EYZAGUIRRE; HIDALGO; LESCHOT, 2005)

Eyzaguirre, Hidalgo e Leschot (2005) utilizando informações de afinidade pelo substrato estimadas pelo K_m (constante de Michaelis), classificaram, operacionalmente, as β -glicosidases em três grupos:

- 1) *Aril- β -glicosidases*: são enzimas que apresentam maiores atividades relativas sobre pNPG do que sobre celobiose, sendo que algumas não apresentam nenhuma atividade para este último substrato (menores valores de K_m para pNPG);
- 2) *Celobiases*: enzimas que têm maior atividade sobre a celobiose do que sobre o substrato sintético (menores valores de K_m para celobiose);
- 3) *β -glicosidases*: com afinidades (K_m) similares para ambos os substratos.

Contudo, cabe lembrarmos que tal premissa é a rigor incorreta, uma vez que a constante K_m não é matematicamente uma medida de afinidade se o valor de k_2 (k_{cat}) for significativo. A constante é formada pelas constantes de velocidade das reações de formação (k_1) e quebra do complexo ES (k_{-1} e k_{cat}): $K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$, (BUGG, 2004) conforme a equação 1 abaixo.



A constante K_m seria equivalente a uma constante de afinidade se $(k_{-1}/k_1) \gg k_{cat}$, porém em geral os valores das constantes de velocidade não são conhecidos para permitirem fazer tal afirmação. Se k_{cat} (k_2) for numericamente desprezível, teremos a equação 2 abaixo, na qual K_s corresponderia à constante de dissociação do complexo ES ($K_s = ([E].[S])/[ES] = k_{-1}/k_1$) e portanto K_m seria uma medida da afinidade pelo substrato, o que era um conceito da formulação original de Michaelis e Menten, porém as contribuições de Briggs e Haldane, com o conceito de “*steady-state*” incluíram a constante k_2 para definir K_m , e medidas posteriores mostraram que nem sempre k_2 é numericamente desprezível (MARANGONI, 2003).

$$K_M = \frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_2}{k_1} = K_S + \frac{k_2}{k_1} \quad \text{Equação 2}$$

2.4 Importância e aplicação das β -glicosidasases

2.4.1 Etanol de segunda geração

O etanol de segunda geração proveniente de resíduos da agricultura e agroindústria associada às biorrefinarias emerge como fundamental na ampliação pretendida da produção de etanol (BASTOS, 2007), sem aumento da área cultivada com cana de açúcar em prejuízo do cultivo de alimentos. Portanto, o investimento em pesquisa e desenvolvimento é essencial para tornar cada vez mais viáveis os biocombustíveis de segunda geração (SIMS et al., 2010).

Em novembro de 2014, foi iniciada a operação da primeira planta industrial para a fabricação do biocombustível em escala comercial, localizada em Piracicaba (SP), a qual permitirá produzir cerca de 40 milhões de litros de etanol a mais por ano (RAIZEN, 2015). No entanto, a conversão enzimática da celulose e hemicelulose em etanol é possível, mas os processos disponíveis no momento ainda são caros e complexos (SOCCOL et al., 2010). Portanto, é necessária uma tecnologia mais eficiente de conversão da biomassa, o que está diretamente ligado às estratégias de pré-tratamento dessa biomassa, bem como a identificação de coquetéis enzimáticos adequados (LIMA, 2013).

Outros fatores relacionados com as enzimas influenciam a hidrólise da celulose. Dentre estes, destacam-se: os tipos de enzimas presentes no preparado enzimático empregado e ação sinérgica entre elas (endoglicanase, exoglicanase e β -glicosidase), concentração das enzimas,

acesso das enzimas ao substrato e inativação das enzimas por processos mecânicos, térmicos ou químicos. Outros fatores como a ligação irreversível com a lignina, nos casos de hidrólise de material lignocelulósico, e inibição pelo produto final também afetam a eficiência e o rendimento da hidrólise enzimática (ANDERSEN, 2007).

É conhecido que as enzimas do complexo celulolítico são inibidas pela celobiose ou pelo produto final da hidrólise, a glicose (MURPHY et al., 2013; XIAO et al., 2004). Vários métodos para reduzir esses problemas de inibição foram sugeridos, incluindo: aumentar o nível de β -glicosidase em preparações, quer pela otimização dos processos de produção ou pela melhoria das linhagens usadas; remoção simultânea de glicose durante a hidrólise por ultra-filtração; suplementação com β -glicosidase não inibida pela glicose; sacarificação e fermentação simultânea (SFS) e conversão do produto final da hidrólise, a glicose, para frutose, a partir do uso de glicose isomerase (JEFFRIES; JIN, 2000; SRIVASTAVA; GOPALKRISHNAN; RAMACHANDRAN, 1984; SUN; CHENG, 2002).

2.4.2 Setor alimentício

As β -glicosidases possuem aplicações na indústria de alimentos onde atuam na remoção de sabores amargos e adstringentes e como redutores de viscosidade (BHATIA; MISHRA; BISARIA, 2002). As enzimas celulolíticas desestruturam a matriz da parede celular dos vegetais, o que facilita a ruptura de célula vegetal aumentando a extração do suco. Durante o processo de vinificação a adição de celulasas auxilia a extração de

antocianinas e terpenos, que estão presentes na casca da uva e são os compostos responsáveis pela coloração e aroma do vinho (TRAON-MASSON; PELLERIN, 1998). As β -glicosidases endógenas da uva não são capazes de atuar durante o processo de vinificação, devido à baixa estabilidade das mesmas (BARBAGALLO et al., 2004). Uma alternativa para o aumento aromático de vinhos está na utilização de enzimas microbianas que atuem nas condições de tal processo. Desta forma, inúmeros trabalhos têm sido realizados no sentido de encontrar enzimas que possam ser utilizadas na vinicultura (BARBAGALLO et al., 2004; GUEGUEN et al., 1997; HERNÁNDEZ et al., 2003; SPAGNA et al., 2002).

A ação de β -glicosidases para a liberação de compostos fenólicos antioxidantes também é relatada. Na fermentação em estado sólido de *cranberry* e bagaço de abacaxi com β -glicosidases produzidas por *Lentinus edodes* e *Rhizopus oligosporus* foi possível observar um aumento da quantidade de compostos fenólicos livres extraíveis mostrando atividade antioxidante (VATTEM; SHETTY, 2003; CORREIA et al., 2004).

2.5 Parâmetros cinéticos das β -glicosidases

Durante a degradação da celulose, o aumento da glicose no meio reacional pode levar a inibição da β -glicosidase, limitando, portanto, todo o processo de degradação da celulose (LIU et al., 2011). A eficiência de diversas β -glicosidases, avaliada com base nos parâmetros cinéticos, $V_{\text{máx}}$ (taxa máxima de reação, quando a enzima é saturada pelo substrato) e K_m (concentração ou constante de Michaelis), tem apresentado valores

bastante variáveis entre os valores relatados na literatura. No primeiro caso, é compreensível dada a relação entre $V_{m\acute{a}x}$ e a concentração de enzima (Et): $V_{m\acute{a}x} = [Et] \cdot k_{cat}$; como não há uma regra, cada grupo de pesquisa usa uma concentração diferente de enzima, impedindo as comparações adequadas. Os valores de K_m sobre substratos diversos têm variado em até mil vezes, embora a grande maioria esteja em torno de 1 mM (CAIRNS; ESEN, 2010). O valor depende de vários fatores: do próprio substrato e das condições experimentais: pH, temperatura, força iônica e polaridade (MARANGONI, 2003), ao que podemos somar a presença ou não de cofatores.

Em termos de avaliação do desempenho de β -glicosidases com base nos parâmetros cinéticos $V_{m\acute{a}x}$ e K_m , uma ótima enzima tem $V_{m\acute{a}x}$ alta e K_m baixo, o que caracteriza uma elevada eficiência catalítica. A partir da equação de Michaelis Menten (equação 3) em situações onde a concentração do substrato é muito maior do que K_m , a velocidade da reação, v , tenderá a atingir $V_{m\acute{a}x}$, sem dependência de K_m ; constituirá uma reação de ordem zero, pois v não responde mais à elevação da [S].

$$v = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_M} \quad \text{Equação 3}$$

A inibição exercida sobre as β -glicosidases pela glicose tem sido relatada para β -glicosidases de vários fungos, principalmente inibição competitiva, embora os tipos de inibição não competitivos e a inibição mista

também tenham sido relatados (RABELO, 2010). A maioria das β -glicosidases microbianas têm constantes de inibição de glicose (K_i) de 0,35 mM a não mais de 100 mM (RIOU et al., 1998). Quanto menor for o valor de K_i mais efetivo será o inibidor, ou seja, a enzima será mais inibida (MURRAY; GRANNER; RODWELL, 2013). Na tabela 1 estão representados alguns valores de K_i encontrados na literatura, tendo os autores utilizado diferentes abordagens para cálculo da K_i .

Tabela 1. Valores da constante de inibição K_i de β -glicosidases de diferentes fungos.

Fungo	Substrato	Abordagem Cinética	Tipo de inibição	K_i (mM)	Referência
<i>Candida beltata</i>	<i>p</i> -nitrofenil- β -D-glicosídeo	Lineweaver-Burk	competitiva	1,4	(SAHA; BOTHAST, 1996)
<i>Aspergillus niger</i>	<i>p</i> -nitrofenil- β -D-glicosídeo	Dixon	competitiva	5,7	(YAN; LIN; LIN, 1998)
<i>Daldinia eschscholzii</i>	<i>p</i> -nitrofenil- β -D-glicosídeo	Lineweaver-Burk	competitiva	0,79	(KARNCHANATAT et al., 2007)
<i>Penicillium italicum</i>	<i>p</i> -nitrofenil- β -D-glicosídeo	Lineweaver-Burk	Não competitiva	8,9	(PARK et al., 2012)
<i>Aspergillus niger</i>	<i>p</i> -nitrofenil- β -D-glicosídeo	Michaelis-Menten	competitiva	2,7	(CHAUVE et al., 2010)
<i>Aspergillus niger</i>	celobiose	Michaelis-Menten	competitiva	3,4	(CHAUVE et al., 2010)

Fonte: Autoria própria.

O conhecimento das cinéticas de hidrólise e as respostas das enzimas frente aos diferentes substratos e aos produtos podem definir a

eficiência de uma hidrólise e do processo biotecnológico no qual está envolvida. Portanto, o entendimento dos mecanismos inibitórios da β -glicosidase pela glicose permitiria propor rotas de remoção dos inibidores, resultando em processos mais eficientes, de menor custo e o uso de menores quantidades de enzimas quando aplicadas a processos de sacarificação da biomassa lignocelulósica (JEFFRIES; JIN, 2000; SRIVASTAVA; GOPALKRISHNAN; RAMACHANDRAN, 1984; SUN; CHENG, 2002).

2.6 Microrganismos e enzimas termofílicas

Microrganismos capazes de crescer em temperaturas elevadas são chamados termofílicos ou termófilos e são classificados em termotolerantes, quando a faixa de temperatura de crescimento está entre 20 e 55°C; termófilos extremos, quando seu crescimento se dá em temperaturas de 65 a 85°C; ou ainda hipertermófilos, quando cresce entre 85 até 110°C. Os microrganismos termotolerantes podem ser encontrados dentro dos domínios Bacteria, Archaea e Eukarya (fungos filamentosos); os microrganismos termófilos extremos são encontrados dentro dos domínios Bacteria e Archaea; e os hipertermófilos apenas são encontrados dentro o domínio Archaea (MADIGAN; OREN, 1999). Existe uma estreita relação entre o nicho ocupado por um microrganismo e as características de suas enzimas intra e extracelulares. Espera-se que microrganismos termófilos produzam enzimas extracelulares capazes de tolerar uma temperatura correspondente a, no mínimo, aquela ótima para seu crescimento. Estudos

com enzimas de termófilos têm mostrado que essa relação é verdadeira, estimulando o isolamento de novas linhagens termófilas, assim como a caracterização das enzimas produzidas e o entendimento dos fatores que levam a sua termoestabilidade (GOMES et al., 2007).

A habilidade das enzimas termofílicas em atuar a elevadas temperaturas permite que os bioprocessos onde são empregadas ocorram em maiores temperaturas; com isso, várias vantagens podem ser obtidas (BRUINS; JANSSEN, BOOM, 2001):

- Apresentam alta estabilidade térmica e geralmente são mais resistentes a agentes detergentes e às enzimas proteolíticas. Como o processo de cultivo ocorre em altas temperaturas, o risco de contaminação por microrganismos é reduzido;

- Por outro lado, em processos com substratos fluidos, em altas temperaturas a viscosidade do meio é reduzida, facilitando o seu bombeamento, filtração e centrifugação, permitindo uma maior economia de água e energia. Ao mesmo tempo, mais substrato pode ser dissolvido em altas temperaturas, proporcionando um maior rendimento e menor tempo necessário para os processos.

As vantagens da utilização industrial de enzimas termoestáveis faz crescer o interesse de obtenção das mesmas. Portanto, além do estudo físico-químico tradicional, a determinação dos parâmetros termodinâmicos é de grande valia; estes fornecem informações de cada etapa do processo de desnaturação proteica, informações estas, que não são obtidas em

estudos de efeito de temperatura e tempo de meia vida (LONGO; COMBES, 1999).

2.7 Termodinâmica

Diferentes proteínas são desnaturadas em diferentes temperaturas. O calor fornece energia para romper as interações não covalentes (ligações de hidrogênio e ligações iônicas), que estabilizam a estrutura nativa da proteína, expondo e permitindo a interação de grupos hidrofóbicos presentes no seu interior (ARAÚJO, 1995). Um aumento da temperatura favorece vibrações no interior da molécula e a energia dessas vibrações pode tornar-se grande o suficiente para desfazer as estruturas secundária e terciária da proteína (COOPER, 1999).

A variação da energia livre de Gibbs, ΔG , mede a energia disponível para realizar trabalho em condições de temperatura e pressão constantes. Em processos favoráveis, a energia livre do sistema diminui, isto é, ocorre liberação de energia. Neste caso, o ΔG apresenta valores negativos e o processo é chamado de exergônico. Em processos não-favoráveis no sentido indicado, é necessário fornecer energia para que a reação ocorra. Neste caso, o ΔG apresenta valores positivos e o processo é chamado de endergônico. Quando o valor de ΔG for igual a zero, significa que o sistema está em equilíbrio (COOPER, 1999). Em processos de desnaturação térmica, o valor de variação de energia livre de Gibbs da desnaturação térmica, ΔG_d , está intimamente relacionado com a estabilidade da proteína.

Quanto maior for o ΔG_d , maior será a estabilidade da enzima (LONGO; COMBES, 1999). Esta afirmação fica bastante clara, se considerarmos que a desnaturação térmica é um processo não-espontâneo, onde é necessário fornecer energia para levar a proteína do estado nativo para o estado desnaturado.

A variação da entalpia da desnaturação térmica irreversível, ΔH_d , quantifica o calor trocado durante uma dada reação entre o sistema e o ambiente. Valores positivos de ΔH_d (reações endotérmicas) indicam que a reação absorve calor do entorno e valores negativos (reações exotérmicas) indicam que a reação libera calor para o meio (COOPER, 1999). Durante o processo de desnaturação protéica por temperatura, a proteína absorve calor do meio, que ocasionará a ruptura das ligações não covalentes, resultando em alteração conformacional da molécula e perda da atividade biológica (LUCARINI; KILIKIAN; PESSOA, 2005). Portanto, valores elevados de ΔH_d refletem elevada estabilidade térmica da proteína, e esta, provavelmente, apresenta número elevado de ligações não-covalentes, que estabilizam sua estrutura terciária (ORTEGA et al., 2004).

