



**Universidade de São Paulo**

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

“Caracterização da atividade  $\beta$ -glucosidásica de *Humicola insolens*”.

Flavio Henrique Moreira de Souza

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo, como parte das exigências  
para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área:  
**Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

2009



**Universidade de São Paulo**

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

“Caracterização da atividade  $\beta$ -glucosidásica de *Humicola insolens*”.

Flavio Henrique Moreira de Souza

Orientadora: Profa. Dra. Rosa dos Prazeres Melo Furriel

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo, como parte das exigências  
para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área:  
**Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

2009

## FICHA CATALOGRÁFICA

Souza, Flavio Henrique Moreira  
Caracterização da atividade  $\beta$ -glucosidásica de *Humicola insolens*  
de Ribeirão Preto –SP. Ribeirão Preto, 2009.

105 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia  
ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração:  
Química.

Orientadora: Furriel, Rosa dos Prazeres Melo.

1.  $\beta$ -glucosidase. 2. *Humicola insolens*. 3. Ativada por glicose.  
4.Purificação. 5.caracterização cinética

## **Dedicatória**

A José e Zilá, meus pais, pelo amor, paciência, tolerância, dedicação, por insistirem em me fazer seguir em frente sempre que eu estava desistindo.

Agradeço por me ensinarem que fazemos diferença mesmo quando não percebemos.

Amo vocês.

A Rafael e Mateus, meus irmãos, pela amizade.

Vocês são meus melhores amigos.

A minha família, por estar sempre comigo.

A Mônica, minha esposa, pela paciência, amor e dedicação.

Amo você.

## **Agradecimentos**

A minha querida orientadora Profa. Dra. Rosa dos Prazeres Melo Furriel Inocentes, pelo incentivo, pela paciência, por todos os conselhos, pelo meu desenvolvimento acadêmico e principalmente por sua amizade.

Ao meu divertido co-orientador Prof. Dr. João Atilio Jorge por toda ajuda, conhecimento, paciência, pelo meu desenvolvimento acadêmico e pela amizade.

A Douglas Chodi Masui pelas primeiras orientações, ajuda em meu trabalho e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Leone por ter sido o primeiro a abrir as portas do laboratório para mim e pela orientação prestada.

Ao Prof. Dr. José César Rosa pela ajuda nos experimentos de sequenciamento da proteína.

A Nilton Rosa Alves, Ivana Aparecida Borin e Maurício de Oliveira, pelo suporte técnico, ajuda em meu trabalho e pela amizade.

Aos meus amigos de laboratório, Alexandre, Bruna, César, Cíntia, Daiana, Daniela, Fabrício, Giovana, Heloisa, Jaqueline, Jean, João, Kelly, Luana, Malson, Raquel, Rômulo, Sandra, Talita, Taty, Thaís e Vitor, me desculpem se eu esqueci alguém, vocês são muitos.

Aos meus amigos Marcel, Marco e Vinícius.

Aos funcionários da FFCLRP

A Capes, CNPq e FAPESP pelo auxílio financeiro.

## Epígrafe

“O tempo é o melhor autor: sempre encontra um final perfeito”

Charles Chaplin

## Resumo

Os materiais lignocelulósicos são os principais resíduos da atividade agroindustrial. Atualmente, é grande a procura por enzimas capazes de degradá-los, visando à produção de diversos compostos químicos, em especial combustíveis renováveis, como o etanol, com baixo impacto ambiental. A celulose é o polissacarídeo majoritário da parede celular das plantas e a macromolécula mais abundante produzida na Terra. A degradação enzimática da celulose é, portanto, de especial significado ambiental e comercial.

A celulose é um polissacarídeo linear composto de unidades de glicose ligadas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -(1,4). A hidrólise enzimática da celulose envolve pelo menos três classes de enzimas: endoglucanases, celobiohidrolases (exoglucanases) e  $\beta$ -glucosidases. Apenas as duas primeiras enzimas agem diretamente sobre a celulose, depolimerizando as cadeias e liberando oligossacarídeos de diferentes tamanhos e celobiose. A celobiose é a unidade básica repetitiva da celulose e pode ser convertida em resíduos de glicose pelas  $\beta$ -glucosidases. Este sistema enzimático funciona sinergisticamente, e as  $\beta$ -glucosidases são responsáveis pelo passo terminal da sacarificação da celulose, liberando as endoglucanases e exoglucanases da inibição por celobiose. Entretanto, em sua grande maioria, as  $\beta$ -glucosidases também são inibidas pelo produto da reação catalisada, o que vem despertando um interesse crescente por enzimas tolerantes à glicose.

Resultados preliminares mostraram que, quando cultivado em meio líquido empregando avicel como fonte de carbono, o fungo termófilo *Humicola insolens* é um bom produtor de  $\beta$ -glucosidases. Além disso, a atividade do extrato bruto micelial foi estimulada por glicose ou xilose. A análise eletroforética deste extrato bruto, em condições não

desnaturantes, revelou ainda a presença de duas bandas de atividade  $\beta$ -glucosidásica, sendo uma estimulada e outra inibida por glicose em concentração 100 mM. Este trabalho descreve a produção, purificação e caracterização bioquímica de duas  $\beta$ -glucosidases miceliais de *Humicola insolens*.

As melhores condições de cultivo para a produção de  $\beta$ -glucosidase micelial foram 40°C, 120 rpm, em meio constituído de  $K_2HPO_4$  0,1%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,05%, solução de traços de elementos (25  $\mu$ L para cada 50 mL de meio), extrato de levedura 0,8% e avicel 0,75%, em pH inicial 6,0. O tempo de cultivo para máxima produção foi de 4 dias.

As duas  $\beta$ -glucosidases miceliais, denominadas BGH I e BGH II, foram purificadas por um procedimento que envolveu precipitação com sulfato de amônio a 75%, seguida por dessalificação em Sephadex G-25, cromatografia de troca iônica em DEAE fractogel e filtração em gel de Sephacryl S-200. Após a purificação, BGH I atingiu uma atividade específica de 25 U/mg com um rendimento de 7,9% e fator de purificação 27,5 vezes. Já a forma BGH II apresentou atividade específica de 15,2 U/mg, com rendimento de 30% e fator de purificação 16,5 vezes.

As enzimas apresentaram um conteúdo de carboidratos totais de 51 % (BGH I) e 21% p/p (BGH II). A forma BGH I apresentou massa molecular aparente, estimada por filtração em gel, de 282 kDa, enquanto para (BGH II) este valor foi de 94 kDa. A análise em SDS-PAGE de BGH II mostrou uma única banda protéica de 55 kDa, sugerindo que a forma nativa da enzima é um homodímero. Já para BGH I foram reveladas 3 bandas, com massa moleculares aparentes de 31 kDa, 52 kDa e 132 kDa, sugerindo uma estrutura tetramérica. Entretanto, considerando que se trata de uma enzima altamente glicosilada, estes resultados devem ser interpretados com cautela.



Estudos de espectrometria de massas de BGH II demonstraram boa similaridade da sua seqüência de aminoácidos com aquela de uma  $\beta$ -glucosidase de *Humicola grisea* var. *thermoidea*, com cerca de 22% de recobrimento.

A temperatura ótima de reação foi de 60°C para ambas as  $\beta$ -glucosidases purificadas e os valores de pH ótimo foram 5,0 e 6,0 para BGH I e BGH II, respectivamente. Ambas as enzimas foram estáveis quando incubadas em água até 1 hora, a 50°C; BGH I apresentou um tempo de meia-vida de 47 min a 60°C, enquanto BGH II apresentou um tempo de meia-vida de 40 min a 55°C. Quando incubadas em tampões de diferentes pH por 24 h, BGH I mostrou-se estável em uma faixa de 5-8 e BGH II em pH 6-8.

A forma BGH I apresentou maior especificidade de substrato que BGH II, hidrolisando apenas p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo, celobiose e salicina, dentre todos os substratos testados. Já BGH II hidrolisou celobiose, lactose, p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo, p-nitrofenil- $\beta$ -D-fucopiranosídeo, p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilanopiranosídeo, p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo, o-nitrofenil- $\beta$ -Dgalactopiranosídeo e salicina. Nenhuma das duas enzimas hidrolisou substratos poliméricos (CMC e Avicel), além de maltose, trealose e sacarose.

Estudos cinéticos mostraram que a forma BGH I hidrolisou p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo e celobiose com a mesma velocidade máxima (25 U/mg). Porém, a afinidade aparente da enzima foi cerca de 7 vezes maior para o substrato sintético. Já os melhores substratos para BGH II foram p-nitrofenil- $\beta$ -D-fucopiranosídeo ( $V_M/K_M = 323,3$  U/mg.mM) e celobiose ( $V_M/K_M = 168,0$  U/mg.mM).

De maneira muito interessante, a atividade de BGH II foi ativada por glicose ou xilose até concentrações de 400 mM, com efeito estimulatório máximo de cerca de 2 vezes

próximo a 100 mM. Em contraste, a atividade de BGH I foi inibida em 95% por glicose 50 mM.