A variação da entropia, ΔS , está relacionada com a organização do sistema; o aumento no valor de variação de entropia da desnaturação térmica irreversível, ΔS_d , representa um aumento na desorganização do sistema (COOPER, 1999). O aumento do valor de ΔS_d por desnaturação proteica ocorre devido à exposição das cadeias hidrofóbicas durante o desdobramento da proteína (COBOS; ESTRADA, 2003). Portanto, se

compararmos os valores de ΔS_d obtidos para diferentes proteínas, em elevado nível de desorganização (temperaturas desnaturantes), podemos inferir qual apresenta um número maior de cadeias hidrofóbicas e conseqüentemente maior estabilidade estrutural.

2.8 Purificação enzimática

Para efetuar análises adequadas em relação às propriedades estruturais de uma dada proteína ou enzima, é necessário proceder ao seu isolamento, para poder analisá-la na forma pura. Um método de purificação deve conter um número de etapas reduzidas, pois quanto mais longo for o processo, maior será o seu custo e menor será a recuperação final da proteína de interesse, inviabilizando-o economicamente. A estratégia ideal de purificação vai depender não só das características da proteína de interesse, mas também das propriedades dos contaminantes presentes no extrato bruto (PESSOA; KILIKIAN, 2005). Um protocolo de purificação deve ser determinado considerando vários fatores: facilidade na produção da proteína; escala de manufatura necessária à demanda do produto purificado; eficiência do processo em termos de rendimento e fator de purificação, além da viabilidade econômica (HO et. al., 2000). A maior dificuldade nos processos de purificação de proteínas está em encontrar as melhores estratégias que garantam a preservação de todas as características do produto final necessárias para a sua utilização (ALMEIDA; KURTENBACH, 2002).

Alguns protocolos de purificação de β -glicosidases de fungos termofílicos são encontrados na literatura (Tabela 2).

Tabela 2. Protocolos de purificação de β -glicosidases de diferentes fungos termofílicos.

Fungo	Rendimento (%)	Fator de purificação (Vezes)	Etapas	Peso (kDa)	Referência
<i>Humicola grisea</i>	15	38	- precipitada com acetona; - cromatografia de troca iônica (DEAE – celulose); - cromatografia de filtração (Bio-Gel P-100).	55	PERALTA et al. (1997)
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	3,2	71	- ultrafiltração; - precipitada com etanol; - cromatografia de filtração (Sephadex G-100); - duas cromatografias de troca iônica (Q-Sepharose).	175	PALMA-FERNANDEZ(2002)
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	2,5	43	- ultrafiltração; - precipitada com etanol; - cromatografia de filtração (Sephadex G-100); - duas cromatografias de troca iônica (Q-Sepharose).	157	PALMA-FERNANDEZ (2002)
<i>Scytalidium thermophilum</i>	4	2	- precipitada com sulfato de amônio; - cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose); - cromatografia de troca iônica (CM-celulose).	40,7	ZANOELO, 2005
<i>Scytalidium thermophilum</i>	2	2,4	- precipitada com sulfato de amônio; - cromatografias de troca iônica (DEAE-celulose); - cromatografia de filtração (Sephadex G-100).	147	ZANOELO, 2005

Fonte: Autoria própria.

Em trabalhos anteriores (MORETTI et al., 2012) o fungo *Myceliophthora thermophila* se destacou entre outros, mostrando ser um bom produtor de enzimas celulolíticas obtidas por cultivo em estado sólido, onde foram utilizados resíduos agroindustriais, como bagaço de cana e farelo de trigo, e fontes de nitrogênio de baixo custo. Esse fungo produz duas β -glicosidases, uma de 200 e outra de 50 kDa, denominadas BG200 e BG50, respectivamente. Santos (2014) explorou a BG200, no presente projeto buscou-se estudar a β -glicosidade de menor massa molecular (BG50) expressa pelo fungo *M. thermophila* sob a ótica de sua caracterização enzimática e cinética utilizando substrato artificial (pNPG) e substrato natural (celbiose).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

O presente projeto teve por objetivo estudar a isoforma de β -glicosidase de menor massa molecular (BG50) produzida pelo fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* isolado M.7.7., com relação às suas características bioquímicas e seu comportamento cinético.

3.2 Específicos

- purificação da isoforma de menor peso molecular de β -glicosidase (BG50) expressa pelo fungo *Myceliophthora thermophila* M.7.7.;
- caracterização físico-química da BG50 (pH ótimo, temperatura ótima, estabilidade e efeito de íons e reagentes) utilizando substrato artificial (pNPG) e natural (celobiose);
- calcular os parâmetros cinéticos sobre o substrato artificial (pNPG) e natural (celobiose);
- calcular os parâmetros termodinâmicos da desnaturação térmica irreversível da BG50;
- avaliar o efeito de compostos fenólicos liberados pelo pré-tratamento da massa lignocelulósica sobre a atividade da enzima;
- avaliar o efeito sobre a liberação de compostos fenólicos da borra do café.¹

¹ Este experimento mostrou que a enzima não induz a liberação dos compostos fenólicos, então optamos por não incluir nem a descrição do método nem os resultados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismo

Foi utilizado o fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* M.7.7, isolado de pilha de compostagem de bagaço de cana-de-açúcar em trabalho anterior (MORETTI, 2012), o qual faz parte do estoque de culturas do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, SP.

4.2 Substratos

Para o cultivo do fungo *M. thermophila* M.7.7 foi usada uma mistura de bagaço de cana e farelo de trigo (m/m 1:1). O farelo de trigo foi obtido de mercado local e o bagaço de cana-de-açúcar cedido pela usina de açúcar e álcool Açucareira Virgolino de Oliveira S.A. de José Bonifácio, SP. Os dois substratos foram lavados com água corrente para remoção de resíduos, seguido de secagem em estufa a 60 °C com ventilação até a estabilização do peso seco. Apenas o bagaço passou pelo processo de moagem para reduzir o tamanho das partículas e peneirado em peneira granulométrica para a homogeneização do tamanho das partículas (1-3 mm).

4.3. Obtenção da enzima para estudos

4.3.1 Inóculo

Para o inóculo foram utilizados dois Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio PDA inclinado. O fungo *M. thermophila* M.7.7. foi incubado a 45 °C por 72 h. Após este período foram adicionados 100 mL de solução nutriente composta por: (g/L) KH₂PO₄, 3,0; MgSO₄ 7H₂O 0,5; CaCl₂ 0,5 e Tween 80 (1.0 % v/v), além de (1 %) de extrato de levedura (EL), como fonte de nitrogênio e o pH foi ajustado para 5. Utilizando uma alça de platina, os esporos, produzidos pelo fungo após as 72h de incubação, foram ressuspensos na solução para prosseguir com o cultivo em estado sólido.

4.3.2 Cultivo em estado sólido (CES)

A seleção dos substratos utilizados no cultivo foi feita com base nos resultados obtidos por Moretti et al (2012), que mostraram que a mistura de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo permitiu uma maior produção β -glicosidase para *M. thermophila*. Foram utilizadas embalagens de polipropileno contendo 5 g de substrato (2,5 g de farelo de trigo e 2,5 g de bagaço de cana) onde 20 mL da solução nutriente contendo esporos foram adicionados, resultando em umidade final de 80 %. Esse material foi incubado a 45 °C e após 96 h de cultivo a amostra foi retirada da incubadora e foram adicionados 50 mL de água destilada (1:10 m/v) ao material fermentado. O material foi agitado por 30 min. em *shaker* a 100 rpm, filtrado

com tecido e centrifugado em 10.000 xg por 15 min. a 10 °C para clarificação.

4.4 Quantificação de proteínas totais

A quantificação de proteínas totais se deu pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1959). Para a confecção da curva-padrão foi utilizada albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich).

4.5 Determinação da atividade enzimática

4.5.1 Atividade de β -glicosidase utilizando pNPG

Para a determinação da atividade de β -glicosidase, 50 μ L da solução enzimática foram adicionados a uma mistura de 250 μ L de solução tampão acetato de sódio (0,1 M e pH 5,0) e 250 μ L de 4-nitrofenol- β -D-glicopiranosídeo (4 mM) – PNPG (Sigma-Aldrich). A reação foi mantida a 60 °C por 5 minutos e interrompida com 2 mL de solução 2 M de Na₂CO₃. O nitrofenol liberado foi quantificado por espectrofotometria a 410 nm. A metodologia foi executada conforme Leite et al. (2008). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1,0 μ mol de nitrofenol por minuto de reação. Os cálculos em micromoles de produto liberado por minuto por mL (μ moles.min.mL) foram feitos relacionando a absorbância obtida com os valores de uma curva padrão pela equação 4, a seguir:

$$\mu\text{moles. min. mL} = \frac{\text{Abs} - (-0,012)}{3,19} \div 10 \div 0,05 \times \text{Diluição} \quad \text{Equação 4}$$

No qual:

0,012	x obtido da curva padrão
3,19	y obtido da curva padrão
10	Tempo de reação em minutos
0,05	Quantidade de amostra em mL

4.5.2 Atividade enzimática de β -glicosidase utilizando celobiose como substrato

No protocolo para a determinação da atividade de β -glicosidase utilizando celobiose são realizadas duas reações. Na reação 1, 20 μ L da solução enzimática foram adicionados a 10 μ L de celobiose (4mM) em tampão acetato de sódio (0,1 M e pH 5,0). A reação foi mantida a 50 °C por 20 minutos e interrompida pela imersão dos tubos em água fervente por 2 minutos. Em seguida foi determinada a concentração de glicose liberada pelo Kit enzimático de Glicose (KATAL) (reação 2), onde 1 mL do Kit foi adicionado a 10 μ L da reação 1 e a reação 2 foi mantida a 37 °C por 15 minutos. Para interromper a reação os tubos foram imersos no gelo. A leitura foi realizada em espectrofotometria a 505 nm e a quantidade de glicose liberada foi determinada a partir de uma curva padrão de glicose. Essa metodologia foi adaptada de Gonçalves (2010). Os cálculos foram

feitos relacionando a absorbância obtida com os valores de uma curva padrão pela equação 5, a seguir:

$$\mu\text{moles. min. mL} = \left(\frac{\text{Abs} - (-0,01589)}{0,32707} \times 0,03 \div 0,01 \right) \div 0,02 \div 20 \div 2$$

No qual:

0,2513	x obtido da curva padrão
26,48487	y obtido da curva padrão
0,03	Volume total da reação 1
0,01	Quantidade de amostra em ml na reação 2
0,02	Quantidade de amostra em ml na reação 1
20	Tempo de reação em minutos da reação 1
2	2 glicoses liberadas representa a ação de 1 enzima

4.6 Precipitação salina “*salting-out*”

Com o intuito de concentrar a solução enzimática bruta obtida pelo cultivo em estado sólido e testar sua viabilidade como método de purificação, quatro amostras foram submetidas a diferentes concentrações de sulfato de amônio (30, 50 70 e 90 %) por meia hora de agitação em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 3.000 xg por 40 minutos a 4 °C e foi realizada a atividade de β-glicosidase (método 4.5.1) das frações precipitadas e do sobrenadante resultante.

4.7 Análises eletroforéticas: SDS-PAGE

O perfil proteico foi analisado por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (RHODES; LAUE, 1990; SEE; JACKOWSKI, 1990). O gel de corrida preparado foi de 10 % e o gel de empilhamento de 5 %, o tampão de corrida utilizado foi Tris 25 mM - Glicina 0,2 M (pH 8,3) contendo SDS. A amostra foi preparada na proporção 1 de amostra: 1 de glicerol 20 % + azul de bromofenol, sendo aplicados aproximadamente 30 μ L de amostra em cada poço. Como método de coloração utilizou-se impregnação por nitrato de prata (ALFENAS, 1998) e foram aplicados ao gel 4 μ L de marcadores de massa molecular *wide range* (Sigma-Aldrich).

4.8 Zimograma de atividade de β -glicosidase

Com o objetivo de detectar diferentes isoformas de β -glicosidasas na solução enzimática bruta, foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 10 % em condições não desnaturantes (sem SDS). Após a corrida eletroforética a 110 V, em tampão de corrida pH 8,3, o gel foi dividido em 2 partes, uma denominada "A" contendo os padrões de massa molecular para proteínas globulares e tampão de amostra com β -mercaptoetanol (1:20), cujas bandas foram coradas por *Coomassie Blue* (Sigma-Aldrich) e uma parte denominada "B" contendo duplicata de 10 μ L da amostra com 5 μ L de tampão de amostra sem β -mercaptoetanol, a qual foi usada para determinação da atividade de β -glicosidase. Após a corrida eletroforética o gel foi imerso em tampão acetato de sódio 0,2 M e pH 5 por

10 minutos, em seguida, imerso em tampão acetato de sódio contendo Esculina (6,7-dihidroxicoumarina 6-glicosídeo) e Cloreto Férrico, sendo mantido a 60 °C por 10 minutos. Durante a incubação, a atividade de β -glicosidase foi detectada pela formação de um precipitado escuro, característico da presença de esculetina, liberada pela hidrólise da esculina pela β -glicosidase, com o íon férrico (KWON; LEE; KANG, 1994).

4.9 Estimativa da massa molar das isoformas de β -glicosidase

Para a estimativa da massa molecular das isoformas em condições desnaturantes, foi feita uma eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), usando gel de corrida a 10 % e gel de empilhamento a 5 %. O gel foi dividido em duas partes, uma denominada "A" corado com *Coomassie Blue* e o outro denominado "B" corado pelo método esculina/cloreto férrico. A estimativa das massas moleculares das isoformas foi determinada comparando as bandas do zimograma com os padrões de proteínas globulares de massa molecular conhecida.

4.10 Purificação da isoforma BG50

4.10.1 Cromatografia de Filtração em gel Sephacryl S-100 HR

A solução enzimática concentrada por *salting out* foi aplicada em coluna cromatográfica contendo resina Sephacryl S-100 empacotada em coluna XK16 e conectada a um equipamento FPLC ÄKTA Purifier (*GE Healthcare Life Sciences*). As proteínas foram eluídas isocraticamente com

tampão Tris pH 5,0 (20 mM) contendo NaCl 0,3 M, com fluxo volumétrico de 0,2 mL/min e frações de 1 mL foram coletadas por tubo. A atividade de β -glicosidase foi determinada usando pNPG, e para evidenciar a separação das duas isoformas foi realizado um zimograma conforme Kwon, Lee e Kang (1994).

4.11 Caracterização da isoforma BG50

4.11.1 Teste de linearidade do tempo de incubação para determinação da taxa inicial de reação (V_0)

Para determinar o tempo de incubação ideal dos ensaios enzimáticos foram realizadas as atividades enzimáticas conforme o método 4.5.1 para pNPG e método 4.5.2 para celobiose alterando apenas o tempo de reação (2 a 20 minutos) para cada substrato. Foi adotado o tempo máximo de incubação que permitiu a liberação linear do produto em relação ao tempo.

4.11.2 Teste de inativação de Selwyn

Os ensaios enzimáticos realizados para esse teste foram feitos conforme o método 4.5.1 para pNPG e método 4.5.2 para celobiose, com base na proposta de Selwyn (SELWYN, 1965), que testa a estabilidade da enzima durante o ensaio enzimático. Foi feita a atividade enzimática com a amostra sem diluir e diluída duas vezes, variando também o tempo de reação (30 s, 1, 3 e 5 min para pNPG e 30 min, 1, 2, 3, 4, 5 e, 6 h para celobiose). Como não tínhamos a concentração real da enzima, para

confeccionar o gráfico foram multiplicados por dois os tempos das reações sem diluição e montado o gráfico no programa QtiPlot 0.9.8.8 Svn 2255 (© 2004-2011 Ion Vasilief). O valor de [P] é determinado apenas pelo produto do tempo e da concentração de enzima. Assim, se um conjunto de curvas de progresso da reação (Abs vs. tempo multiplicado pela concentração de enzima) no qual os parâmetros da reação são mantidos constantes (com exceção da concentração de enzima), devem se sobrepor: $[E].t = f[P]$.

4.11.3 Efeito da temperatura de conservação sobre a atividade da BG50

Também foi avaliado o efeito da temperatura na conservação da enzima às temperaturas de -80, -10, 10 e 25 °C. Os ensaios enzimáticos foram feitos após 6 horas, 1 dia, 1 mês e 2 meses em cada condição.

4.11.4 Efeito do pH e temperatura sobre a atividade e estabilidade da BG50

Os testes de caracterização da enzima foram realizados da mesma forma para os dois substratos, variando apenas o ensaio enzimático final utilizado para cada um (método 4.5.1. para pNPG e método 4.5.2. para celobiose).

O comportamento da atividade das enzimas em função do pH foi estudado incubando a solução enzimática e substrato em diversos tampões, de tal maneira que o pH fosse próximo do pKa do mesmo: acetato

(pH 3,0 a 5,5), MES (pH 5,5-6,5), HEPES (pH 7,0-8,0) e glicina-NaOH (pH 8,5 a 10,5), sendo medida a atividade a 60 °C.

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi avaliado incubando-se a mistura de reação em temperaturas de 30 a 80 °C, e a atividade foi medida no pH determinado como ótimo.

Para avaliar o efeito da temperatura sobre a estabilidade da enzima em ausência de substrato, a solução enzimática foi mantida por uma hora, em temperaturas de 30 a 80 °C. Após esse período, foram tomadas amostras para o ensaio da atividade enzimática, realizado nas condições de pH e temperatura ótimos. O efeito do pH sobre a estabilidade da enzima foi realizado mantendo a solução enzimática por 24 horas, a 25 °C, em tampões de pH 3 a 11, e o ensaio da atividade enzimática realizado nas condições de pH e temperatura ótimos.

4.11.5 Efeito de íons e reagentes sobre a atividade da BG50

A influência de íons e reagentes foi avaliada realizando a medida de atividade enzimática em presença de KCl, MgCl₂, NaCl, MnCl₂, FeCl₃, CuCl₂, CoCl₂, NiCl, AlCl₃, BaCl₂, ZnCl₂, LiCl₂, PVA, DMSO, Triton-X-100, Isopropanol, PEG, Etanol, Acetona, EDTA, DTT, SDS e glicose em concentração 2,5 mM na mistura reacional. Os resultados foram comparados com os da amostra controle (referência de 100 % utilizando o teste t de Student (ZAR, 2010), adotando como significantes valores de

$p < 0,05$, realizada pelo software QtiPlot 0.9.8.8 Svn 2255 (© 2004-2011 Ion Vasilief).

4.12 Determinação dos parâmetros cinéticos

4.12.1 Parâmetros cinéticos da BG50 utilizando pNPG

Os parâmetros cinéticos utilizando substrato artificial foram determinados variando-se a concentração do substrato pNPG (0,2 a 20 mM) na ausência e na presença de glicose (8 mM) com tempo de reação de 5 minutos, conforme o método 4.5.1. Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram obtidos a partir do gráfico de Michaelis-Menten realizado pelo gráfico no programa QtiPlot antes mencionado. A K_i foi calculada a partir das equações 6 e 7, a seguir (WILSON; WALKER, 2010):

$$K_{m\text{aparente}} = K_{m\text{real}} \times \alpha \quad \text{Equação 6}$$

$$\alpha = \frac{1 + [I]}{K_I} \quad \text{Equação 7}$$

4.12.2 Parâmetros cinéticos da BG50 utilizando celobiose

Os parâmetros cinéticos utilizando substrato natural foram determinados variando-se a concentração do substrato celobiose (0,5 a 80 mM) com tempo de reação de 3 minutos, conforme o método 4.5.2. Os

valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram obtidos a partir do gráfico de Michaelis-Menten realizado pelo gráfico no programa QtiPlot.

4.13 Termodinâmica da termoinativação irreversível

A análise termodinâmica da BG50 parcialmente pura seguiu o protocolo proposto por Saquib et al. (2010, 2012), por meio da determinação da atividade enzimática utilizando pNPG. Assume-se que, no esquema abaixo, onde “N” representa a conformação nativa e “D” a desnaturada passível de reversão, seja medida a desnaturação irreversível “I”:



4.13.1 Caracterização quanto  temperatura ótima, cálculo de E_a e Q_{10}

Os experimentos para determinação da temperatura ótima de atividade foram executados como descrito no item 4.11.4. Os resultados foram representados em um gráfico de Arrhenius: logaritmo natural (ln) da atividade em U/mL vs. $1000/T$ na qual T corresponde à temperatura absoluta em Kelvin. Realizamos um ajuste linear para obter o valor da inclinação da porção descendente. A energia de ativação (E_a) em $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ foi calculada a partir do gráfico descrito pela equação 8, na qual R corresponde à constante geral dos gases, $8,314 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$:

$$E_a = -(\text{inclinação}\cdot R) \quad \text{Equação 8}$$

Por outro lado, o coeficiente de temperatura (Q_{10}) foi calculado pela equação 9.

$$\ln Q_{10} = \frac{E_a \cdot 10}{R \cdot T^2} \quad \text{Equação 9}$$

A temperatura ótima em graus Celsius foi calculada pela equação 10, na qual “x” é o ponto de interseção das retas ascendente e descendente do gráfico de Arrhenius.

$$T \text{ ótima} = (100/x) - 273 \quad \text{Equação 10}$$

4.13.2. Parâmetros termodinâmicos da desnaturação térmica irreversível

A enzima foi incubada em diversas temperaturas (50, 55, 60, 63 e 65 °C) por diferentes períodos (10 até 150 min.). Depois de transcorrido o tempo, a amostra foi colocada em banho de gelo e posteriormente mantida *overnight* a 4 °C para que as estruturas secundária e terciária se estabilizassem e que qualquer desdobramento reversível fosse refeito (SAQUIB et al., 2012).

4.13.3. Determinação do k_d

Para cálculo da constante de primeira ordem da taxa de desnaturação k_d foi confeccionado um gráfico de ln atividade residual vs o tempo (min.) para cada temperatura de incubação. Realizou-se o ajuste

linear de cada curva para cálculo do valor da inclinação, simbolizado por k_d (min.^{-1}).

4.13.4 Tempo de meia-vida $t_{1/2}$.

O tempo de meia-vida, em minutos, foi estimado conforme descrito na equação 11:

$$t_{1/2} = \ln 2/k_d = 0,693/k_d \quad \text{Equação 11}$$

4.13.5 Energia de ativação da desnaturação térmica E_a (kJ.mol^{-1}).

Foi construído um gráfico de $\ln k_d$ vs. $1000/T$, sendo a E_a calculada pela equação 12:

$$E_a = - (\text{inclinação} \cdot R) \quad \text{Equação 12}$$

4.13.6 Entalpia de ativação da desnaturação térmica ΔH_a (kJ.mol^{-1}).

A entalpia de ativação da desnaturação térmica foi estimada pela equação 13:

$$\Delta H_a = E_{a(D)} - RT \quad \text{Equação 13}$$

4.13.7 Energia livre de Gibbs de ativação da desnaturação térmica $\Delta G_d(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$

A energia livre de ativação da desnaturação térmica irreversível foi estimada pela equação 14 abaixo, na qual K_b é a constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}$) e h a constante de Planck ($6,63 \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$):

$$\Delta G_d = -RT \cdot \ln\left(\frac{k_d \cdot h}{k_B \cdot T}\right) \quad \text{Equação 14}$$

4.13.8 Entropia de ativação da desnaturação térmica $\Delta S_d(\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1})$

A entropia de ativação da desnaturação térmica foi estimada pela equação 15:

$$\Delta S_d = \frac{\Delta H_d - \Delta G_d}{T} \quad \text{Equação 15}$$

4.14 Acentuação da Purificação Parcial da BG50

Para tentarmos obter uma enzima mais pura a fim de fazer outros experimentos como desnaturação térmica em dicroísmo circular e espectrometria de massa, dois procedimentos foram acrescentados na metodologia de purificação: (a) Clarificação do extrato enzimático com carvão ativado (Etapa anterior à precipitação salina) e (b) Cromatografia de troca iônica (Etapa posterior à cromatografia em filtração em gel).

4.14.1 Clarificação do extrato enzimático com carvão ativado

O extrato enzimático bruto foi filtrado em carvão ativado em pó (Synth). O teste foi realizado em coluna de plástico com filtro de 10 mL, a qual foi empacotada com 0,2 g de carvão ativado e adicionado 10 mL de amostra resultando em 2 % de carvão ativado em relação à quantidade de amostra aplicada. A solução foi coletada e centrifugada 3.000 xg por 10 minutos a 4 °C a fim de decantar o carvão em suspensão.

4.14.2 Teste piloto para estabelecer as condições de adsorção e eluição da BG50 em resina Q-Sepharose

Esse teste foi realizado em tubos de ensaio, simulando as condições da coluna de purificação em pequena escala. A estratégia baseia-se em duas etapas: (a) determinação do pH que permite a adsorção da proteína à resina iônica e (b) determinação da concentração ideal de sal para a eluição da proteína na resina iônica. A resina utilizada no teste foi a Q-

Sepharose (Sigma-Aldrich) suspensa em água deionizada (1:1) e 1 mL de resina foi adicionado a cada tubo de ensaio.

Inicialmente cada tubo de ensaio foi equilibrado com 2,5 mL de diferentes tampões: Bis-Tris (20 mM) pH 6, 6,5 e 7 e Tris (20 mM) pH 7,5, 8 e 8,5. As soluções foram agitadas em vórtex e após decantação da resina o sobrenadante foi removido e o procedimento repetido 2 vezes. Em seguida 0,5 mL de amostra e 0,5 mL dos respectivos tampões foram adicionados e agitados em vórtex por 10 minutos. Após decantação da resina os sobrenadantes foram retirados para realizar atividade enzimática conforme o método 4.5.1 e selecionado o pH com nenhuma atividade, condição na qual toda a enzima teria sido adsorvida pela resina (tampão de ligação).

Com o pH selecionado do tampão de ligação agora mantido constante foram reequilibrados mais 10 tubos de ensaio e foi feito o procedimento anterior novamente, porém diferentes concentrações de NaCl foram adicionadas (0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 e 0,6 M) e agitados em vórtex por 10 minutos. Após decantação da resina os sobrenadantes foram retirados para realizar atividade enzimática conforme o método 4.5.1 e selecionada a concentração de sal mais baixa com maior atividade.

4.14.3 Cromatografia de troca iônica (Q - Sepharose)

Dez mL de amostra retirada após a filtração em gel foi aplicada em coluna cromatográfica de troca iônica contendo resina Q-Sepharose

empacotada em coluna XK16 e conectada a um equipamento FPLC ÄKTA Purifier (*GE Healthcare Life Sciences*). Inicialmente as proteínas foram eluídas com tampão Tris pH 7,5 (20 mM) com fluxo volumétrico de 0,2 mL/min Após passado 5 vezes o volume de coluna do tampão inicial, variações de sal foram aplicadas à coluna a partir do tampão de eluição Tris pH 7,5 (20 mM) com 0,5 M de NaCl com fluxo volumétrico de 0,2 mL/min e frações de 1 mL foram coletadas por tubo. A atividade de β -glicosidase foi determinada pelo método 4.5.1.

4.15 Teste de inibição por compostos fenólicos

A influência de compostos fenólicos representativos daqueles que podem ser liberados durante o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica foi avaliada realizando a medida de atividade enzimática em presença de Ácido Tânico, Ácido p-Comárico, Ácido Siringico, Ácido Gálico, Ácido Ferúlico, Ácido 4-hidroxibenzoico, Vanilina, Ácido Vanílico, Siringaldeido em concentração 2,5 mM na mistura reacional para o método 4.5.2 (celobiose). Devido à coloração dos reagentes Ácido Tânico, Ácido Ferúlico e Siringaldeido, as concentrações foram alteradas para 0,062, 0,5 e 0,25 mM para o método 4.5.1 (pNPG). Os resultados foram comparados com os da amostra controle (referência de 100 % utilizando o teste t de Student, adotando como significantes valores de $p < 0,05$, realizada pelo software QtiPlot).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Obtenção das enzimas para estudo

5.1.1 Cultivo em estado sólido (CES)

Foram obtidos dois litros de extrato enzimático por cultivo em estado sólido contendo bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo. A concentração total de proteínas presente na amostra determinada pelo ensaio de Lowry resultou em 2,8 mg/mL e a atividade para β -glicosidase em 17 U/mL, um total aproximado de 34.000 U, com atividade específica total de 6 U/mg.

5.1.2 Precipitação salina “*salting-out*”

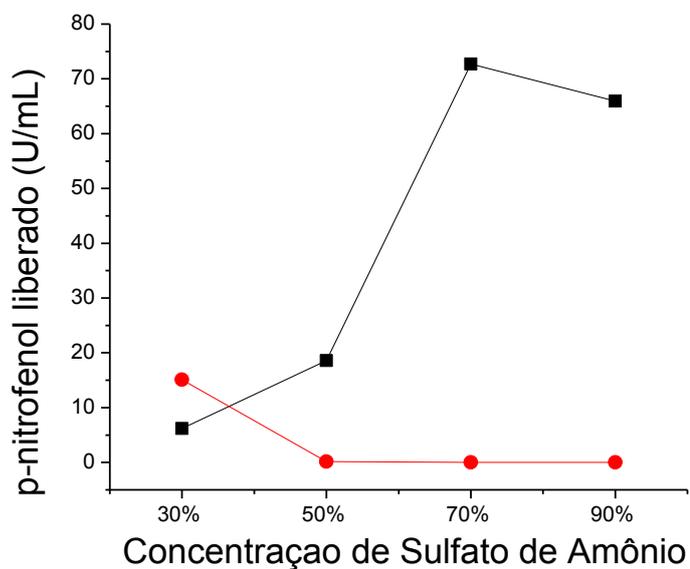
A precipitação com sulfato de amônio de proteínas é uma técnica clássica muito utilizada na purificação de enzimas, que leva vantagens devido ao efeito de precipitação causada por elevadas concentrações de sais. Este fenómeno pode não ser adequado para a purificação total da proteína desejada, mas é uma eficiente ferramenta para a sua concentração, e também é útil para a remoção de alguns contaminantes (BARROS et al., 2001).

Nesse caso, a precipitação com sulfato de amônio do extrato bruto mostrou que a concentração de β -glicosidase em 70 % de saturação, com atividade resultante de 72,7 U/mL, foi a melhor (Figura 7). As atividades das frações do sobrenadante mostraram que com o aumento da

concentração salina a atividade enzimática chegou a zero já na concentração de 70%. Portanto, esse teste mostrou que com 70 % de sal já foi possível obter precipitação total da enzima desejada, já com 90 % de sal observou-se que embora também ocorra a precipitação total de β -glicosidase a atividade na fração precipitada mostrou uma diminuição.