Concluindo, a grande eficiência catalítica para substratos naturais, sua boa estabilidade térmica, forte estimulação por glicose e xilose, e tolerância a elevadas concentrações destes monossacarídeos no meio reacional, qualificam a enzima BGH II para aplicação na hidrólise de resíduos celulósicos.

## **Abstract**

Lignocellulosic materials are the major residues from agroindustrial activities. Currently, there is a great interest in enzymes able to degrade such residues, aiming the production of several chemical products, particularly renewable fuels like ethanol, with low environmental impact. Cellulose is the main polysaccharidic component of the plant cell wall and the most abundant naturally occurring macromolecule on Earth. The enzymatic degradation of cellulose is therefore of great environmental and commercial significance.

Cellulose is a linear polysaccharide composed of glucose units, linked by  $\beta$ -(1,4)-glycosidic bonds. The enzymatic hydrolysis of cellulose involves at least three types of enzymes: endoglucanases, cellobiohydrolases (exoglucanases), and  $\beta$ -glucosidases. Only the first two enzymes act directly on cellulose, depolymerizing the cellulose chains and releasing different oligosaccharides and cellobiose. Cellobiose is the basic repetitive unit of cellulose and can be converted into glucose monomers by  $\beta$ -glucosidases. This enzymatic system works synergistically, and  $\beta$ -Glucosidases are responsible for the terminal step of cellulose saccharification, releasing endoglucanases and cellobiohydrolases from cellobiose inhibition. However, most  $\beta$ -Glucosidases are also inhibited by their reaction product, leading to a growing interest in glucose tolerant enzymes.

Preliminary results showed that, when grown in liquid medium supplemented with microcrystalline cellulose (avicel®) as carbon source, the thermophilic fungus *Humicola insolens* is a good producer of  $\beta$ -glucosidases. Moreover, the activity of the mycelial crude extract was stimulated by glucose or xylose. The electrophoretic analysis of this crude extract in non-denaturing conditions also revealed the presence of two bands of  $\beta$ -glucosidase activity, one stimulated and the other inhibited by 100 mM glucose. This study

describes the production, purification and biochemical characterization of two mycelial  $\beta$ -glucosidases from *Humicola insolens*.

Best culture conditions to mycelial  $\beta$ -glucosidase production were 40°C, 120 rpm, in liquid media containing 0,1%  $K_2HPO_4$ , 0,05%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , trace elements solution (25  $\mu$ L/50 mL medium), 0,8% yeast extract and 0,75% avicel, with initial pH adjusted to 6,0. The culture time for maximal production was 4 days.

The experimental protocol for the simultaneous purification of both mycelial  $\beta$ -glucosidases, named BGH I and BGH II, involved 75% ammonium sulfate precipitation, followed by Sephadex G-25 desalting, DEAE-fractogel ion exchange chromatography and gel filtration in Sephacryl S-200. The form BGH I was purified 27.5 fold, reaching a specific activity of 25 U/mg with 7.9% yield. BGH II was purified 16.5 fold, with a yield of about 30% and the specific activity was 15.2 U/mg.

The enzymes showed total carbohydrate content of 51% (BGH I) and 21% w/w (BGH II). The apparent molecular masses corresponded to 282 kDa (BGH I) and 94 kDa (BGH II), as estimated by gel filtration. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis analysis of BGH II showed a single polypeptide band of 55 kDa, suggesting that the native enzyme is a homodimer. In contrast, three protein bands were revealed for BGH I, corresponding to apparent molecular masses of 31 kDa, 52 kDa e 132 kDa, suggesting a tetrameric structure. However, considering its high level of glycosylation, the results must be considered cautiously.

Mass spectrometry analysis of BGH II showed good amino acid sequence similarity with a  $\beta$ -glucosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*, with about 22% coverage.

Optimal reaction temperature was 60°C for both purified  $\beta$ -glucosidases and optimal pH was 5.0 and 6.0 for BGH I and BGH II, respectively. Both enzymes were stable up to 1 h when incubated in water at 50°C. The half-life for BGH I at 60°C was 47 min, while BGH II showed a half-life of 40 min at 55°C. When maintained at room temperature for 24 h at different pH, BGH I was stable in the range 5-8, while BGH II was stable between 6.0 and 8.0.

Among all substrates tested, BGH I hydrolyzed only p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside, cellobiose and salicin. In contrast, BGH II showed broad substrate specificity, hydrolyzing cellobiose, lactose, p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside, p-nitrophenyl- $\beta$ -D-fucopyranoside, p-nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside, p-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside, o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside and salicin. Both enzymes were unable to hydrolyze polymeric substrates (CMC and avicel) and also maltose, trehalose and sucrose.

Kinetic studies showed that BGH I hydrolyzed p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside and cellobiose with the same maximal velocity (25 U/mg). However, the apparent affinity of the enzyme for the synthetic substrate was 7-fold higher. The best substrates for BGH II were p-nitrophenyl- $\beta$ -D-fucopyranoside ( $V_M/K_M = 323,3$  U/mg.mM) and cellobiose ( $V_M/K_M = 168,0$  U/mg.mM).

Interestingly, BGH II activity was activated by glucose or xylose at concentrations up to 400 mM, with maximal stimulatory effect (about 2-fold) around 100 mM. In contrast, BGH I activity was inhibited about 95% by 50 mM glucose.

Concluding, the high catalytic efficiency for the natural substrate, good thermal stability, strong stimulation by glucose or xylose, and tolerance to elevated concentrations

of these monosacharides qualify the enzyme BGH II for application in the hydrolysis of cellulosic residues.

---

<b>Índice</b>	<b>Página</b>
<b>1. Introdução:</b>	
1.1. Carboidratos	1
1.2. Parede Celular Vegetal	2
1.3. Celulose	3
1.4. Microorganismos Celulolíticos	4
1.5. O fungo <i>Humicola insolens</i>	5
1.6. Complexo Celulolítico	6
1.7. $\beta$ -glucosidases	7
1.8. Mecanismos de Hidrólise	9
<b>2. Objetivos:</b>	11
<b>3. Materiais e Métodos:</b>	
3.1. Materiais	12
3.2. Organismos	12
3.3. Manutenção das linhagens	12
3.4. Crescimento de <i>H. insolens</i> em meio líquido	13
3.5. Crescimento de <i>T. reesei</i> em meio semi-sólido	14
3.6. Obtenção do extrato bruto de <i>T. reesei</i> rico em celulases	15
3.7. Obtenção dos extratos brutos de <i>H. insolens</i> ricos em atividade $\beta$ -glucosidasica	15
3.8. Purificação das $\beta$ -glucosidases miceliais de <i>H. insolens</i>	15
3.9. Determinação da atividade aril $\beta$ -glucosidase	16
3.10. Determinação da atividade celobiase	17
3.11. Determinação da atividade sobre outros substratos	18
3.12. Tratamento dos dados cinéticos	19
3.13. Dosagem de proteínas	19

---

---

3.14. Eletroforese e focalização isoeletrica	19
3.15. Determinação das massas moleculares das enzimas purificadas	21
3.16. Preparação e padronização de soluções de íons	21
3.17. Dosagem de carboidratos neutros das $\beta$ -glucosidases purificadas	21
3.18. Temperatura e pH ótimos, inativação térmica e estabilidade ao pH as enzimas purificadas	22
3.19. Distribuição celular das $\beta$ -glucosidases	23
3.20. Caracterização de BGH II purificada por análise de Espectrometria de Massas	23
3.21. Estudo da ação sinérgica de BGH II e extratos brutos ricos em celulasas na hidrólise de bagaço de cana e papel	24
<b>4. Resultados:</b>	
4.1. Produção de $\beta$ -glucosidases por <i>H. insolens</i>	26
4.2. Perfil de atividade $\beta$ -glucosidásica intracelular em gel (PAGE)	26
4.3. Distribuição sub-celular das $\beta$ -glucosidases de <i>H. insolens</i>	32
4.4. Purificação das $\beta$ -glucosidases miceliais de <i>H. insolens</i>	33
4.5. Propriedades Moleculares das $\beta$ -glucosidases purificadas	39
4.5.1. Análise de BGH II purificada por espectrometria de massas	41
4.6. Caracterização Cinética das $\beta$ -glucosidases purificadas de <i>H. insolens</i>	43
4.6.1. Efeito do pH e temperatura sobre a atividade PNP-glucosidásica	43
4.6.2. Estabilidade térmica e ao pH	43
4.6.3. Especificidade de substrato das $\beta$ -glucosidases purificadas	49
4.6.4. Determinação dos parâmetros cinéticos para a estimulação de BGH I e BGH II por diferentes substratos	51

---



---

4.6.5. Efeito de íons e EDTA sobre a atividade das $\beta$ -glucosidases miceliais purificadas de <i>H. insolens</i>	60
4.6.6. Efeito de carboidratos sobre a atividade de BGH I e BGH II	60
4.7. Sinergismo entre BGH II e celulases de <i>Trichoderma reesei</i> na hidrólise de papel e bagaço de cana	65
<b>5. Discussão</b>	66
<b>6. Referências</b>	78

---

---

<b>Índice de Figuras</b>	<b>Página</b>
Figura 1: Representação molecular da celulose e pontos de ação das endoglucanases, exoglucanases e $\beta$ -glucosidases (Kumar et al., 2008)	4
Figura 2: Mecanismos de hidrólise enzimática de ligações glicosídicas. (a) Mecanismo de retenção e (b) mecanismo de inversão (Davies e Henrissat, 1995)	10
Figura 3. Perfil de atividade $\beta$ -glucosidásica intracelular após PAGE	29
Figura 4. Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de $\beta$ -glucosidases intracelulares por <i>H. insolens</i>	30
Figura 5. Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de $\beta$ -glucosidases extracelulares por <i>H. insolens</i>	31
Figura 6. Perfil cromatográfico da atividade $\beta$ -glucosidásica micelial de <i>H. insolens</i> precipitada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em coluna de DEAE-fractogel	35
Figura 7. Perfil cromatográfico do pico I obtido da cromatografia em DEAE-Fractogel em coluna de Sephacryl S-200	36
Figura 8. Eletroforese em condições não desnaturantes das $\beta$ -glucosidases miceliais purificadas de <i>H. insolens</i>	38
Figura 9. Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) das $\beta$ -glucosidases intracelulares purificadas de <i>H. insolens</i>	40
Figura 10. Análise de BGH II por espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF-MS)	42
Figura 11. Efeito da temperatura sobre a atividade $\beta$ -glucosidásica	45
Figura 12. Efeito do pH sobre a atividade $\beta$ -glucosidásica	46
Figura 13. Estabilidade térmica das $\beta$ -glucosidases purificadas de <i>H. insolens</i>	47
Figura 14. Estabilidade ao pH das $\beta$ -glucosidases purificadas de <i>H. insolens</i>	48

---

---

Figura 15. Estimulação da atividade de BGH I por PNP-Glu, celobiose e salicina	53
Figura 16. Estimulação da atividade de BGH II por PNP-Glu, celobiose e salicina	57
Figura 17. Estimulação da atividade de BGH II por PNP-Gal e lactose	58
Figura 18. Estimulação da atividade de BGH II por PNP-Xil e PNP-Fuc	59
Figura 19. Estimulação da atividade de BGH II por glicose e xilose	64

---

---

<b>Índice de Tabelas</b>	<b>Página</b>
Tabela 1: Efeito da composição do meio de cultivo sobre a produção de atividade $\beta$ -glucosidásica intra e extracelular por <i>H. insolens</i> .	28
Tabela 2. Distribuição sub-celular das $\beta$ -glucosidases de <i>H. insolens</i> .	32
Tabela 3. Purificação das $\beta$ -glucosidases miceliais de <i>Humicola insolens</i>	37
Tabela 4. Especificidade por substratos de BGH I e BGH II	50
Tabela 5. Parâmetros cinéticos calculados para a estimulação da forma BGH I por diferentes substratos	52
Tabela 6. Parâmetros cinéticos calculados para a estimulação da forma BGH II por diferentes substratos	56
Tabela 7. Efeito de diferentes íons e EDTA sobre a atividade PNP-glucosidásica das $\beta$ -glucosidases miceliais purificadas de <i>H. insolens</i>	62
Tabela 8. Efeito de diferentes carboidratos sobre a atividade PNP-glucosidásica das $\beta$ -glucosidases miceliais purificadas de <i>H. insolens</i>	63

---

## **Siglas e Abreviaturas**

BGH I: Beta glucosidase de *Humicola insolens* I

BGH II: Beta glucosidase de *Humicola insolens* II

BSA: Soro albumina bovina

CID: collision-induced dissociation

CMC: Carboximetilcelulose

DEAE: Dietilaminoetil

DNS: Ácido dinitrosalicílico

EDTA: Ácido etileno diamintetraacético

GOD: Glicose oxidase

MALDI: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization

ONP-Gal: o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida

PNP-Fuc: p-nitrofenil- $\beta$ -D-fucopiranosídeo

PNP-Gal: p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

PNP-Glu: p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo

PNP-Xil: p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilanopiranosídeo

SDS: Dodecil sulfato de sódio

## **1. Introdução**

### **1.1. Carboidratos**

Os carboidratos são um dos grupos mais diversos de moléculas orgânicas da biosfera. Um único hexassacarídeo redutor pode formar mais de  $10^{12}$  oligossacarídeos estereoisôméricos, embora nem todos estes isômeros sejam encontrados na natureza. Os carboidratos ocorrem como açúcares simples (ribose, glicose, galactose, frutose, etc.), oligossacarídeos (sacarose, celobiose, lactose, etc.), polímeros (celulose, amido, glicogênio, etc.), conjugados (O-, N-, e S-glicosídeos, ligados a proteínas e lipídeos), e ainda em outras substâncias que são geralmente referidas como agliconas (Mirjam et al., 2001).

Muitos organismos vivos tiram vantagem desta diversidade, utilizando polissacarídeos e oligossacarídeos para um grande número de funções biológicas, desde estruturais e de armazenamento de energia, até à sinalização de processos altamente específicos. Nesse contexto, a hidrólise seletiva de ligações glicosídicas é crucial para obtenção de energia, expansão e degradação da parede celular e modificação de moléculas sinalizadoras, entre outros processos. Como consequência da diversidade dos sacarídeos, existe uma grande variedade de enzimas que hidrolisam ligações O-glicosídicas, as O-glicosil hidrolases (EC 3.2.1.x). (Davies e Henrissat, 1995).

Carboidratos simples e complexos têm sido descritos como “a última fronteira da biologia celular e molecular”. As enzimas necessárias para síntese e degradação destes compostos são um dos grandes desafios da era pós-gênômica. Isto se deve à grande diversidade química e funcional dos açúcares e à dificuldade de caracterização das enzimas e substratos propriamente ditos (Davies e Henrissat, 2002).

## 1.2. Parede Celular Vegetal

A parede celular vegetal é constituída principalmente de polissacarídeos, como a celulose, hemicelulose e pectina, que em conjunto com proteínas e lignina formam uma estrutura rígida e complexa. Apesar de uma grande variação na composição e estrutura anatômica das paredes celulares vegetais, existe uma faixa de conteúdo médio destes componentes, a celulose correspondendo a aproximadamente 35-50% do peso da planta seca, hemicelulose a 20-35% e lignina entre 5-30% (Aro et al., 2005; Lynd et al., 2002).

A celulose é o carboidrato mais abundante na natureza e o principal constituinte da parede celular vegetal, conferindo-lhe rigidez. A hemicelulose, o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, apresenta uma composição heterogênea de vários tipos de monossacarídeos. Assim, as hemiceluloses são normalmente classificadas de acordo com o resíduo de monossacarídeo mais abundante na cadeia polimérica principal. As formas mais comuns de hemiceluloses são as que apresentam xilana, constituída de unidades de D-xilose unidas por ligações  $\beta$ -1,4 e a (galacto)glicomanana constituída de D-manoses unidas por ligações  $\beta$ -1,4. As cadeias principais das hemiceluloses são modificadas por vários grupos laterais como arabinose e galactose, conferindo a estes polissacarídeos uma estrutura muito heterogênea.

As pectinas são uma família de polissacarídeos complexos contendo uma cadeia principal de unidades de ácido D-galacturônico unidas por ligações  $\alpha$ -1,4. Finalmente, a lignina, que aumenta a resistência da parede das células vegetais, consiste de um polímero dos álcoois cumarílico, coniferílico e sinapílico (Aro et al., 2005).