Esse teste permitiu encontrar a condição ideal para os experimentos seguintes, onde o extrato bruto foi concentrado por “*salting-out*” com 70 % de sulfato de amônio a fim de obter uma amostra com alta concentração de β -glicosidase.

Figura 7. Relação da atividade de β -glicosidase das amostras do teste de “*salting-out*” das frações precipitadas (■) e dos sobrenadantes (●).

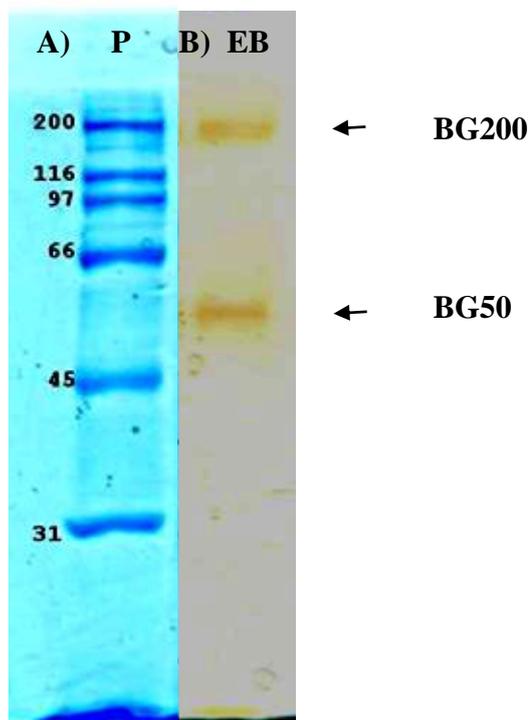


Fonte: Autoria própria.

5.2 Zimograma e estimativa da massa molecular das isoformas de β -glicosidase

O zimograma realizado seguindo metodologia descrita por Kwon, Lee e Kang (1994) mostrou duas bandas escuras presentes na solução bruta, correspondendo a formação da esculetina com íon férrico, evidenciando a atividade de duas isoformas de β -glicosidase (Figura 8 - gel B). As massas moleculares estimadas para as isoformas de β -glicosidase, relacionando com o padrão de massas moleculares utilizado no gel A (Figura 8) já determinadas, foram de aproximadamente de 200 e 50 kDa, e assim denominadas BG200 e BG50 respectivamente.

Figura 8. Gel de poliacrilamida a 10 % em condições não desnaturantes para amostras de solução enzimática bruta de *M. thermophila* M.7.7. O gel A foi corado para proteínas com *Coomassie Blue* e o gel B corado pelo método esculetina/cloreto férrico (zimograma) evidencia a atividade enzimática. **P:** Padrão de massa molecular de proteína, **EB:** solução enzimática bruta.



Fonte: Autoria própria.

Vários fungos filamentosos apresentam a propriedade de expressar diferentes isoformas de β -glicosidase, dependendo das condições de cultura ou de fontes de carbono (SINGHANIA et al., 2011) e a regulação da expressão de múltiplas isoformas de celulasas ainda não está totalmente elucidada, o que exige mais pesquisas sobre as sequências e diferentes expressões das isoformas (BADHAN et al., 2007). A indução de diferentes isoformas pode ter relação com os metabólitos presentes nos meios de cultura, e o entendimento sobre a regulação seria importante na concepção de condições de cultura para a superprodução desejada de isoformas ou metabólitos secundários. O tipo de substrato submerso ou sólido também influencia a expressão das isoformas distintas (WILLICK; SELIGY, 1985; NAZIR et al., 2010).

A partir desse resultado procedemos à purificação parcial da β -glicosidase de menor peso molecular (BG50) e sua caracterização.

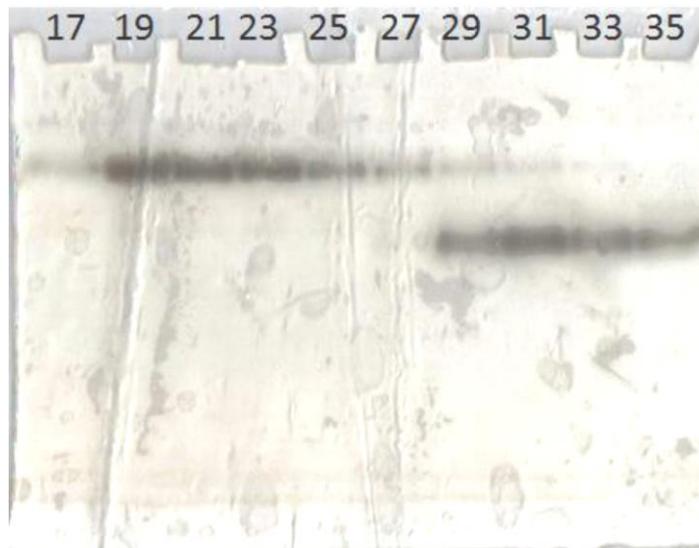
5.3 Separação e purificação parcial da isoforma BG50

5.3.1 Cromatografia de Gel Filtração (S-100)

Após a aplicação da solução bruta e concentrada por *salting out* a uma coluna de gel de Sephacryl S-100 conectada a um cromatógrafo líquido (*ÄKTA purifier*) a separação das isoformas de β -glicosidase foi analisada realizando um zimograma em gel de poliacrilamida a 10 %, utilizando esculina como substrato e cloreto férrico para o zimograma (Figura 9). Para a caracterização da isoforma de 50 kDa foi coletado o

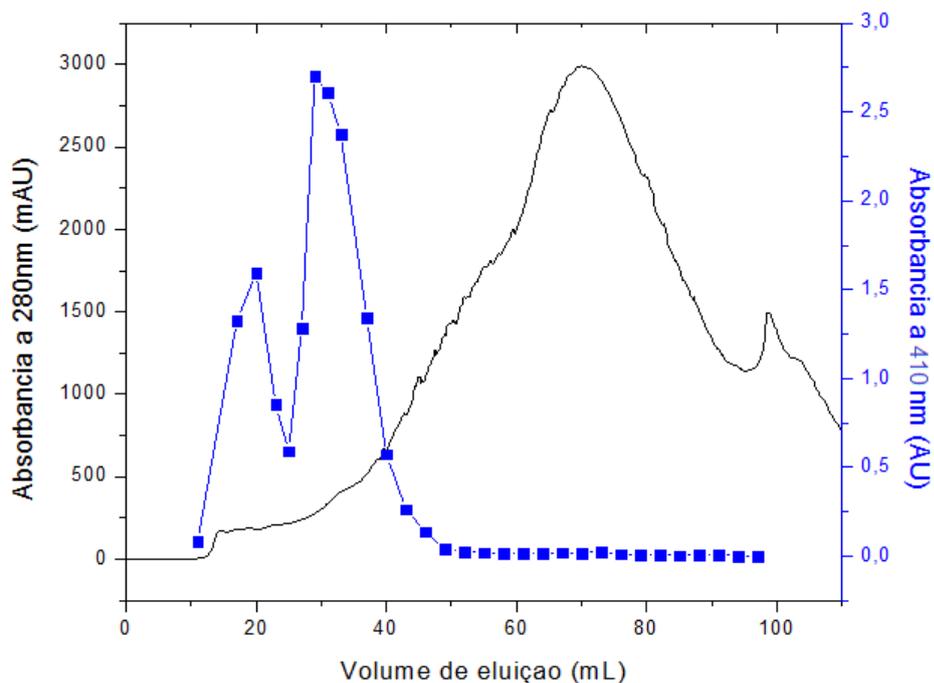
material dos tubos 35 até o tubo 49, o qual ainda obteve atividade enzimática para a enzima (Figura 10). O processo foi realizado mais de uma vez para obtenção de maiores quantidades de amostra.

Figura 9. Zimograma das isoformas de β -glicosidase parcialmente purificadas por filtração em gel em Sephacryl S-200. A partir do tubo 35 = BG50. A figura não mostra as frações além do tubo 35, que continham apenas a isoforma BG50.



Fonte: Autoria própria.

Figura 10. Perfil cromatográfico da solução bruta e concentrada por *salting-out* com sulfato de amônio produzida pelo fungo *M. thermophila* M.7.7. em coluna XK16 com Sephacryl – S200. Valores de absorbância proteica em 280 nm (linha preta) e atividade enzimática de β -glicosidase (linha azul), expressa como absorbância em 410 nm do produto p-nitrofenol.



Fonte: Autoria própria.

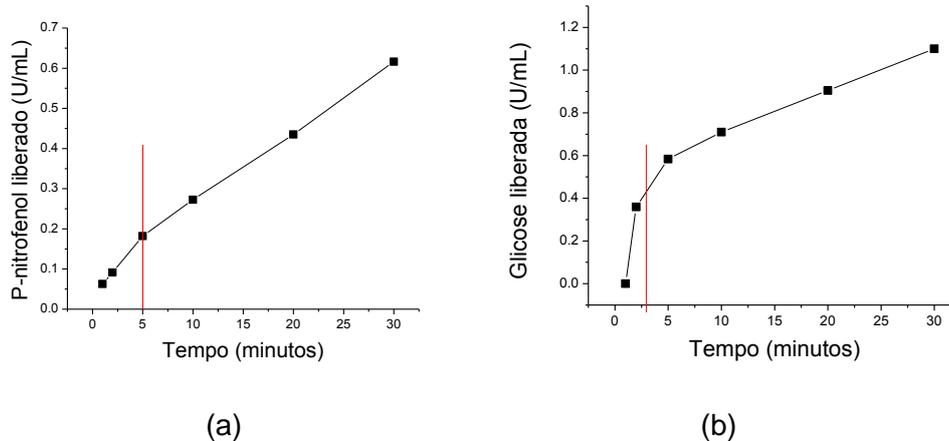
5.4 Caracterização da isoforma BG50

5.4.1 Teste de linearidade do tempo de incubação para determinação da taxa inicial de reação (V_0)

O tempo ideal máximo de reação para realizar o ensaio enzimático é o período durante o qual a linearidade da reta de $d[P]/d[t]$ é mantida constante, uma vez que as equações de cinética propostas por Michaelis e Menten e outros pesquisadores se baseiam na denominada taxa inicial de reação ou velocidade inicial, V_0 . Na figura 11 é possível observar que o tempo máximo para os ensaios foram de 5 minutos para pNPG e 3 minutos

para celobiose. Esses tempos de reação foram adotados para realizar os testes seguintes.

Figura 11. Determinação do tempo de incubação para os ensaios de cinética enzimática, representado pela linha vermelha. (a) para teste com pNPG e (b) para teste com celobiose.



Fonte: Autoria própria.

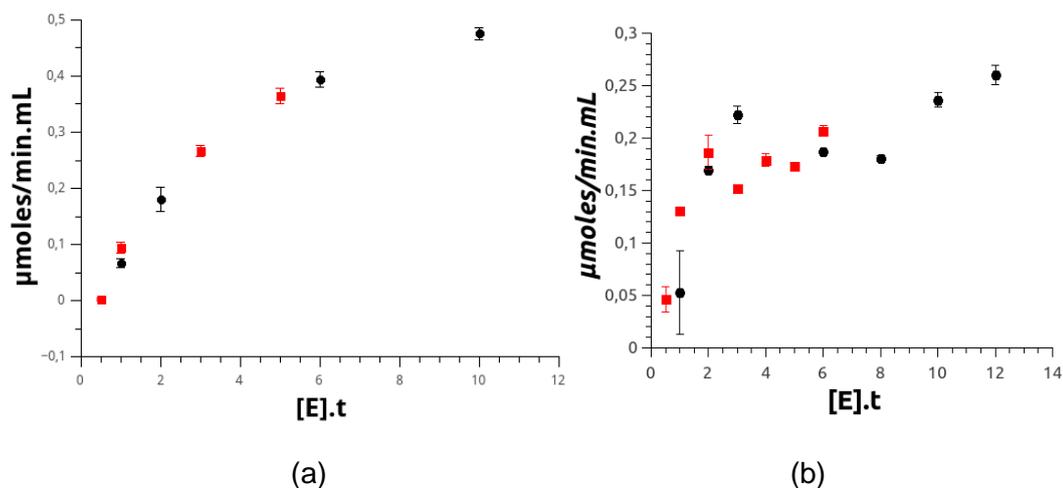
5.4.2 Teste de estabilidade de Selwyn

É conhecido que muitas enzimas são mais instáveis em baixas do que em altas concentrações. O teste de Selwyn (1965) detecta a inativação da enzima por efeito da diluição da mesma e permite descartar a perda de linearidade da liberação do produto com o tempo de incubação devido àquela causa. Assim, diluições diferentes da solução da enzima poderiam gerar soluções com diferentes graus de inativação. O gráfico $[P] \times [E].t$ permite detectar a inativação da enzima decorrente da sua diluição, onde curvas traçadas para diferentes concentrações de enzima mantendo-se a reação nas condições iniciais deverão ser sobreponíveis. Curvas distintas,

que não consigam ser sobrepostas, indicam que a enzima não se manteve estável no processo, sendo dependente da concentração de enzima utilizada (PINTO; MENEZES, 2009).

Os testes efetuados com a BG50 e pNPG mostraram sobreposição para os ensaios com ambos os substratos (Figura 12). No caso da celobiose há maior dispersão provavelmente por envolver dois procedimentos consecutivos sujeitos a maior variabilidade.

Figura 12. Teste de estabilidade de Selwyn (a) ensaio com pNPG (b) ensaio com celobiose.



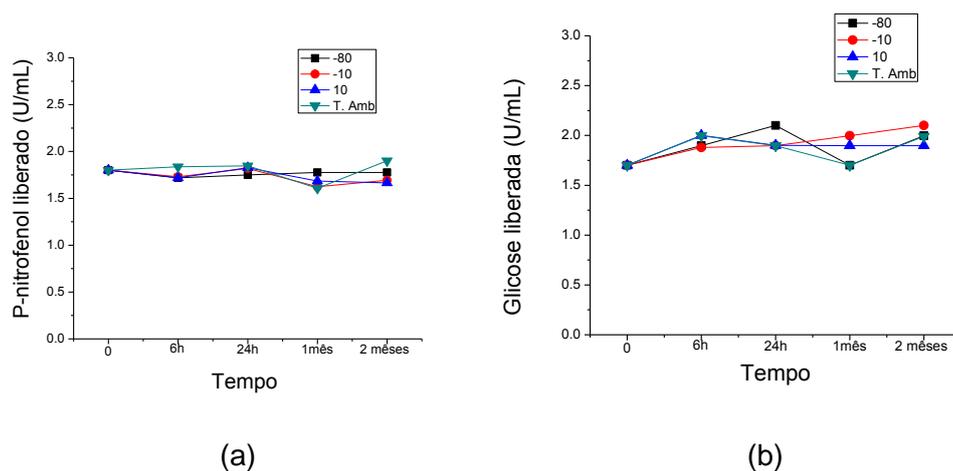
Fonte: Autoria própria.

5.4.3 Efeito da temperatura de conservação sobre a atividade da BG50

Um dos desafios em estudarmos enzimas e suas características é a variação de sua atividade durante o período o qual se mantém armazenada, uma das informações que pode determinar sua eventual aplicação em escala industrial, pois seria armazenada até sua utilização.

Portanto, estudou-se o comportamento da BG50 parcialmente purificada durante o armazenamento refrigerado e congelado até dois meses e foi observado um resultado muito interessante, pois a atividade enzimática se manteve estável durante dois meses em todas as condições a que foi submetida, inclusive quando mantida à temperatura ambiente em torno de 30 °C (Figura 13).

Figura 13 . Efeito da temperatura de estocagem da BG50 sobre a atividade enzimática. A atividade foi testada utilizando (a) pNPG como substrato (b) celobiose como substrato.



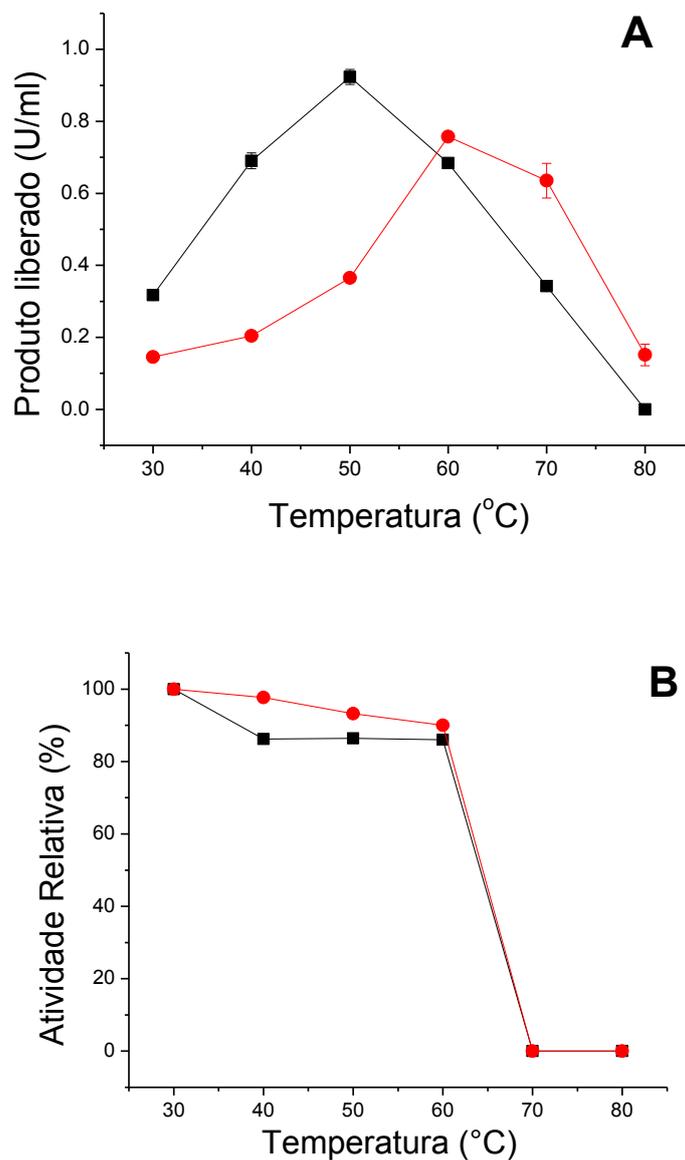
Fonte: Autoria própria.

5.4.4 Efeito do pH e temperatura sobre a atividade e estabilidade da BG50

A maioria das β -glicosidases fúngicas exibe temperaturas ótimas para atividade entre 40 e 50 °C (BHATIA; MISHRA; BISARIA, 2002). O perfil de atividade enzimática para a BG50 variando a temperatura do ensaio resultou em temperaturas ótimas de 60 e 50°C para pNPG e celobiose,

respectivamente (Figura 14 a). Quanto à termoestabilidade, a BG50 manteve-se estável após uma hora de incubação até 60°C na ausência de substratos (Figura 14 b). Segundo Shiraki *et al.* (2001) a alta rigidez das enzimas termofílicas decorrentes da estabilidade de enovelamento requer uma alta temperatura de atividade (em geral, maior que 40 °C) para promover uma movimentação térmica e o aumento da flexibilidade estrutural que é essencial para a catálise.

Figura 14 . Efeito da temperatura sobre a BG50 utilizando como substrato celobiose (■) e pNPG (●): (A) Variação da atividade da BG50 em diferentes valores de temperatura; (B) Atividade residual da BG50 quando incubada a diferentes temperaturas por 1 hora, na ausência de substrato. Nos gráficos são representados as médias (pontos) e desvios padrões (barras).

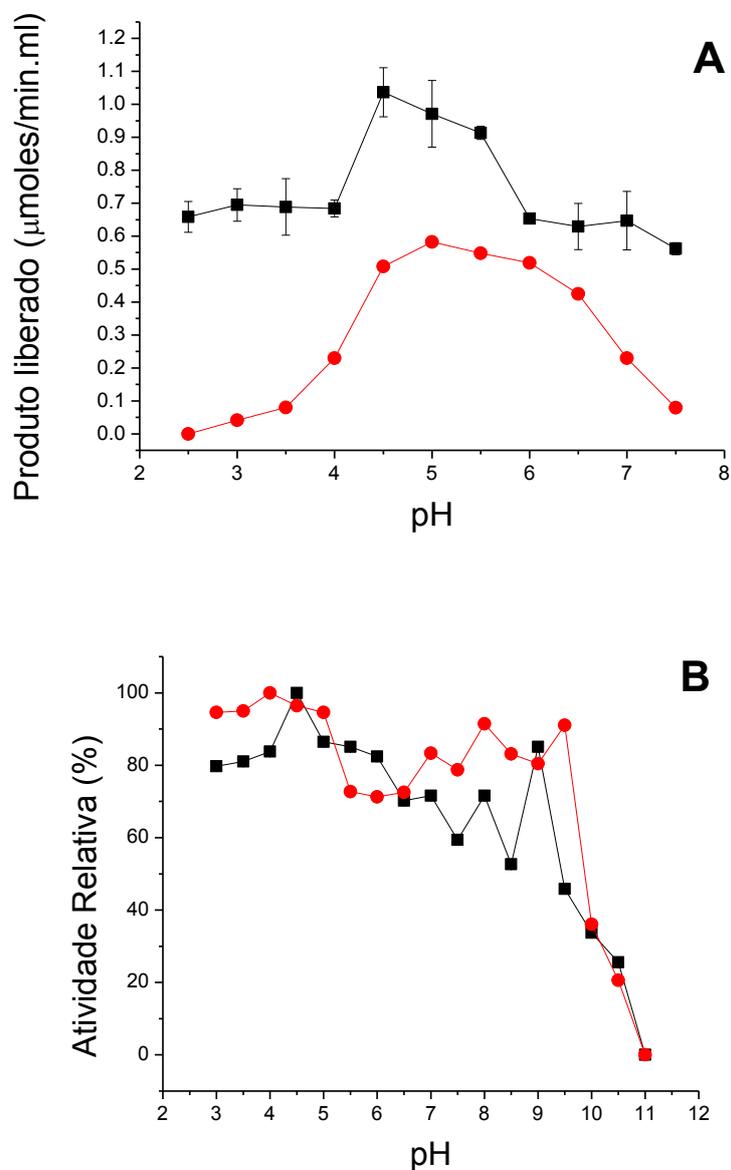


Fonte: Autoria própria.

No que se refere ao pH, encontra-se na literatura que as β -glicosidases fúngicas exibem valores ótimos de pH entre 4,0 e 6,0

(BHATIA, 2002). O pH ótimo da BG50 frente aos diferentes substratos foi pH 5 para pNPG e pH 4,5 para a celbiose (Figura 15).

Figura 15. Efeito do pH sobre a BG50 utilizando como substrato celbiose (▪) e pNPG (●): (A) Variação da atividade da BG50 em diferentes valores de pH; (B) Atividade residual da BG50 quando incubada a diferentes pHs por 24 horas à temperatura ambiente, na ausência de substrato. Nos gráficos são representados as médias (pontos) e desvios padrões (barras).



Fonte: Autoria própria.

5.4.5 Efeito de íons e reagentes sobre a atividade da BG50

A atividade enzimática foi inibida totalmente pelos íons Cu^{2+} e Fe^{2+} utilizando ambos os substratos (Tabela 3). Uma inibição significativa por Fe^{2+} e Cu^{2+} também foi observada para uma β -glicosidase produzida por *Thermoascus aurantiacus* em trabalho apresentado por Leite et al. (2007). Os metais pesados, como o Cu^{2+} , apresentam uma elevada afinidade pelos grupos tióis; geralmente estes íons oxidam os grupos funcionais dos resíduos de cisteína, e podem inibir a atividade enzimática de determinadas proteínas (HAYASHI, 1999).

O íon Zn^{2+} e o reagente DTT mostraram grandes diferenças no comportamento da enzima quando ensaiada nos diferentes substratos, onde utilizando celobiose observou-se a inibição total da enzima, enquanto que utilizando pNPG a inibição média foi de 37% e 17,5 %, respectivamente (Tabelas 3 e 4). Nenhum íon induziu elevação significativa de atividade enzimática. Os efeitos do Zinco e DTT exclusivamente sobre a enzima no ensaio com celobiose chamam a atenção, pois tem origem por interferência no ensaio propriamente dito.

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

Tabela 3. Efeito de íons sobre a atividade enzimática da BG50. (*) diferenças significantes ($p < 0,05$) no teste t de Student.

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

Fonte: Autoria própria.

Embora nenhum dos cátions divalentes testados tenha elevado significativamente a atividade da BG50 (Tabela 3), a diminuição da atividade promovida pelo sequestrante EDTA (Tabela 4) sugere a necessidade de algum íon metálico divalente para a ação da enzima.

Tabela 4. Efeito de reagentes sobre a atividade enzimática da BG50. (*) diferenças significantes ($p < 0,05$) no teste t de Student.

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

Fonte: Autoria própria.

5.5. Determinação dos parâmetros cinéticos

Os resultados dos testes de cinética enzimática foram representados em dois programas gráficos: Origin 8 (OriginLab Corporation) e SciDavis 1.D005 (2014). Ambos foram também utilizados para realizar a estimativa da Taxa máxima de reação ($V_{m\acute{a}x}$) e K_m (Constante de Michaelis) através de regressão não linear, um método mais adequado do que a popular

linearização de Lineweaver-Burk (MASON; LAI, 2000; HELFGOTT; SEIER, 2007). Os métodos de linearização assumem linearidade, variância constante e erros com distribuição normal, o que frequentemente não ocorre ou o operador desconhece a validade dessas premissas (HELFGOTT; MOORE, 2011).

Os valores de $V_{\text{máx}}$ e K_m obtidos por meio dos gráficos de Michaelis-Menten para a BG50 utilizando pNPG como substrato (Figura 16) foram, respectivamente, para a reação sem inibidor de $0,42 \pm 0,01 \mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ e $0,52 \pm 0,07 \text{ mM}$ e com inibidor, de $0,45 \pm 0,02 \mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ e $3,27 \pm 0,49 \text{ mM}$ (Figura 16), confirmando, na margem de erro, que o parâmetro cinético afetado pela presença de glicose é a constante K_m , o que seria típico de uma inibição competitiva, quando o inibidor tem estrutura química semelhante à do substrato, podendo ocupar também o sítio ativo, porém de forma não produtiva.

A partir desses dados foi possível também obter a constante de inibição $K_i=1,5 \text{ mM}$. Segundo estudos realizados por Roy et. al. (1989) a glicose apresenta forte poder de inibição competitiva sobre a β -glicosidase de *M. thermophila*, obtendo o valor de K_i para a glicose igual a $22,5 \text{ mM}$. Valores de K_i para β -glicosidase de outros microrganismos chegam a até 1.360 mM (RIOU et al.,1998). Foram relatados valores cinéticos da β -glicosidase de *Myceliophthora thermophila*, expressa quando o gene *bgl3a* foi clonado em *Pichia pastoris* de $V_{\text{máx}}=100,66 \mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$, $K_m=7,62 \text{ mM}$ e $K_i=0,28 \text{ mM}$ (KARNAOURI et al., 2013).

Os valores de $V_{\text{máx}}$ e K_m obtidos por meio dos gráficos de Michaelis-Menten para a BG50 utilizando celobiose como substrato (Figura 17) foram, respectivamente, de $2,55 \pm 0,09 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ e $8,50 \pm 1,03 \text{ mM}$. A quantificação do produto liberado da atividade enzimática com a presença do inibidor (glicose) não foi eficiente, pois o produto quantificado é a própria glicose, uma vez que os valores quantificados não tiveram alterações significativas nas diferentes reações. Portanto, a adição da glicose interferiu no ensaio, impossibilitando a comparação dos valores cinéticos sem e com a adição do inibidor.

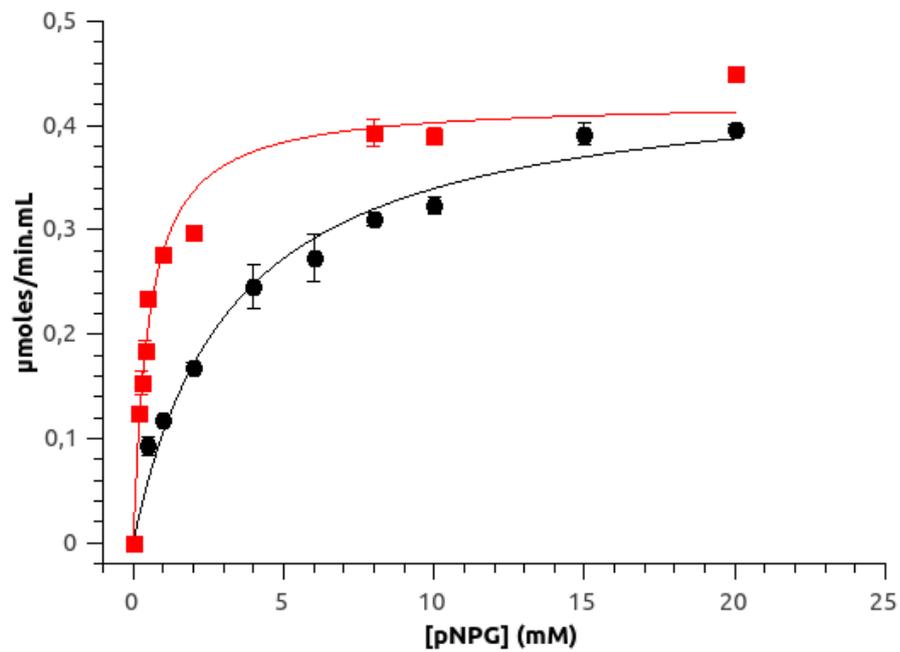
Os valores cinéticos obtidos mostram que a BG50 tem um K_m muito menor pelo substrato sintético do que para o substrato natural. A rigor não podemos afirmar se a afinidade por ambos os substratos é tão diferente, pois para isso deveríamos ter calculado a k_2 ou k_{cat} para estimarmos a influência desse parâmetro sobre a constante de dissociação, porém não conseguimos a enzima totalmente pura e portanto não temos $[\text{Et}]$, a concentração molar da enzima.