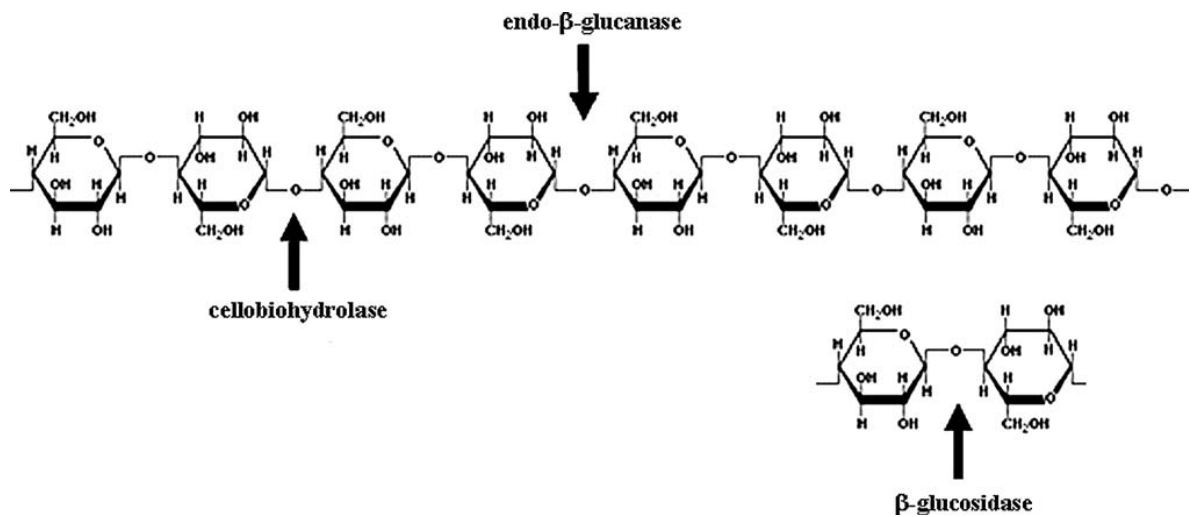
### 1.3. Celulose

A celulose é o recurso biológico natural mais abundante da biosfera, sendo que cerca de  $10^{12}$  toneladas são sintetizadas e degradadas por ano na Terra. Dado seu caráter renovável e biodegradável, tem sido historicamente utilizada para a manufatura de diversos produtos úteis ao homem. É produzida por muitas plantas, na forma de fios, como no caso do algodão, ou ainda como polímero estrutural das células (Schurz, 1999). Além disso, é o resíduo polimérico predominante da atividade agrícola (Boyce, 1986; Zhang et al., 2006), o que vem gerando interesse crescente, nos últimos anos, visando à sua utilização para a produção de diversos produtos químicos (diferentes açúcares, ácidos orgânicos, tensoativos, adesivos, corantes, solventes, produtos farmacêuticos, etc), além do chamado “etanol de segunda geração” (Reddy e Yang, 2005; Gusakov et al., 2007; Kumar et al., 2008). A conversão de materiais lignocelulósicos derivados da cana de açúcar (bagaço, palha), abundantes no Brasil, a etanol tem despertado particular atenção dos pesquisadores desde a crise do petróleo, na década de 1970, uma vez que pode resultar num aumento considerável do rendimento da produção por hectare de cana-de-açúcar plantada. Além disso, é amplamente aceito que a utilização de biocombustíveis, incluindo o etanol, resulta num menor aumento do teor de  $\text{CO}_2$  na atmosfera, comparada ao uso de combustíveis fósseis (Farrell et al., 2006).

Quimicamente, a celulose consiste de um polímero não ramificado composto por monômeros de glicose unidos por ligações O-glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4 (Figura 1). A configuração  $\beta$  das ligações glicosídicas faz com que a conformação mais estável da molécula seja a forma estendida, dando origem a cadeias longas e retas. Nessa conformação, cada unidade de glicose apresenta uma rotação de  $180^\circ$  em relação às unidades vizinhas. Dessa forma, a unidade básica repetitiva da molécula, a celobiose, é



constituída por duas moléculas de glicose unidas por ligação  $\beta$ -1,4 com um ângulo de rotação de  $180^\circ$  uma em relação à outra (Figura 1). O comprimento de cada cadeia varia de 100 a 1400 resíduos. Várias cadeias celulósicas alinhadas lado a lado dão origem a fibras supramoleculares cristalinas, de alta resistência tensional (Béguin & Aubert, 1994).



**Figura 1: Representação molecular da celulose e pontos de ação das endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases (Kumar et al., 2008)**

#### 1.4. Microorganismos Celulolíticos

A grande quantidade de celulose formada anualmente não se acumula sobre o planeta devido à ação de fungos e bactérias, que degradam eficientemente os materiais das paredes celulares de plantas. A biodegradação da celulose por celulasas e celulosomas, produzidos por uma grande variedade de microorganismos, representa o maior ciclo de carbono da biosfera e pode ser amplamente utilizada na produção de bioprodutos, sem emissão líquida de  $\text{CO}_2$  na atmosfera (Aro et al., 2005; Lynd et al., 2002; Zhang et al., 2006).

Os microorganismos celulolíticos estão distribuídos em grupos taxonômicos extremamente variados. Embora a maioria pertença às eubactérias e fungos, protozoários anaeróbicos que degradam celulose também foram identificados no rumem de alguns animais (Lynd et al., 2002).

Microorganismos celulolíticos podem ser encontrados em toda a biota onde se acumulem resíduos celulolíticos. Eles usualmente ocorrem em populações mistas, incluindo espécies celulolíticas e não celulolíticas, as quais freqüentemente interagem sinergicamente, levando à degradação completa da celulose (Lynd et al., 2002).

A degradação da parede celular das plantas por fungos filamentosos celulolíticos é um processo complexo que envolve a ação de um grande número de enzimas extracelulares, celulasas, hemicelulasas, pectinases e ligninases, dando a estes organismos meios para a obtenção de energia e nutrientes (Aro et al., 2005).

### **1.5. O fungo *Humicola insolens***

*Humicola insolens* é um fungo hifomiceto que produz pelo menos sete tipos diferentes de celulasas (Mackenzie et al., 1998). *Humicola insolens* é termófilo, ou seja, cresce em temperaturas elevadas. Sua velocidade máxima de crescimento ocorre entre 35-40°C, enquanto as temperaturas mínima e máxima em que foi observado crescimento foram de 23 e 55°C, respectivamente. A termofilia é uma característica altamente desejável para a utilização industrial de microorganismos, bem como de suas enzimas, as quais, devido à maior termoestabilidade, tendem a serem preservadas de uma possível inativação térmica em operações de transporte e/ou manuseio.

A linhagem de *H. insolens* utilizada neste projeto foi isolada de fezes de lhama do Bosque Municipal de Ribeirão Preto, SP, e identificada por comparação da

morfologia do conidióforo conforme descrito, e recomendado por Cooney e Emerson (1964).

### **1.6. Complexo Celulolítico**

Apesar de sua importância e do grande número de estudos realizados, o entendimento fundamental da utilização da celulose por microorganismos ainda é, em muitos aspectos, rudimentar, persistindo como uma questão de grande interesse biotecnológico e acadêmico. Isto é resultado da grande complexidade desse processo (Warren, 1996; Lynd et al., 2002).

Próximo à década de 50, a partir de um grande número de estudos, percebeu-se que a degradação da celulose requer um complexo de enzimas, atuando sinergicamente. Aparentemente, são necessários pelo menos três tipos de enzimas para uma digestão eficiente da celulose cristalina à glicose (Boisset et al., 2000). O conjunto das enzimas envolvidas nesse processo é denominado **sistema enzimático celulolítico** ou **complexo celulolítico** (Warren, 1996).

Atualmente, é aceito que a hidrólise enzimática da celulose por microorganismos envolve a ação conjunta de atividades endo-1,4- $\beta$ -glucanase (EC 3.2.1.4), exo-1,4- $\beta$ -glucanase (EC 3.2.1.91) e 1,4- $\beta$ -glucosidase (EC 3.2.1.21) (revisto por Béguin e Aubert, 1994; Lynd et al. 2002; Zhang et al., 2006). Apenas as duas primeiras classes de enzimas atuam diretamente sobre as fibras de celulose, liberando oligossacarídeos de vários tamanhos e celobiose. Enquanto as endo-glucanases atacam a cadeia de celulose em ligações glicosídicas distantes das extremidades, as exo-glucanases agem nas extremidades reductoras e não-reductoras das cadeias polissacarídicas celulósicas. Já as  $\beta$ -

glucosidases atuam nos passos finais da degradação da celulose, liberando glicose (revisto por Lynd et al. 2002; Zhang et al., 2006).

### **1.7. $\beta$ – glicosidases**

As  $\beta$ -glucosidases são enzimas que catalisam, em condições fisiológicas, a hidrólise de alquil- e aril- $\beta$ -glucosídeos, di-glucosídeos e oligossacarídeos curtos. Estas enzimas encontram-se amplamente distribuídas na natureza, ocorrendo em todos os reinos vivos, e possuem funções variadas. O interesse inicial no estudo das  $\beta$ -glucosidases surgiu na década de 1950, devido ao seu envolvimento na conversão biológica da celulose (Lynd et al., 2002; Zhang et al., 2006).

As  $\beta$ -glucosidases constituem um grupo majoritário entre as glicosil-hidrolases e atualmente tem sido o foco de vários estudos, devido à possibilidade de sua utilização em grande número de processos biológicos e biotecnológicos (Mirjan et al., 2001).

As  $\beta$ -glucosidases representam um grupo heterogêneo de enzimas, e não existe um sistema único definido para a sua classificação. Em geral, dois sistemas de classificação são descritos na literatura, sendo baseados em (1) especificidade de substrato e (2) similaridade na seqüência de nucleotídeos (Bhatia et al., 2002).

Na classificação baseada na especificidade de substrato, as  $\beta$ -glucosidases são divididas em três grupos: (1) aril  $\beta$ -glucosidases, que agem em aril-glicosídeos; (2) celobiasas verdadeiras, as quais são capazes de hidrolisar celobiose; e (3)  $\beta$ -glucosidases com ampla especificidade de substrato, que hidrolisam uma variedade de substratos. Dados da literatura demonstram que a grande maioria das  $\beta$ -glucosidases já caracterizadas pertencem a esta última categoria (Bhatia et al., 2002).