Na maioria dos casos as β -glicosidases mostram alta atividade catalítica e alta afinidade com o substrato artificial pNPG e MUG (metilo umbeliferil beta-D-glicosídeo), mas não com a celobiose (NAM, 2010). Riou et al. (1998) estudaram a β -glicosidase de *Aspergillus oryzae*, que apresentou valores de K_m diferentes para os substratos pNPG (0,55 mM) e celobiose (7 mM), evidenciando uma afinidade maior da enzima com o substrato artificial, o que também foi observado para a β -glicosidase de *Trichoderma reesei* 0,18mM (pNPG) e 2,1mM (celobiose); *Aspergillus*

niger 0,57mM (pNPG) e 0,88mM (celobiose) (CHAUVE et al.,2010); *Aspergillus niger* 7,5mM (pNPG) e 50mM (celobiose) (YAN; LIN; LIN, 1998) e *Humicola insolens* 0,16mM (pNPG) e 0,51mM (celobiose) (SOUZA et al., 2010). Roy et al. (1989) determinaram K_m de 4,5 mM para β -glicosidase produzida por *Myceliophthora thermophila* com pNPG como substrato.

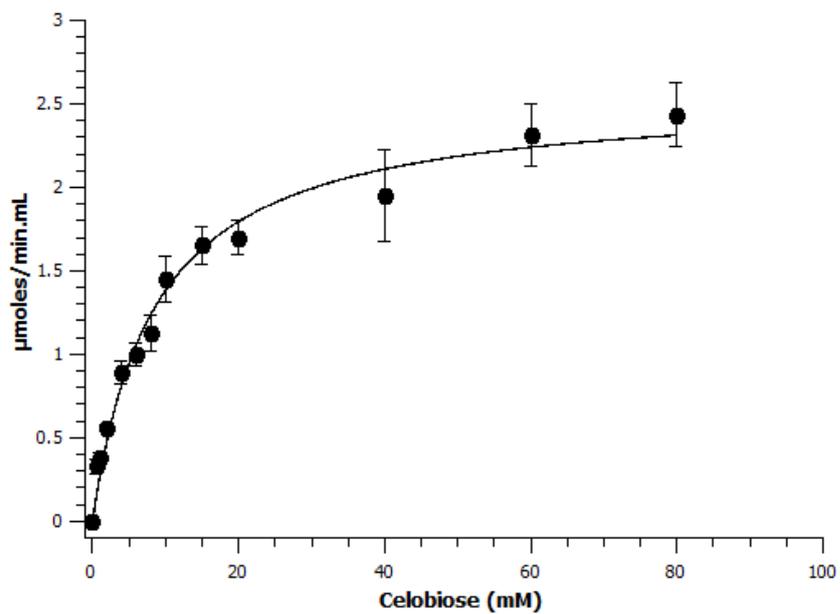
A cinética da β -glicosidase depende da configuração do seu substrato e a celobiose requer uma mudança conformacional para a catálise. A β -glicosidase tem uma estrutura muito rígida no sítio S1 do substrato de ligação que irá acomodar a glicose da celobiose, mas a segunda glicose da celobiose irá alterar a conformação de rotação de forma a encaixar no sítio de ligação do substrato (NAM; SUNG; HWANG, 2010). Segundo Singhania et al. (2013) esta é a razão por trás de uma menor eficiência de β -glicosidases para celobiose do que para o substrato sintético (pNPG). A glicose liberada, por sua vez, também pode exercer inibição da enzima.

Figura 16. Curva de Michaelis-Menten da BG50 utilizando como substrato o pNPG na presença (preto) e na ausência (vermelho) de glicose.



Fonte: Autoria própria.

Figura 17. Curva de Michaelis-Menten da BG50 utilizando como substrato a celobiose.

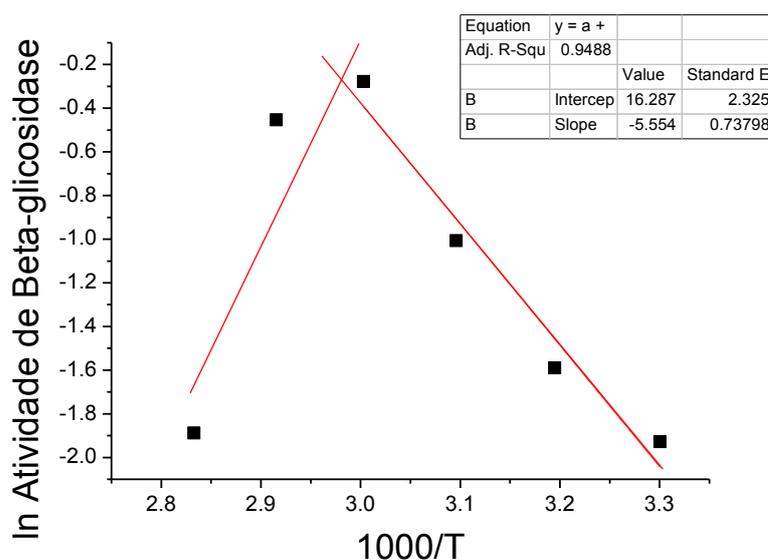


Fonte: Autoria própria.

5.6 Termodinâmica da desnaturação térmica irreversível

Foi possível estimar a temperatura ótima (62,6°C) e a energia de ativação da BG50 (E_a) (46,18 kJ.mol⁻¹) por meio da curva de Arrhenius representada na figura 18. O coeficiente de temperatura (Q_{10}), que representa o aumento da velocidade a cada 10 graus de elevação da temperatura, também foi estimado em diferentes temperaturas (Tabela 5). A energia de ativação da BG50 foi três vezes maior do que a encontrada para a β -glicosidase de *Aspergillus fumigatus* (14,82 kJ.mol⁻¹) (DAS et. al., 2015) indicando que deve superar uma barreira energética muito maior para hidrolisar o substrato, por outro lado encontra-se também energia de ativação mais alta, como para a β -glicosidase de *Fusarium solani* (53,31 kJ.mol⁻¹) (BHATTI; BATOOL; AFZAL, 2013).

Figura 18. Gráfico de Arrhenius para o cálculo da energia de ativação (E_a) e temperatura ótima da BG50. No gráfico são representados as médias (pontos).



Fonte: Autoria própria.

Tabela 5. Coeficiente de temperatura (Q_{10}) estimados com base no Gráfico de Arrhenius.

Temp (°C)	Temp (K)	Q_{10}
30	303	1,83
40	313	1,76
50	323	1,70
60	333	1,65
70	343	1,60

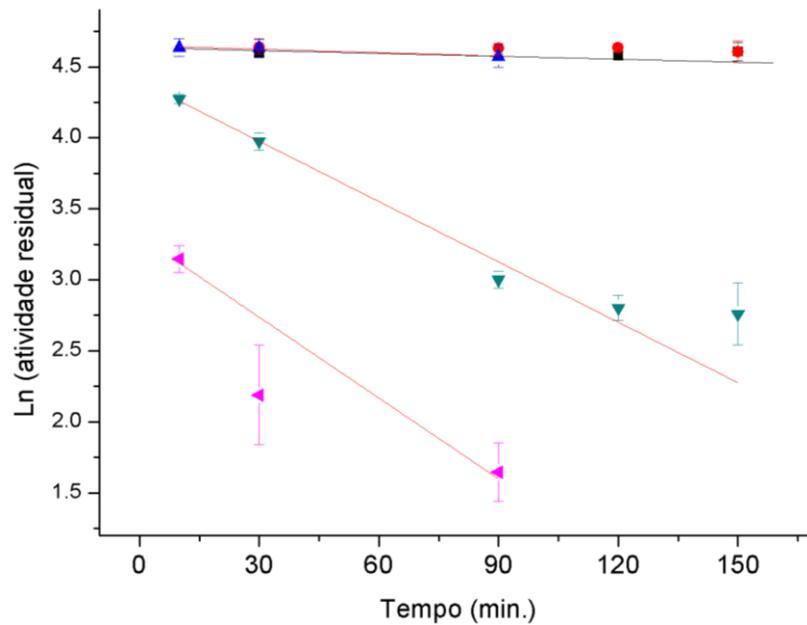
Fonte: Autoria própria.

Os valores de Q_{10} (Tabela 5) mostram um decréscimo conforme aumenta a temperatura, decorrente da desnaturação térmica. Já a figura 19 mostra que a transição irreversível entre o estado nativo e desnaturado ocorreu em uma faixa estreita de temperatura.

A figura 19 mostra o efeito do tempo de incubação em diferentes temperaturas (60, 63 e 65°C) na atividade da BG50. A partir do gráfico de Arrhenius de primeira ordem (Figura 20) permitiu-se o cálculo da energia de ativação da desnaturação térmica (E_{ad}) da BG50: 614,7 kJ.mol⁻¹. Os demais parâmetros termodinâmicos encontram-se na tabela 6.

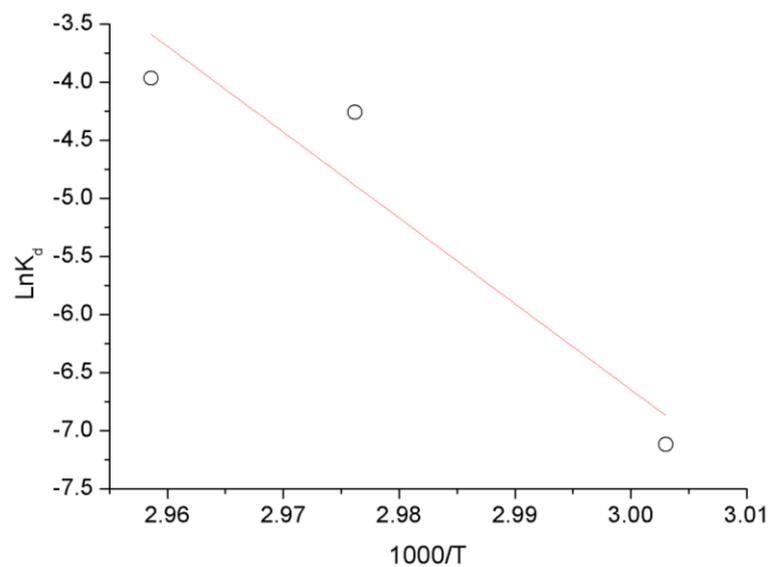
O parâmetro que melhor indica a energia necessária para mudar a conformação da enzima é a energia de ativação para desnaturação (E_{ad}), representando a barreira energética necessária para levar a enzima de um estado nativo para o estado desnaturado (SAQUIB et al, 2010). Comparando com as β -glicosidases dos fungos *Aspergillus fumigatus* (48,80 kJ.mol⁻¹) (DAS et. al., 2015), *Thermoascus aurantiacus* (414 kJ.mol⁻¹) e *Aureobasidium pullulans* (537 kJ.mol⁻¹) (LEITE et al., 2007) a estabilidade conformacional da BG50 é maior.

Figura 19. Gráfico de primeira ordem do efeito da temperatura na atividade da BG50: 60 °C (▲); 63 °C (▼) e 65 °C (◄). No gráfico são representados as médias (pontos) e desvios padrões (linhas verticais).



Fonte: Autoria própria.

Figura 20. Gráfico de Arrhenius de primeira ordem para o cálculo da energia de ativação da desnaturação térmica (E_a) da BG50.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 6. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos da termoinativação irreversível.

Temperatura (°C)	Temperatura (K)	k_d (min. ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min.)	ΔH_d (kJ.mol ⁻¹)	ΔG_d (kJ.mol ⁻¹)	ΔS_d (J.mol.K ⁻¹)
60	328	0,00081	855,6	2,154	101,58	-311,5
63	333	0,01417	48,9	2,179	94,52	-287,8
65	338	0,01897	36,5	2,196	94,28	-285,4

Fonte: Autoria própria.

O tempo de meia vida da BG50 a 60°C é bastante alto comparado com as outras temperaturas testadas, representando uma alta estabilidade estrutural quando mantida a essa temperatura. Em comparação com os resultados encontrados na literatura, o tempo de meia-vida da BG50 é muito menor, onde para a β -glicosidase do fungo *Fusarium solani* (BHATTI; BATOOL; AFZAL, 2013) a 65 °C o tempo de meia vida é 159 minutos, já para a β -glicosidase de *Aureobasidium pullulans* encontra-se tempo de meia vida de 90 min. em 80 °C e para *Thermoascus aurantiacus* de 30 min. em 80 °C (LEITE et al., 2007).

O valor do ΔH_d aponta a quantidade de ligações não covalentes que foram quebradas durante o processo de desnaturação proteica. Logo, quanto maior for o ΔH_d , maior será o número de ligações não covalentes presentes na molécula de proteína. Os valores de ΔH_d para a BG50 são inferiores em relação ao encontrado para *Fusarium solani* (50 kJ.mol⁻¹) (BHATTI; BATOOL; AFZAL, 2013) *Aureobasidium pullulans* (534 kJ.mol⁻¹) e *Thermoascus aurantiacus* (411 kJ.mol⁻¹) (LEITE, 2007).

O valor de ΔG_d está intimamente relacionado com a estabilidade da proteína, quanto maior for o ΔG_d , maior será a estabilidade da enzima (LONGO; COMBES, 1999), e isso dependerá da temperatura. Portanto, a BG50 mostra maior estabilidade em 60°C, como pode ser observado na tabela 6, a BG50 apresentou maior ΔG_d em 60°C e a sua desestabilização acompanhou o aumento da temperatura. Os resultados obtidos para a BG50 indicam que a 65°C, grande parte da organização estrutural já foi destruída. Corroborando com o que podemos observar na figura 13, onde a 70°C a BG50 já não apresentou nenhuma atividade.

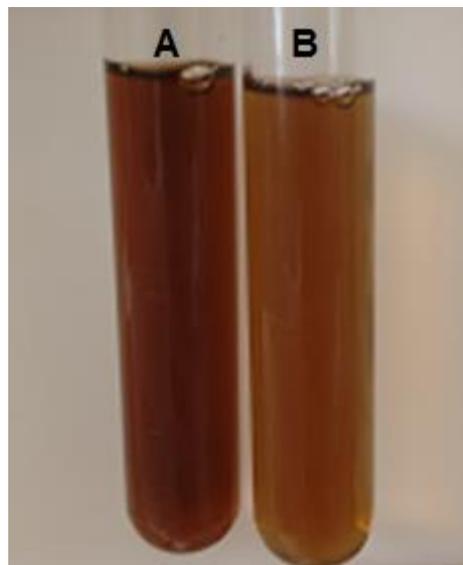
A variação negativa da entropia de desnaturação a 65°C foi de -285,4 J.mol.K⁻¹ inferior ao resultado de Bhatti et al. (2013) para a β -glicosidase de *Fusarium solani*, na faixa de -176 J.mol.K⁻¹. Baixos valores de ΔS_d sugerem a exposição de cadeias laterais apolares, causando ordenamento das moléculas de água na forma de clatratos ou “gaiolas” (SIDDIQUI et al., 1997).

Os parâmetros termodinâmicos para a β -glicosidase produzida pelo microrganismo mesofílico *Aureobasidium pullulans* (LEITE et al., 2007) foram avaliados para 80°C, mostrando ser mais resistente a inativação térmica do que a BG50 produzida pelo fungo termofílico deste trabalho. Portanto, demonstra-se que a complexa compreensão da termoestabilidade enzimática não está somente associado à termofilia do organismo.

5.7 Clarificação do extrato enzimático com carvão ativado

O teste com carvão ativado evidenciou uma sutil clarificação da amostra bruta (Figura 21). A retirada de compostos pigmentados e até inibidores por carvão ativado é conhecida por ser eficaz e ter elevada capacidade de adsorção de compostos sem afetar a solução enzimática (CANILHA et. al., 2008), embora em alguns casos a enzima possa ser adsorvida ao carvão ativado. Em relação à atividade enzimática, o teste não apresentou diminuição na quantificação da enzima, evidenciando a não interferência negativa desse procedimento de clarificação.