Entre as classificações que foram propostas para identificação das  $\beta$ -glucosidases com base na similaridade de seqüência de nucleotídeos, têm sido mais aceita aquela proposta por Henrissat e Bairoch (1996), que é baseada tanto na similaridade das seqüências de nucleotídeos quanto nos padrões de enovelamento destas enzimas (Bhatia et al., 2002). Nesta classificação, as glicosil hidrolases (cerca de 2000 já foram identificadas) são classificadas em 88 famílias; as  $\beta$ -glucosidases representam um grupo importante entre as glicosil hidrolases e estão reunidas nas famílias 1 e 3. A família 1 inclui 62  $\beta$ -glucosidases, originárias de arqueobactérias, plantas e mamíferos; a estrutura tridimensional de várias destas enzimas já foi resolvida, revelando um padrão comum de disposição de  $\alpha$ -hélices e  $\beta$ -folhas, além da presença de vários resíduos de aminoácidos altamente conservados, localizados nas proximidades do sítio ativo (Jenkins et al., 1995; Bhatia et al., 2002). Na família 3 estão classificadas 44  $\beta$ -glucosidases, originárias de bactérias, bolores e leveduras e nenhuma delas teve sua estrutura tridimensional determinada até o momento (revisto por Bhatia et al., 2002).

As  $\beta$ -glucosidases são consideradas responsáveis pela regulação de todo o processo celulolítico, constituindo o fator limitante da hidrólise enzimática da celulose, uma vez que as endoglucanases e exoglucanases são inibidas por celobiose. Portanto, as  $\beta$ -glicosidases não são responsáveis apenas pela produção de glicose a partir de celobiose, mas permitem também a ação eficiente de exoglucanases e endoglucanases (Kaur et al., 2007). Por outro lado, grande parte das  $\beta$ -glucosidases conhecidas são inibidas por glicose (Bhatia et al., 2002; Lynd et al., 2002; Yang et al., 2008; Kaur et al., 2007; Karnchanatat et al., 2007; Bhiri et al., 2008). Assim, existe um interesse crescente

na busca por enzimas tolerantes ao produto final, as quais poderiam melhorar acentuadamente a eficiência do processo de “sacarificação” da celulose.

### **1.8. Mecanismos de Hidrólise**

A hidrólise enzimática de ligações glicosídicas geralmente inclui catálise ácida envolvendo pelo menos dois resíduos principais: um resíduo deve ser doador de próton e o outro deve ser um nucleófilo. Em geral estes aminoácidos são glutamato e aspartato. No entanto, foi demonstrado que outros resíduos também podem estar envolvidos na catálise desta reação. A hidrólise pode ocorrer via dois mecanismos principais, nos quais haverá retenção ou inversão da configuração do carbono anomérico (Davies e Henrissat, 1995).

O mecanismo pelo qual a reação ocorre depende da distância entre os resíduos de aminoácidos envolvidos na catálise. Nas enzimas que catalisam a reação por meio do mecanismo de retenção, estes resíduos apresentam uma distância média de 5,5 Å, enquanto que naquelas que atuam por meio do mecanismo de inversão a distância média é de 10 Å (Davies e Henrissat, 1995).

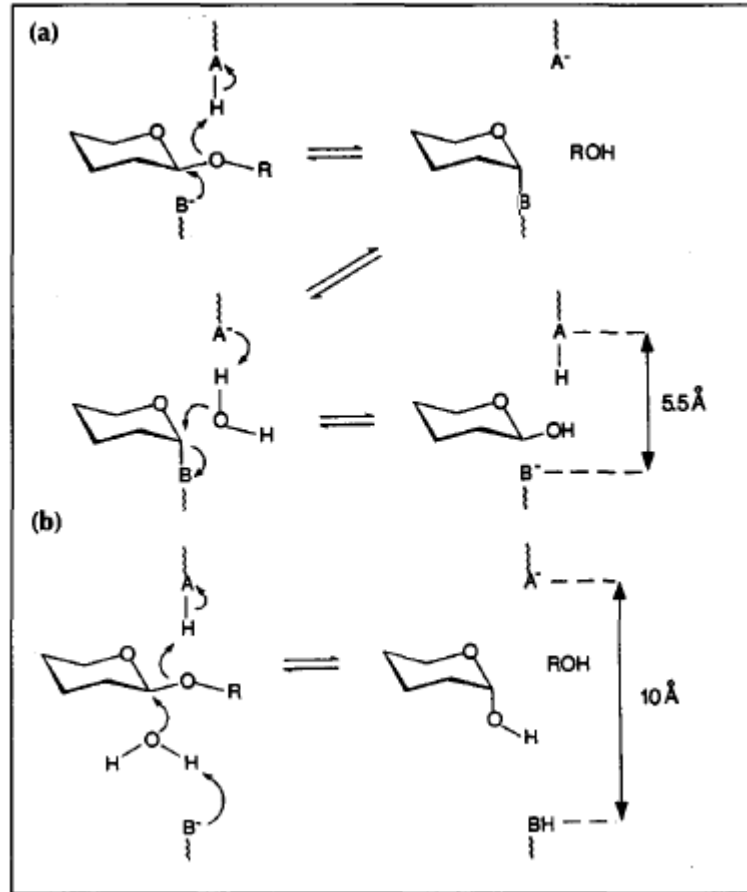


Figura 2: Mecanismos de hidrólise enzimática de ligações glicosídicas. (a) Mecanismo de retenção; (b) mecanismo de inversão (Davies e Henrissat, 1995)

## **2. Objetivos**

O presente trabalho teve como objetivos a otimização da produção, seguida da purificação e caracterização bioquímica de duas isoformas de  $\beta$ -glucosidase produzidas pelo fungo termófilo *Humicola insolens*, as quais apresentam características distintas, particularmente no que diz respeito à sensibilidade à glicose.

Após a purificação, uma das formas de  $\beta$ -glucosidase, fortemente estimulada por xilose e glicose, foi avaliada preliminarmente quanto à sua atuação sinérgica com celulasas do fungo *Trichoderma reesei* na sacarificação de alguns materiais celulósicos (papel e bagaço de cana submetido a explosão a vapor).

### **2.1. Objetivos específicos:**

Para alcançar os objetivos propostos, as seguintes etapas foram executadas:

1. Otimização da produção de  $\beta$ -glucosidases de *Humicola insolens*;
2. Purificação e caracterização bioquímica de duas  $\beta$ -glucosidases intracelulares de *H. insolens*;
3. Estudo do sinérgismo entre a  $\beta$ -glucosidase estimulada por glicose purificada de *H. insolens* e o extrato bruto rico em celulasas produzido por *T. reesei* na hidrólise de papel e bagaço de cana.



### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1. Materiais**

Bis(2-hidroxietil)iminotris(hidroximetil)metano (Bis-Tris), soroalbumina bovina (BSA), p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo (PNP-glu), celobiose e mistura padrão de peso molecular pré-corada para eletroforese (29-205 KDa) foram adquiridos junto à Sigma. Glicose Oxidase (GOD) adquirida pela Labtest. Solução de anfólitos (Pharmalyte, pH 3-10) foi obtida da Pharmacia. Os demais reagentes utilizados nesse trabalho foram de grau analítico e as soluções foram preparadas usando água tratada sucessivamente em aparelhos MilliRO e MilliQ (Millipore Co., USA).

#### **3.2. Organismos**

A linhagem de *H. insolens* utilizada neste projeto foi isolada de fezes de lhama coletadas no zoológico do Bosque Municipal de Ribeirão Preto, SP. A linhagem foi identificada por comparação da morfologia do conidióforo, conforme descrito e recomendado por Cooney e Emerson (1964).

O mutante hiper secretor de *Trichoderma reesei* RP-698 foi obtido por tratamento da linhagem selvagem QM9414 com N-nitroso guanidina, no Laboratório de Microbiologia da FFCLRP-USP.

#### **3.3. Manutenção das linhagens**

*Humicola insolens* e o mutante hipersecretor de *Trichoderma reesei* foram mantidos através de repiques sucessivos em meio inclinado solidificado com ágar (1,8%) contendo farinha de aveia 4%. Após o repique, *H. insolens* foi incubado entre 7-10 dias a 40°C,

enquanto *T. reesei* foi incubado pelo mesmo período, mas a 25°C. Após o crescimento, os fungos foram armazenados em geladeira por no máximo um mês.

Os conídios formados foram colhidos por suspensão em água estéril (10 mL/tubo de estoque), raspando-se a superfície da cultura com uma alça de platina. Para o inóculo em meio líquido foi utilizado 1 mL da suspensão de esporos por frasco de meio de cultura.

### **3.4. Crescimento de *H. insolens* em meio líquido**

*Humicola insolens* foi cultivado por diferentes intervalos de tempo a 40°C e sob agitação constante de 120 rpm, em frascos de Erlenmeyer com capacidade igual a 5 vezes o volume do meio de cultivo neles contido. Os meios de cultivo foram autoclavados a 127°C e 1,5 atm por 30 min.