Figura 21. (A) Amostra bruta (B) Amostra bruta após filtração com carvão ativado.



Fonte: Autoria própria.

5.8 Teste piloto para estabelecer as condições de adsorção e eluição da B50 em resina Q-Sepharose

O teste piloto para estabelecer a adsorção da enzima na resina Q-Sepharose mostrou um pH de ligação de 7,5 (Tabela 7), determinando que pHs mais baixos não adsorvem totalmente a enzima na resina e acima desse valor a enzima também é adsorvida, porém com maior interação entre a resina e a enzima, levando posteriormente à utilização de maiores concentrações de sal para a sua eluição. Após a adsorção em pH 7,5 a concentração de sal ideal para a eluição total da enzima da resina foi de 0,2 Molar (Tabela 8). A partir desses resultados foram determinadas as condições para a aplicação da amostra na resina Q-Sepharose.

Tabela 7. Valores de absorbância do ensaio enzimático utilizando pNPG em diferentes pHs para a adsorção da BG50 na resina Q-Sepharose.(ND: não detectado).

pH	Abs
6,0	0,382
6,5	0,361
7,0	0,188
7,5	ND
8,0	ND
8,5	ND

Fonte: Autoria própria.

Tabela 8. Valores de absorvância do ensaio enzimático utilizando pNPG em diferentes concentrações de sal para a eluição da BG50 na resina Q-Sepharose.

NaCl (M)	Abs
0,02	0,009
0,04	0,005
0,06	0,026
0,08	0,052
0,1	0,187
0,2	0,407
0,3	0,394
0,4	0,424
0,5	0,389
0,6	0,414

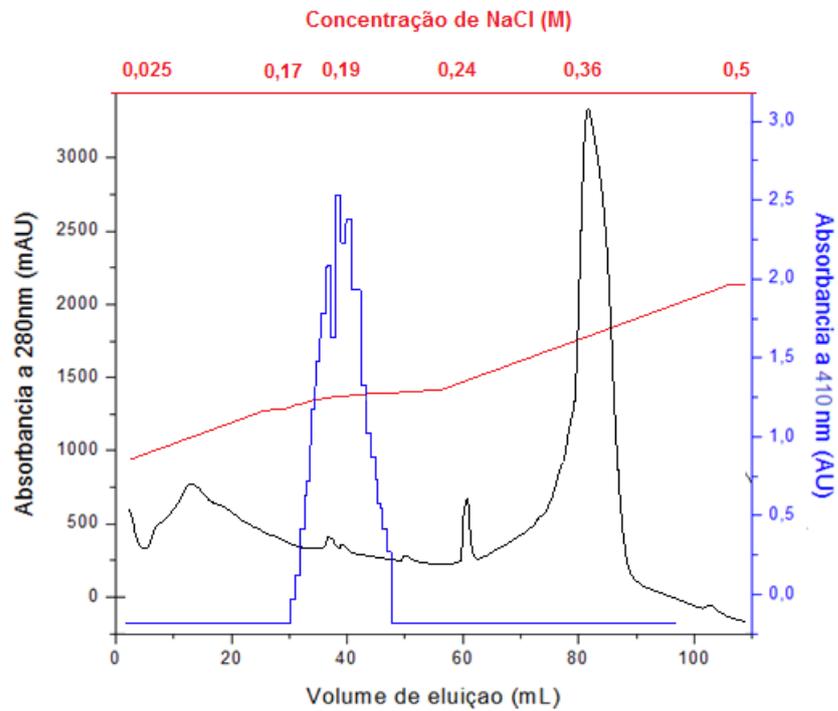
Fonte: Autoria própria.

5.9 Cromatografia de troca iônica (Q - Sepharose)

O perfil cromatográfico da troca iônica realizada está ilustrada pela figura 22, onde é possível observar pela atividade enzimática (linha azul) a eluição da BG50 a partir da adição progressiva (não linear) de 0,17 M de NaCl (linha vermelha) sendo ainda mais acentuada a partir da adição de 0,19 M do sal. A eliminação de proteínas indesejadas na amostra por essa metodologia foi evidenciada por gel SDS-PAGE (Figura 23).

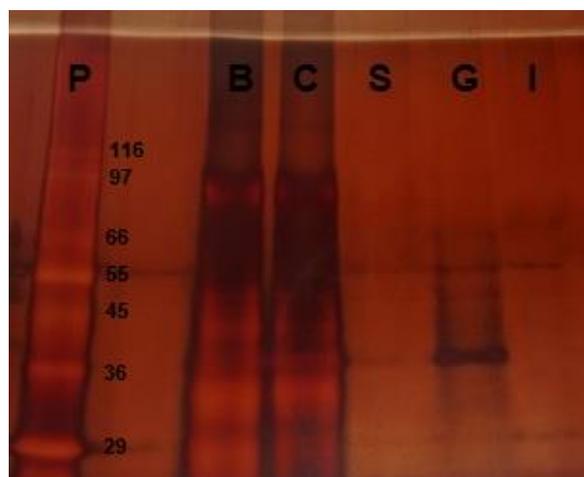
Após a cromatografia de troca iônica foi montada uma tabela de purificação a partir de todas as etapas realizadas, informando a eficiência e rendimento de cada etapa (Tabela 9).

Figura 22. Perfil cromatográfico da amostra selecionada após gel filtração em coluna XK16 com Q-Sepharose. Valores de absorbância proteica em 280 nm (linha preta), atividade enzimática de β -glicosidase (linha azul) e concentração salina (linha vermelha).



Fonte: Autoria própria.

Figura 23. Gel de poliacrilamida 10% em condições desnaturantes, corado com nitrato de prata. **P:** Padrão de massa molecular de proteína, **B:** solução enzimática bruta, **C:** solução enzimática após filtração com carvão ativado, **S:** amostra após precipitação salina, **G:** amostra após filtração em gel, **I:** amostra após troca iônica.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 9. Etapas da purificação parcial da β -glicosidase BG50 do fungo termofílico *Myceliophthora thermofila* M.7.7.

Etapas de purificação	Volume (mL)	Proteínas totais (mg)	Unidades totais (U)	Atividade Específica (U/mg)	Rendimento (%)	Fator de purificação
Bruta	10	28,3	50,1	1,7	100,0	1,0
Carvão Ativado	10	22,9	56,3	2,4	112,4	1,3
Precipitação salina	1	7,4	27,8	3,7	55,5	2,1
Filtração em gel	18	0,6	12,5	19,7	25,1	11,2
Troca Iônica	21	0,6	7,9	12,7	15,8	7,2

Fonte: Autoria própria.

Observa-se, na Tabela 9, um grau de purificação significativo até a filtração em gel, porém a queda da atividade verificada após a cromatografia de troca iônica afetou o cálculo do fator de purificação. Não tivemos tempo de testar outras abordagens que permitissem chegar à forma pura, o que permitiria a realização de outros experimentos.

5.10 Teste de inibição por compostos fenólicos

O teste para avaliação dos efeitos dos compostos fenólicos sobre a BG50 foi realizado após a amostra passar pela etapa de cromatografia de troca iônica, os resultados são mostrados na tabela 10.

Tabela 10. Efeito de fenóis sobre a atividade enzimática da BG50 com os substratos pNPG e celobiose, medida como atividade residual % (média e desvio padrão).

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

Fonte: Autoria própria.

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

Os fenóis são inibidores importantes para a hidrólise de glicanos, celobiose e para combinações enzimáticas (XIMENES et. al., 2010). Dentre os fenóis liberados na hidrólise do material lignocelulósico, Ximenes e colaboradores (2010) confirmaram que a Vanilina, Siringaldeído e o Ácido Hidroxibenzóico inibem significativamente celulasas, especialmente β -glicosidases.

O resultado do atual trabalho mostra uma ampla resistência da BG50 a vários compostos fenólicos, mostrando ser uma enzima com alto potencial de aplicação na hidrólise de materiais lignocelulósicos que liberam esses derivados fenólicos. Os efeitos de fenóis em β -glicosidases a partir de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* foram comparados por Ximenes e colaboradores (2011) onde, além da celobiose o pNPG foi também utilizado como um substrato para medir a atividade de β -glicosidase. O Ácido Tânico teve pouco efeito sobre a β -glicosidase numa preparação comercial de *Aspergillus niger*, ao passo que quase inibiu completamente a hidrólise de pNPG. Para os outros fenóis testados somente o Ácido Gálico inibiu a β -glicosidase de *Trichoderma reesei* para a atividade medida com pNPG. Ximenes e colaboradores (2011) concluíram que a β -glicosidase de *Trichoderma reesei* é mais suscetível a inibição do que a β -glicosidase de *Aspergillus niger*.

6. CONCLUSÕES

- A purificação parcial da BG50 apresentou um grau de purificação significativo até a filtração em gel, porém a queda da atividade verificada após a cromatografia de troca iônica afetou o cálculo do fator de purificação, por outro lado, apenas com a filtração em gel já foi possível a obtenção da enzima separada para o estudo.
- A BG50 produzida pelo fungo *Myceliophthora thermophila* mostrou elevada estabilidade em relação à temperatura de conservação, e uma ampla tolerância à presença de íons;
- A caracterização bioquímica da BG50 enfatiza a importância de investigar potencialidades de β -glicosidases baseadas no substrato natural, uma vez que terão de lidar com celobiose no processo natural, e os valores cinéticos obtidos com o pNPG são bastante diferentes;
- Os parâmetros cinéticos indicaram inibição competitiva da glicose sobre a BG50 utilizando o substrato pNPG.
- Os parâmetros termodinâmicos mostraram que a BG50 é bastante estável a 60°C, porém com uma baixa variação na temperatura a sua conformação é alterada e passa do seu estado nativo para um estado de desnaturação.
- A enzima não foi inibida significativamente quando testada na presença de nove compostos fenólicos eventualmente presentes em biomassa lignocelulósica pré-tratada, o que constitui um aspecto relevante.

7. REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins:** fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Ed. da UFV: Viçosa.
- ALMEIDA, M.S.; KURTENBACH, E. Como purificar proteínas? **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 24, p. 30-35, 2002.
- ANDERSEN, N. **Enzymatic hydrolysis of cellulose:** experimental and modeling studies. Tese (Doutorado) - BioCentrum-DTU, Technical University of Denmark, Denmark, 2007.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos:** teoria e prática. Viçosa-Ed. da UFV, p. 335, 1995.
- BADHAN, A. CHADHA, B.S.; KAUR, J.; SAINI, H.S.; BHAT, M.K. Role of transglycosylation products in the expression of multiple xylanases in *Myceliophthora sp.* IMI 387099. **Current Microbiology**, New York. v. 54, p. 405–409, 2007.
- BARBAGALLO, R.N. SPAGNA, G.; PALMERI, R.; RESTUCCIA, C.; GIUDICI, P. Selection, characterization and comparison of β -glucosidase from mould and yeast employable for enological applications. **Enzyme and Microbial Technology:** biotechnology research and reviews, Philadelphia, v. 35, p. 58-66, 2004.
- BARROS, R. M. et al. Quantitative studies on the enzymatic hydrolysis of milk proteins brought about by cardosins precipitated by ammonium sulfate. **Enzyme and Microbial Technology:** biotechnology research and reviews, Philadelphia, v. 29, p. 541–547, 2001.
- BASTOS, V. D. Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 25, p. 5-38, 2007.
- BENLIAN, L. U.; B.; AIRONG, X. U. A.; JIANJI, W. Cation does matter: how cationic structure affects the dissolution of cellulose in ionic liquids. **Green Chemistry**, Cambridge, v.16, n.3, p. 1326-1335, 2014.
- BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial β -glucosidases: cloning, properties, and applications. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, New York, v. 22, n. 4, p. 375-407, 2002.
- BHATTI, H. N.; BATOOL, S.; AFZAL, N. Production and characterization of a novel β -glucosidase from *Fusarium solani*. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 15, p. 140–144, 2013.
- BRUINS, M. E.; JANSSEN, A. E. M.; BOOM, R. M. Thermozyms and their applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 90, p. 155 – 181, 2001.
- BUGG, T. **Introduction to enzyme and coenzyme chemistry.** 2nd. Ed. Blackwell Publishing, Oxford, 2004.
- CAIRNS, J. R. K.; ESEN, A. β -glucosidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 67, p. 3389–3405, 2010.
- CANILHA, L.; CARVALHO, W.; FELIPE, M. D. G. A.; ALMEIDA E SILVA, J. B. DE. Xylitol production from wheat straw hemicellulosic hydrolysate: hydrolysate detoxification and carbon source used for inoculum

preparation. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 333-336, 2008.

CHAUVE, M. et al. Comparative kinetic analysis of two fungal β -glucosidases. **Biotechnology for Biofuels**, v.3, p. 1–8, 2010.

COBOS, A.; ESTRADA, P. Effect of polyhydroxylic cosolvents on the thermostability and activity of xylanase from *Trichoderma reesei* QM 9414. **Enzyme and Microbial Technology**: biotechnology research and reviews, Philadelphia, v.33, p. 810-818, 2003.

COOPER, A. Thermodynamic analysis of biomolecular interactions. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 3, n.5, p. 557-563, 1999.

CORREIA, R. T. P.; MCCUEB P.; MAGALHÃES M.M.A.; MACEDO G.R.; SHETTY K. Production of phenolic antioxidants by the solid-state bioconversion of pineapple waste mixed with soy flour using *Rhizopus oligosporus*. **Process Biochemistry**, London, v. 39, p. 2167-2172, 2004.

DAS, A.; PAUL, T.; GHOSH, P.; HALDER, S. K.; MOHAPATRA, P. K. D.; PATI, B. R. P.; MONDAL, K. C. Kinetic study of a glucose tolerant beta-glucosidase form *Aspergillus fumigatus* ABK9 entrapped into alginate beads. **Waste and Biomass Valorization**, Dordrecht, v. 6, p. 53-61, 2015.

DA-SILVA, R.; GOMES, E.; FRANCO C. M. L. Pectinases, hemicelulases e celulasas substrato, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, p. 249-250, 1997.

DIAS, M. O. S. et al. Second generation ethanol in Brazil: can it compete with electricity production? **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 19, p. 8964–8971, 2011.

EYZAGUIRRE, J.; HIDALGO, M.; LESCHOT, A. **Handbook of carbohydrate engineering**. Ed. Kevin J. Yarema, London, 2005.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; TAMALAMPUDI, S. Bioenergy: sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 44, p. 2–12, 2009.

GOMES, J.; TERLER, K.; KRATZER, R.; KAINZ, E.; STEINER, W. Production of thermostable β -mannosidase by a strain of *Thermoascus aurantiacus*: isolation, partial purification and characterization of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**: biotechnology research and reviews, Philadelphia, v. 40, p. 969–975, 2007.

GOMEZ, C. H. R. J. **Sacarificação da hemicelulose do bagaço de cana de açúcar e sua fermentação por *Pachysolen tannophilus***. Tese (Doutorado em Ciências do Alimento) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1985.

GONÇALVES, D. **Produção de álcool combustível a partir de hidrolizados enzimáticos de bagaço de cana-de-açúcar por leveduras industriais e leveduras fermentadoras de xilose**. Dissertação (Mestre em Biotecnologia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A.Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by

solid-state fermentation: application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 144, p. 1-22, 2007.

GUEGUEN, Y.; CHEMARDIN, P.; PIEN, S.; ARNAUD, A.; GALZY, P. Enhancement of aromatic quality of muscat wine by the use of immobilized β -glucosidase. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 55, p. 151-156, 1997.

HAMELINK, C. N.; HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno- economic performance in short-, middle- and long- term. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 28, p. 384- 410, 2005.

HAYASHI, S.; SAKO, S.; YOKOI, H.; TAKASAKI, Y.; IMADA, K. Purification and characterization of the intracellular β -glucosidase from *Aureobasidium sp* ATCC 20524. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 22, p. 160-163, 1999.

HELFGOTT, M.; MOORE, D. **Introductory calculus for the natural sciences**. Ed. CreateSpace, [s.l], 2011.

HELFGOTT, M.; SEIER, E. Some mathematical and statistical aspects of enzyme kinetics. **Journal of Online Mathematics and its Applications**. v. 7, p. 1-34, [s.l], 2007.

HERNÁNDEZ, L. F.; ESPINOSA, J.C.; FERNÁNDEZ-GONZÁLES, M.; BRIONES, A. β -glucosidase activity in *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 80, p. 171-176, 2003.

HO, P. L.; KITAHARA, E.; OGAWA, D.M.O.; SILVA, A.R.B.P.; RAMOS, C.R.R.; NASCIMENTO, A.L.T.O. A arte de purificar proteínas. **Biociência**, Brasília v. 13, p. 24-26, 2000.

HOUNSELL, E. F. **HPLC of small molecules**. Ed. Lim C.K., 1986.

JEFFRIES, T. W.; JIN, Y. S. Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts . **Advances in Applied Microbiology**, Maryland Heights, v. 47, p. 221-268, 2000.

KARNAOURI, A.; TOPAKAS, E.; PASCHOS, T.; TAOUKI, I.; CHRISTAKOPOULOS, P. Cloning, expression and characterization of an ethanol tolerant GH3 β -glucosidase from *Myceliophthora thermophila*, **PeerJ**, v.46, 2013.

KARNCHANATAT, A. et al. Purification and biochemical characterization of an extracellular β -glucosidase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.:Fr.) Rehm. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 270, n. 1, p. 162–170, 2007.

KARP, A.; SHIELD, I. Bioenergy from plants and the sustainable yield challenge. **New Phytologist**, Cambridge, v. 179, p. 15–32, 2008.

KWON, K.; LEE, J.; KANG, G. Detection of β -glucosidase activity in polyacrylamide gels with esculin as substrate. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 12, p. 4584–4586, 1994.

LEITE, R. S. R. et al. Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology: biotechnology research and reviews**, Philadelphia, v. 43, n. 6, p. 391–395, 2008.

LEITE, R. S. R.; BOCCHINI, D.A., MARTINS, E.S., SILVA, D., GOMES, E., SILVA, R. Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aureobasidium pulluans* solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v.137, p. 281-288, 2007.

LIMA, M. A. de. **Caracterização bioquímica e biofísica da enzima beta-glicosidase Bgl1 de *Aspergillus niger* e avaliação de potenciais biomassas para produção de bioetanol**. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. São Carlos, 2013.

LIU, L. et al. Investigation of α -glucosidase inhibitory activity of wheat bran and germ. **Food Chemistry**, London, v. 126, n. 2, p. 553–561, 2011.

LONGO, M. A.; COMBES, D. Thermostability of modified enzymes: a detailed study. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Chichester, v. 74, p. 25-32,1999.

LOWRY, O. H. ROBSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. A repair method for quantifying small amounts of protein. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.193, p. 193-265, 1959.

LU, B.; XU, A.; WANG, J. Cation does matter: how cationic structure affects the dissolution of cellulose in ionic liquids. **Green Chemistry**, Cambridge, v. 16, p. 1326-1335, 2014.

LUCARINI, A. C.; KILIKIAN, B. V.; PESSOA, A. Precipitação. In: **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri, Manole, cap. 5, p. 89-113, 2005.

MADIGAN, M. T.; OREN, A. Thermophilic and halophilic extremophiles. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 2, n. 3, p. 265–269, 1999.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BATH, M.K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 64, p. 461-488, 2000.

MARANGONI, A. G. **Enzyme kinetics: a practical approach**. Wiley-Interscience. New Jersey, 2003.

MASON, G. F.; LAI, J. C. K. Non-linear determination of Michaelis-Menten kinetics with model evaluation through estimation of uncertainties. **Metabolic Brain Disease**, [s.l.], v. 15, p. 133-149, 2000.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals and biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, Oxford, v. 38, n. 4, p. 522–550, 2012.

MORETTI, M. M. S.; BOCCHINI-MARTINS, D. A.; DA SILVA, R.; RODRIGUES, A.; SETTE, L. D.; GOMES, E. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.43 n.3, 2012.

MURPHY, L. et al. Product inhibition of five *Hypocrea jecorina* cellulases. **Enzyme and Microbial Technology: biotechnology research and reviews**, Philadelphia, v. 52, n. 3, p. 163–169, 2013.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; RODWELL, V. W. **Bioquímica ilustrada de Harper**. Ed. Lange,[s.l.] 2013.

NAM, K. H.; SUNG, M. N.; HWANG, K. Y. Structural insights into the substrate recognition properties of β -glucosidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Philadelphia, v. 391, p. 1131–1135, 2010.

NAZIR, A.; SONI, R.; SAINI, H.S.; KAUR, A.; CHADHA, B.S. Profiling differential expression of cellulases and metabolite footprints in *Aspergillus terreus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 162, p. 538–547, 2010

ORTEGA, N.; DIEGO, S.; RODRIGUEZ-NOGALES, J.M.; PEREZ-MATEOS, M.; BUSTO, M.D. Kinetic behaviour and thermal inactivation of pectinlyase used in food processing. **International Journal of Food Science & Technology**, Chichester, v. 39, p. 631-639, 2004.

PALMA-FERNANDEZ, E. R. P. **Produção, purificação e caracterização bioquímica de β -glicosidasas do fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus***. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2002.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, Essex, v. 74, p. 25-33, 2000.

PARK, A. R. et al. Biochemical characterization of an extracellular β -glucosidase from the fungus, *Penicillium italicum*, isolated from rotten citrus peel. **Mycobiology**, Seoul, v. 40, n. 3, p. 173–180, 2012.

PAYNE, C. M. et al. Fungal cellulases. **Chemical Reviews**, Washington, v.119, n.30, p. 9601-9613, 2015.

PERALTA, R. M.; KADOWAKI, M. K.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A. A highly thermostable β -glucosidase activity from the thermophilic fungus *Humicola griseovar. thermoidea*: purification and biochemical characterization. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 146, p 291-295, 1997.

PESSOA, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos.**, Ed. Manole, Barueri, cap. 1, p. 1-5, 2005.

PINTO, G. F.; MENEZES, R. R. **Cinética enzimática**. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais Ltda, 2009.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. Tese (Doutorado em Engenharia Química)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

RAÍZEN. **Entrei no bagaço**. [s.l.], 2012. Disponível em: <<http://www.raizen.com/entrei-no-bagaco>> . Acesso em: 7 out. 2015.

RAÍZEN. **Tecnologia em energia renovável**. [s.l.] 2015. Disponível em :<<http://www.raizen.com/energia-do-futuro-tecnologia-em-energia-renovavel/etanol-de-segunda-geracao>>. Acesso em: 7 out. 2015.

RHODES, D. G.; LAUE, T. M. Determination of purity. **Methods in Enzymology**, New York, v. 182, p. 555-565, 1990.

RIEDEL, K. Microbial BOD sensor: problems of practical use and comparison of sensor BOD and BOD5. **Frontiers in Biosensorics**, [s.l.], v.2, p.99–108, 1997.

RIOU, C.; SALMON, J. M.; VALLIER, M. J.; GÜNATA, Z.; BARRE, P. Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 3607–3614, 1998.

ROY, S. K.; RAHA, S. K.; DEY, S. K.; CHAKRABARTY, S. L. Immobilization of β -glucosidase from *Myceliophthora thermophila*. **Enzyme and Microbial Technology**: biotechnology research and reviews, Philadelphia, v. 11, p. 431–435, 1989.

SADANA, J. C.; SHEWALE, J. G.; PATIL, R. V. β -D-glucosidase of *Sclerotium rolfsii*. substrate specificity and mode of action. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 118, p. 205–214, 1983.

SAHA, B. C.; BOTHAST, R. J. Production, purification, and characterization of a highly glucose- tolerant novel beta-glucosidase from *Candida peltata*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 9, p. 3165–3170, 1996.

SAHA, B. C.; FREER, S. N.; BOTHAST, R. J. Production, purification and properties of thermostable β -glucosidase from a color variant strain of *Aureobasidium pullulans*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 3774-3780, 1994.

SANTOS, H. B. **Estudo do potencial enzimático hidrolítico e oxidativo do microorganismo *Myceliophthora thermophila* M.7.7**. Tese (Doutorado em Biofísica Molecular) Universidade Estadual Paulista Campus de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, 2014.

SAQUIB, A. A. N.; FAROOQ, A.; IQBAL, M.; HASSAN, J. UL.; HAYAT, U.; BAIG, S. A thermostable crude endoglucanase produced by *Aspergillus fumigatus* in a novel solid state fermentation process using isolated free water. **Enzyme Research**, New York, p. 1-6, 2012.

SAQUIB, A. A. N.; HASSAN, M.; KHAN, N. F.; BAIG, S. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**, London, v. 45, p. 641-646, 2010.

SEE, Y. P.; JACKOWSKI, G. Estimating molecular weight of polypeptides by SDS gel electrophoresis. In: **Protein structure: a practical approach**, p. 1-22. Editor: T.E. Creighton, IRL Press, Oxford, 1990.

SELWYN, M.J. A simple test for inactivation of an enzyme during assay. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 105, p. 193-195, 1965.

SHAHEEN, M.; CHOI, M.; ANG, W.; ZHAO, Y.; XING, J.; YANG, R.; XING, J.; ZHANG, J.; CHEN, J. Application of low-intensity pulsed ultrasound to increase bio-ethanol production. **Renewable Energy**, Oxford, v. 57, p. 462–468, 2013.

SHIRAKI, K.; NISHIKORI, S.; FUJIWARA, S.; HASHIMOTO, H.; KAI, Y.; TAKAGI, M.; IMANAKA, T. Comparative analyses of the conformational stability of a hyperthermophilic protein and its mesophilic counterpart. **European Journal of Biochemistry**, [s. l.], p. 4144-4150, 2001.

SIDDIQUI, K. S.; SAQIB, A. A. N; RASHID M. H.; RAJOKA, M. I. Thermostabilization of carboxymethyl-cellulase from *Aspergillus niger* by

carboxyl group modification. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, p. 325-329, 1997.

SIMS, R. E. H. et al. An overview of second generation biofuel technologies. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 6, p. 1570–1580, 2010.

SINGHANIA, R. R. et al. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. **Bioresource Technology**, Essex, v. 127, p. 500–507, 2013.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R.K.; RAJASREE, K.P.; MATHEW, A.; GOTTUMUKKALA, L.D.; PANDEY, A. Properties of a major beta-glucosidase-BGL1 from *Aspergillus niger* NII-08121 expressed differentially in response to carbon sources. **Process Biochemistry**, London, v. 46, p. 1521–1524, 2011.

SOCCOL, C. R. et al. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 13, p. 4820–4825, 2010.

SØRENSEN, A.; LUBECK, M.; LUBECK, P. S.; AHRING, B. K. et al. Fungal beta-glucosidases: a bottleneck in industrial use of lignocellulosic materials. **Biomolecules**, Basel, p. 612–631, 2013.

SOUZA, F.H. M. ; NASCIMENTO, C.V.; ROSA, J.C.; MASUI, D.C.; LEONE, F.A.; JORGE, J.A.; FURRIEL, R.P.M. Purification and biochemical characterization of a mycelial glucose- and xylose-stimulated beta-glucosidase from the thermophilic fungus *Humicola insolens*. **Process Biochemistry**, London, v. 45, p. 272–278, 2010.

SPAGNA, G.; BARBAGALLO, R.N.; PALMERI, R.; RESTUCCIA, C.; GIUDICI, P. Properties of endogenous β -glucosidase of *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from sicilian musts and wines. **Enzyme and Microbial Technology: biotechnology research and reviews**, Philadelphia, v.31, p. 1030-1035, 2002.

SRIVASTAVA, S. K.; GOPALKRISHNAN, K. S.; RAMACHANDRAN, K. B. Kinetic characterization of a crude β -d-glucosidase from *Aspergillus wentii* Pt 2804. **Enzyme and Microbial Technology: biotechnology research and reviews**, Philadelphia, v. 6, n. 11, p. 508–512, 1984.

STRYER, L. Biochemistry. New York, W.H. Freeman, cap. 18, p. 463-482, 1995.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 83, n. 1, p. 1–11, 2002.

SUZUKI, K.; SUMITANI, J.; NAM, Y.; NICHIMAKI, T.; TANI, S.; WAKAGI, T.; KAWAGUCHI, T.; FUSHINOBU, S. Crystal structures of glycoside hydrolase family 3 β -glucosidase 1 from *Aspergillus aculeatus*. **The Biochemical Journal**, London, v. 221, p. 211–221, 2013.

TRAON-MASSON, M. P.; PELLERIN, P. Purification and characterization of two β -D-glucosidases an *Aspergillus niger* enzyme preparation: affinity and specificity toward glucosylated compounds characteristic of the processing of fruits. **Enzyme and Microbial Technology: biotechnology research and reviews**, Philadelphia, v. 22, p. 374-382, 1998.

VATTEM D. A.; SHETTY K. Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace (*Vaccinium macrocarpon*) mediated by *Lentinus edodes* using a solid-state system. **Process Biochemistry**, London, v. 39, p. 367-379, 2003.

WILLICK, G. E.; SELIGY, V. L. Multiplicity in cellulases of *Schizophyllum commune* derivation partly from heterogeneity in transcription and glycosylation. **European Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 151, p. 89–96, 1985.

WILSON, K.; WALKER J. **Principles and Techniques of biochemistry and molecular biology**. Paperback, [s.l.], 2010.

XIAO, Z.; ZHANG, X.; GREGG, D. J.; SADDLER, J. N. Effects of sugar inhibition on cellulases and β -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 113, p. 1115–1126, 2004.

XIMENES, E.; KIM, Y.; MOSIER, N.; DIEN, B.; LADISCH, M. Deactivation of celulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology: biotechnology research and reviews**, Philadelphia, v. 48, p. 54-60, 2011.

XIMENES, E.; KIM, Y.; MOSIER, N.; DIEN, B.; LADISCH, M. Inhibition of celulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology: biotechnology research and reviews**, Philadelphia, v. 46, p. 170-176, 2010.

YAN, T.; LIN, Y.; LIN, C. Purification and characterization of an extracellular beta-glucosidase II with high hydrolysis and transglucosylation activities from *Aspergillus niger*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 2, p. 431–437, 1998.

YAZAKI, T.; OHMISHI, M.; ROKUSHIKA, S.; OKADA, G. Subsite structure of the β -glucosidase from *Aspergillus niger*, evaluated by steady-state kinetics with cellooligosaccharides as substrates. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 298, p. 51-57, 1997.

ZANOELO, F. F. **Caracterização bioquímica das beta-glucosidases do *Scytalidium thermophilum***. Tese (Doutorado em Ciências), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2005.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. Prentice Hall, 2010.