Os diferentes meios de cultivo testados para otimizar a produção de atividade  $\beta$ -glucosidase por *H. insolens* tiveram seu pH acertado em 6,0 e continham avicel 0,75% acrescida de:

1:  $K_2HPO_4$  0,1%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,05%, traços de elementos (25  $\mu$ L/50 mL de meio, extrato de levedura 0,8%;

2:  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,05%,  $CaCl_2$  0,1 %,  $NaCl$  0,5 %, peptona 0,1%, extrato de levedura 0,8%;

3:  $NaNO_3$  0,3%,  $K_2HPO_4$  0,1%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,05%,  $KCl$  0,05%, traços de elementos (25  $\mu$ L/50 mL de solução), extrato de levedura 0,8%;

4: extrato de levedura 0,8%,  $H_2O$  destilada 75%,  $H_2O$  de torneira 25 %;

5: extrato de malte 0,8%;

6:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,1%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05%, extrato de levedura 0,4%,  $\text{H}_2\text{O}$  destilada 75%,  $\text{H}_2\text{O}$  de torneira 25 %.

A solução de traços de elementos foi preparada por adição sucessiva dos compostos listados abaixo em 95 mL de água desionizada:

5 g de Ácido Cítrico. $\text{H}_2\text{O}$

5 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

1 g de  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

0,25 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

0,05 g de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

0,05 g de  $\text{H}_3\text{BO}_3$

0,05 g de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

A seguir, o volume foi completado para 100 mL e adicionou-se 1 mL de clorofórmio como conservante.

As melhores condições de cultivo foram 96 horas, a 120 rpm e 40°C, em meio de cultura contendo  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,1%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05%, solução de traços de elementos (25  $\mu\text{L}$  para cada 50 mL de meio), extrato de levedura 0,8% e avicel 0,75%, pH 6,0.

### **3.5. Crescimento de *T. reesei* em meio semi-sólido**

*Trichoderma reesei* (mutante hipersecretor) foi cultivado a 25°C, em frascos de Erlenmeyer de 50 mL, em meio de cultivo semi-sólido contendo 5g de farelo de trigo em 10 mL de água e papel de filtro picado (0,5% p/p), por 2 a 4 dias, para a produção de celulases.

### **3.6. Obtenção do extrato bruto de *T. reesei* rico em celulasas**

Após o cultivo, o meio semi-sólido foi suspenso em 10 mL de água fria e a mistura filtrada em espuma sintética, com o auxílio de um funil de Buchner. O filtrado foi centrifugado por 10 min a 15.000 g e 4°C e o sobrenadante utilizado como extrato bruto rico em celulasas.

### **3.7. Obtenção dos extratos brutos de *H. insolens* ricos em atividade $\beta$ -glucosidásica**

Após o crescimento em meio líquido, foi realizada a filtração do meio de cultura em papel Whatman nº 1, com auxílio de funil de Büchner e bomba de vácuo. O filtrado foi utilizado como fonte de enzima extracelular. A massa micelial foi lavada com água destilada por duas vezes, prensada entre folhas de papel de filtro para retirar o excesso de água e então congelada a -20°C por pelo menos 2 horas. A seguir, foi macerada com 2 volumes de areia fina lavada em ácido em um almofariz em banho de gelo. O macerado foi suspenso em água deionizada (cerca de 10 mL por grama de micélio). A suspensão resultante foi centrifugada por 15 minutos a 12.000 g e 4°C, para remoção da areia e restos celulares. O sobrenadante desta centrifugação foi utilizado como extrato bruto micelial.

### **3.8. Purificação das $\beta$ -glucosidases miceliais de *H. insolens***

O extrato bruto micelial de *H. insolens* foi precipitado com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  75% por uma noite em banho de gelo. A seguir, a suspensão foi centrifugada por 15 minutos a 17.000 g e 4°C e o precipitado foi dissolvido em cerca 15 mL de tampão Tris/HCl 50 mM pH 7,0. Em seguida, a amostra foi aplicada em coluna de filtração em gel de Sephadex G-

25 (32,0 x 2,0 cm), equilibrada no mesmo tampão de dissolução da amostra, para remoção do excesso de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Após eluição da coluna de Sephadex G-25, as frações apresentando maior atividade PNP-glucosidásica (ver item 3.8) foram reunidas e aplicadas numa coluna de DEAE-Fractogel (13,0 x 2,0 cm), também equilibrada em tampão Tris/HCl 50 mM pH 7,0. Após aplicada a amostra, a resina foi lavada no mesmo tampão até não ser mais detectada eluição de proteínas ( $A_{280}$ ). A seguir, a coluna foi eluída com um gradiente linear de NaCl (0-200 mM) no mesmo tampão, com fluxo de 80,0 mL/hora. Frações de 4,0 mL foram coletadas e analisadas para proteína ( $A_{280}$ ) e atividade PNP-glucosidásica. As frações com maior atividade foram reunidas, concentradas em filtro Amicon Ultra-30 (Millipore), e aplicadas numa coluna de filtração em gel de Sephacryl S-200 (130,0 x 2,0 cm) equilibrada e eluída com tampão fosfato 100 mM, pH 6,0, com fluxo de 15 mL/h. Frações de 4,0 mL foram coletadas e analisadas quanto a  $A_{280}$  e atividade PNP-glucosidásica. Após a cromatografia em Sephacryl S-200, dois picos de atividade  $\beta$ -glucosidásica foram separados. As  $\beta$ -glucosidases presentes em cada pico foram denominadas de acordo com a ordem de eluição. Assim, a forma eluída no primeiro pico foi denominada  $\beta$ -glucosidase de *Humicola* I (BGH I), e aquela eluída no segundo pico,  $\beta$ -glucosidase de *Humicola* II (BGH II). As frações com maior atividade, de cada pico, foram reunidas, aliqüotadas e armazenadas a 4°C.

### **3.9. Determinação da atividade aril $\beta$ -glucosidase**

A atividade  $\beta$ -glucosidásica foi rotineiramente acompanhada empregando o substrato sintético p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo (PNP-glu). A atividade PNP-

glucosidásica foi determinada descontinuamente, a 50°C, acompanhando-se a liberação do íon p-nitrofenolato ( $\epsilon_{410\text{nm}, \text{pH } 12} = 17500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). As condições padrão dos ensaios foram tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, contendo PNP-glu 0,5 mM num volume final de 0,6 mL para BGH I, e tampão Bis-Tris 50 mM, pH 6,0, contendo PNP-glu 2 mM num volume final de 0,6 mL para BGH II. A reação foi iniciada pela adição de 50  $\mu\text{L}$  da enzima convenientemente diluída ao meio reacional e interrompida pela adição de 1 ml de tetraborato de sódio saturado, em intervalos de tempo adequados. Controles sem adição de enzima foram incluídos com a finalidade de avaliar a hidrólise espontânea do substrato nas condições dos ensaios; as velocidades iniciais foram constantes por pelo menos 15 minutos, correspondendo a uma hidrólise sempre inferior a 5% do substrato inicial. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1  $\mu\text{mol}$  do substrato por minuto, 50°C. A atividade específica foi definida como a relação entre o número de unidades e a massa de proteína, em miligramas, presente no meio de reação (U/mg).

A atividade sobre os substratos sintéticos o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONP-Gal), p-nitrofenil- $\beta$ -D-fucopiranosídeo (PNP-Fuc), p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (PNP-Gal) e p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilanopiranosídeo (PNP-Xil) também foi estimada a partir da dosagem do íon p-nitrofenolato ( $\epsilon_{410\text{nm}, \text{pH } 12} = 17500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), nas mesmas condições descritas acima.

### **3.10. Determinação da atividade celobiase**

A atividade celobiase foi estimada nas mesmas condições padrão de ensaio (pH, temperatura, espécies tamponantes) descritas no item 3.8. As concentrações de celobiose no

meio reacional corresponderam a 2,5 mM para BGH I e 5,0 mM para BGH II. A reação foi interrompida, em diferentes intervalos de tempo, por aquecimento em banho de água fervente por 5 minutos. Em seguida, a glicose liberada foi estimada empregando o método da glicose-oxidase (Bergmeyer & Bernt, 1974), usando o kit da Labtest, Lagoa Santa, MG. O produto da reação, antipirilquinonimina vermelha, proporcional à glicose liberada, foi dosado em 505 nm. Controles sem adição de enzima foram incluídos com a finalidade de avaliar a hidrólise espontânea do substrato nas condições dos ensaios; as velocidades iniciais foram constantes por pelo menos 15 minutos, correspondendo a uma hidrólise sempre inferior a 5% do substrato inicial. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de glicose por minuto. A atividade específica foi definida como a relação entre o número de unidades e a massa de proteína, em miligramas, presente no meio de reação (U/mg).

### **3.11. Determinação da atividade sobre outros substratos**

A hidrólise dos substratos maltose, lactose e salicina foi acompanhada empregando o método da glicose oxidase (GOD), conforme descrito no item 3.9.

A hidrólise de Avicel, CMC, trealose, sacarose e papel filtro foi estimada pela dosagem de açúcares redutores, utilizando o método do ácido dinitrosalicílico (DNS, Miller 1959). A reação foi iniciada por adição ao meio reacional de 50  $\mu\text{L}$  da enzima em diluição conveniente, atingindo um volume final de 0,6 mL. A reação foi interrompida após intervalos de tempo adequados pela adição de 200  $\mu\text{L}$  do meio reacional à 200  $\mu\text{L}$  do reagente DNS. A mistura foi aquecida em banho de água fervente por 5 minutos e diluída com 2,0 mL de água destilada; o produto formado foi dosado espectrofotometricamente em

540 nm. A quantidade de açúcar redutor liberada foi estimada por meio de uma curva padrão de glicose.

Controles sem adição de enzima foram incluídos com a finalidade de avaliar a hidrólise espontânea de cada substrato nas condições dos ensaios; as velocidades iniciais foram constantes por pelo menos 15 minutos, correspondendo a uma hidrólise sempre inferior a 5% do substrato inicial. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a liberação de 1  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor ou glicose por minuto, nas condições dos ensaios. As condições padrão de reação (pH, temperatura, espécies tamponantes) para determinação da atividade hidrolítica sobre os diferentes substratos testados foram as mesmas descritas no item 3.8.

### **3.12. Tratamento dos dados cinéticos**

Os parâmetros cinéticos  $V$  (velocidade máxima),  $K_M$  (constante de Michaelis–Menten),  $K_{0,5}$  (constante de dissociação aparente) e  $n_H$  (coeficiente de Hill) foram calculados por regressão não-linear, empregando o programa SigrafW (Leone et al., 2005).

### **3.13. Dosagem de proteínas**

As concentrações de proteínas foram estimadas empregando-se o método descrito por Read & Northcote (1981), utilizando soroalbumina bovina como padrão.

### **3.14. Eletroforese e focalização isoeletrica**

Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes (PAGE) foi realizada em géis cilíndricos de acordo com a metodologia descrita por Davis (1964),



utilizando 7% de acrilamida. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi realizada em géis em placa, numa concentração de acrilamida de 10%, conforme descrito por Laemmli (1970). As bandas protéicas foram reveladas com o corante Coomassie Blue ou nitrato de prata (Blum et al.,1987). A atividade PNP-glucosidásica no gel, após PAGE, foi determinada por fatiamento do gel de poliacrilamida: após a corrida, o gel foi cortado em fatias de 5 mm e cada fatia foi adicionada a um tubo de ensaio contendo o meio reacional descrito no item 3.8 (0,6 mL/tubo). Após um intervalo de tempo adequado, a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de tetraborato saturado a cada tubo e a absorbância da solução foi medida em 410 nm.

Focalização isoeétrica das enzimas purificadas (25 µg) foi realizada em géis cilíndricos (6 X 130 mm) a 6% de acrilamida, contendo 5% (v/v) de solução de Pharmalyte (pH 3-10), segundo O'Farrell et al. (1977). Após a corrida (500V, 6 h), os géis contendo as amostras das enzimas foram lavados com tampão acetato de sódio 0,5M, pH 5,0, para enzima BGH I, e Bis-Tris 0,5 M, pH 6,0, para BGH II e a seguir incubados nestas soluções por 20 min à temperatura ambiente. A seguir, os géis foram transferidos para os tampões de medida de atividade de cada enzima e lavados por 60 minutos, com 3 trocas dos tampões. Finalmente, os géis foram cortados transversalmente em frações de 5 mm para a determinação da atividade PNP-glucosidásica, conforme descrito no item 3.8. Para a determinação do gradiente de pH, uma duplicata do gel, submetida às mesmas condições, foi fatiada em frações de 5 mm, sendo cada fatia tratada por uma noite com 2,5 mL de KCl 25 mM para extração dos anfólitos. A seguir, o pH de cada fração foi determinado.

### **3.15. Determinação das massas moleculares das enzimas purificadas**

As massas moleculares das cadeias polipeptídicas constituintes das enzimas purificadas foram estimadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, em condições desnaturantes (SDS-PAGE), conforme descrito por Laemmli (1970), empregando mistura padrão de massas moleculares pré-corada para proteínas entre 29 e 205 KDa (Sigma).

As massas moleculares aparentes das enzimas purificadas na forma nativa foram estimadas por filtração em gel em HPLC, utilizando uma coluna Bio-Sil SEC 400 (7,8 x 300 mm), da BIO-RAD. A coluna foi equilibrada e eluída com tampão fosfato 100 mM, pH 6,8, contendo NaCl 150 mM e azida de sódio 10 mM, com fluxo de 1,0 mL/min. Frações de 1,0 mL foram coletadas e analisadas pra atividade PNP-glucosidásica, conforme descrito no item 3.8. O volume morto da coluna (“void”) foi determinado usando blue dextran e as seguintes proteínas foram utilizadas para a calibração da coluna:  $\gamma$ -globulina bovina, ovoalbumina e mioglobina bovina.

### **3.16. Preparação e padronização de soluções de íons**

As soluções dos íons níquel, manganês, mercúrio, magnésio, cobalto, cálcio e zinco foram padronizados por titulação direta com EDTA, de acordo com metodologia descrita por Vogel (1989).

### **3.17. Dosagem de carboidratos neutros das $\beta$ -glucosidases purificadas**

O conteúdo de carboidratos das enzimas purificadas, BGH I e BGH II, foi estimado empregando o método descrito por Dubois et al. (1956). A cada alíquota das enzimas puras (cerca de 20  $\mu$ g de proteína cada), após diluição para 2 mL com água destilada, adicionou-

se 50 µL de fenol 80%, seguidos de 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, deixando-se a mistura em repouso por 10 min à temperatura ambiente. Após este período, foi determinada a absorbância a 490 nm. O mesmo procedimento foi realizado empregando solução padrão de manose.

### **3.18. Temperatura e pH ótimos, inativação térmica e estabilidade ao pH das enzimas purificadas**

O pH ótimo para as β-glucosidases purificadas foi estimado em tampão McIlvaine na faixa de pH entre 3 e 8, utilizando PNP-glu como substrato, a 50°C. Tampão McIlvaine foi preparado a partir de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M e ácido cítrico 0,1 M conforme descrito por McIlvaine (1921).

O efeito da temperatura sobre a velocidade de reação foi avaliado entre 40 e 80°C. A termoestabilidade das duas formas de β-glucosidases foi avaliada em água: alíquotas das soluções de enzima foram incubadas nas temperaturas desejadas (45 a 60°C), e, após interrupção da inativação por imersão em banho de gelo picado por 1 min, quantificou-se a atividade residual.

A estabilidade ao pH foi estimada mantendo-se as enzimas purificadas em tampão McIlvaine, numa faixa de pH entre 3 e 8, por um intervalo de 24 horas, em geladeira, determinando-se a seguir a atividade residual.

Exceto na determinação do pH ótimo, as dosagens de atividade foram realizadas conforme descrito no item 3.8, empregando PNP-glu como substrato.

### **3.19. Distribuição celular das $\beta$ -glucosidases**

A distribuição celular das  $\beta$ -glucosidases foi determinada em etapas. Primeiramente determinou-se a fração de atividade total ligada ao micélio, a partir da dosagem da atividade do micélio intacto lavado com água resfriada. Na segunda etapa, o micélio foi macerado com areia tratada e centrifugado, dosando-se a atividade no meio intracelular e no precipitado. Finalmente, o micélio foi tratado com HCl diluído, lavado e macerado e a seguir quantificou-se a atividade do meio intracelular. As duas formas de  $\beta$ -glucosidase foram diferenciadas pela mediada de atividade no pH ótimo de cada enzima, na presença e ausência de glicose.

### **3.20. Caracterização de BGH II purificada por análise de Espectrometria de Massas**

A  $\beta$ -glucosidase purificada BGH II foi submetida a digestão por tripsina por 18 h a 37°C, utilizando 0,5  $\mu$ g de tripsina modificada (Promega Co.). Os peptídeos trípticos foram dessalinizados numa microponteira preenchida com resina POROS R2 (PerSeptive Biosystems), previamente equilibrada em ácido fórmico 0,2%. A mistura de peptídeos foi eluída com uma mistura contendo 60% de metanol e 5% de ácido fórmico para análise por espectrometria de massa (MS). O amostrador (“plate”) foi preparado pela adição de partes iguais da mistura de peptídeos e da matriz (ácido 4-hidroxicinâmico 10 mg/mL). As análises por espectrometria de massas (MS-MALDI) foram realizadas no espectrômetro de massas Axima Performance MALDI-TOFTOF (Shimadzu-Kratos, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). A caracterização da seqüência de aminoácidos da proteína foi realizada com base nas análises do perfil de massas dos peptídeos trípticos (“MS-fingerprint”) e do padrão de

fragmentação dos íons *b* e *y* de alguns peptídeos selecionados em experimentos de dissociação por colisão (CID-MS/MS). Os espectros de CID foram submetidos diretamente a análise no banco de dados MASCOT (<http://matrixscience.com>) no National Center for Biotechnology Information (NCBIInr).

### **3.21. Estudo da ação sinérgica de BGH II e extratos brutos ricos em celulases na hidrólise de bagaço de cana e papel**

A hidrólise de papel de filtro picado ou bagaço de cana explodido foi realizada em frascos de Erlenmeyer de 50 mL, hermeticamente fechados, a 40°C e sob agitação orbital (100 rpm). As condições de reação foram tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, contendo 5% de papel de filtro ou bagaço e 2 mM de azida de sódio, num volume final de 10 mL. A reação foi iniciada pela adição de 1,5 U de atividade celulásica sobre papel de filtro (FPU) do extrato bruto rico em celulases obtido a partir do cultivo do mutante hipersecretor de *T. reesei* (ver item 3.11). Alternativamente, foi adicionada aos frascos de reação uma mistura de 1,5 FPU de *T. reesei* e 1,0 U de BGH II purificada. Alíquotas de meio reacional foram retiradas após intervalos de tempo convenientes e a eficiência de sacarificação foi avaliada a partir da determinação de açúcares redutores totais presentes no meio reacional, empregando o método do ácido dinitrosalicílico (DNS), segundo Miller (1959).

Bagaço submetido a explosão a vapor foi gentilmente cedido pela usina Nardini Agroindustrial Ltda, Vista Alegre do Alto, São Paulo, Brasil. Bagaço *in natura*, recém saído da moenda, foi tratado com vapor d'água a 14 kg/cm<sup>2</sup>, por 8 min, seguido por uma rápida expansão. O material tratado foi exaustivamente lavado com água deionizada até

que não fossem detectados açúcares redutores, empregando o método do DNS. Após a lavagem, o bagaço foi seco em estufa a 40°C e estocado à temperatura ambiente.

## 4. Resultados

### 4.1. Produção de $\beta$ -glucosidases por *H. insolens*

Inicialmente investigou-se o melhor meio para o cultivo de *H. insolens*, visando à máxima produção de atividade  $\beta$ -glucosidásica. Como pode ser observado na Tabela 1, os maiores níveis de atividade  $\beta$ -glucosidase foram observados nos meios 1 e 3. No meio 3 ocorreu a maior produção de  $\beta$ -glucosidases extracelulares (cerca de 42800 U totais em 100 mL de meio), aproximadamente 4 vezes superior à observada para o meio 1. As enzimas extracelulares em geral são mais fáceis de obter e purificar e por isso o meio 3 é aparentemente mais vantajoso para a produção de  $\beta$ -glucosidases por *H. insolens*. No entanto, resultados preliminares mostraram que a atividade  $\beta$ -glucosidase do extrato bruto extracelular deste microorganismo apresentava inibição por glicose, enquanto o extrato bruto intracelular mostrava alta tolerância e até estimulação por glicose. Desta forma, o meio 1, com uma produção de 56600 U totais de  $\beta$ -glucosidase intracelular (cerca de 1,7 vezes superior ao meio 3) foi escolhido como meio padrão para o cultivo, uma vez que o objetivo principal do projeto foi a obtenção de enzimas tolerantes a glicose.

A figura 3 mostra o perfil da atividade PNP-glucosidásica e celobiásica do extrato bruto intracelular após eletroforese em condições não desnaturantes (PAGE). Observa-se a presença de dois picos de atividade, sendo um localizado no início do gel (pico I) e outro na porção inferior do gel (pico II), o que demonstra a presença de 2 formas de  $\beta$ -glucosidase no meio intracelular. A coincidência entre os picos de atividade PNP-glucosidásica e celobiásica demonstra que as duas formas hidrolisam ambos os substratos, PNP-glu e celobiose. Mais importante, a análise da atividade sobre pNP-Glu em presença de glicose

100 mM mostrou uma forte estimulação para a forma correspondente ao pico II, enquanto a outra forma teve sua atividade fortemente inibida.

Resultados similares foram obtidos para o extrato bruto extracelular, à exceção do fato da forma inibida por glicose encontrar-se em maior proporção. Para simplificar, as duas formas distintas de  $\beta$ -glucosidases encontradas nos meios intra- e extracelular foram denominadas  $\beta$ -glucosidase de *Humicola* I (BGH I, inibida por glicose) e  $\beta$ -glucosidases de *Humicola* II (BGH II, estimulada por glicose).

Posteriormente à escolha do melhor meio para produção de  $\beta$ -glucosidases intracelulares, foram realizados experimentos com o objetivo de definir o tempo para produção máxima de atividade enzimática. A Figura 4 apresenta o perfil de produção de  $\beta$ -glucosidases intracelulares em função do tempo. Observou-se uma produção equivalente das formas BGH I e BGH II até cerca de 120 horas. Entretanto, enquanto a produção de BGH I foi crescente em todo o intervalo de tempo testado (14 dias), a produção de BGH II aumentou até 96 horas, mantendo-se constante para tempos maiores. Já o estudo da produção de  $\beta$ -glucosidases no meio extracelular, apresentado na Figura 5, mostra que a máxima atividade específica para ambas as formas ocorreu após 168 h de cultivo (7 dias), embora com valores cerca de 3 vezes superiores para a forma BGH I. Comparando as figuras 3 e 4, observa-se ainda que a atividade  $\beta$ -glucosidásica específica é cerca de 5 vezes maior no meio intracelular, para ambas as formas da enzima. Similarmente, a atividade total no meio intracelular é cerca de 8 vezes maior para a forma BGH II e 4 vezes maior para a forma BGH I.

A partir destes resultados, fixou-se o tempo de cultivo em 96 horas (4 dias) considerando-se que neste intervalo de tempo tem-se a máxima atividade específica de  $\beta$ -



glucosidase intracelular do tipo BGH II (estimulada por glicose), alvo preferencial deste estudo.

**Tabela 1: Efeito da composição do meio de cultivo sobre a produção de atividade  $\beta$ -glucosidásica intra e extracelular por *H. insolens*.**

Meio de cultivo* (100,0 mL)	Atividade intracelular (Utotal)	Atividade intracelular (U/mg)	Atividade extracelular (Utotal)	Atividade extracelular (U/mg)
1	56603	6166	12065	635
2	5070	1447	10440	232
3	33743	3143	42801	2594
4	32375	2791	6090	210
5	586,2	202,6	3422	74,4
6	16575	2576	6640	831

\* Os meios de cultivo (pH 6,0) continham avicel 0,75% acrescida de:

Meio 1:  $K_2HPO_4$  0,1%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,05%, traços de elementos (25  $\mu$ L/50 mL de meio, extrato de levedura 0,8%;

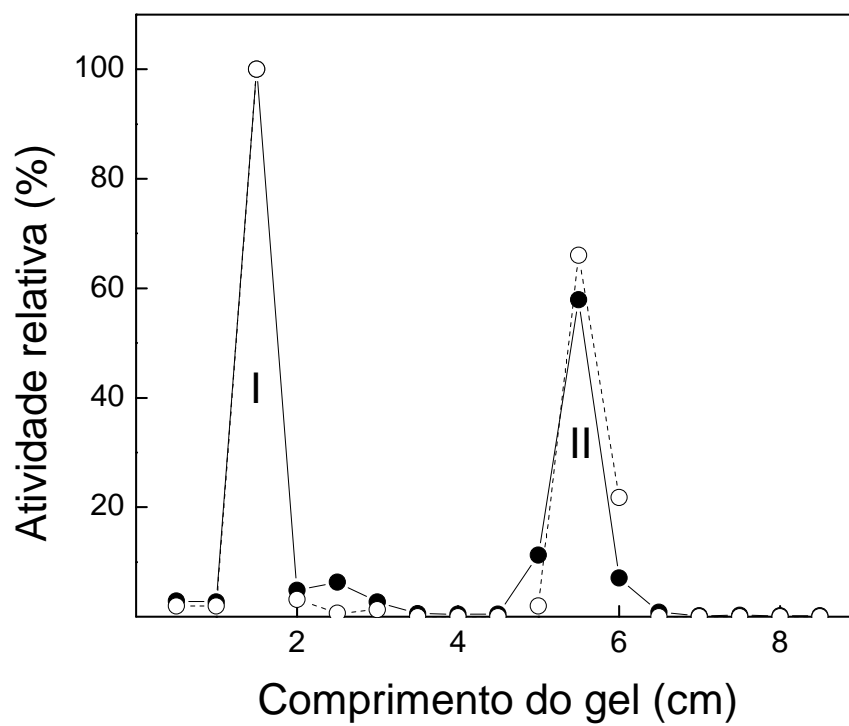
Meio 2:  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,05%,  $CaCl_2$  0,1 %,  $NaCl$  0,5 %, peptona 0,1%, extrato de levedura 0,8%;

Meio 3:  $NaNO_3$  0,3%,  $K_2HPO_4$  0,1%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,05%,  $KCl$  0,05%, traços de elementos (25  $\mu$ L/50 mL de solução), extrato de levedura 0,8%;

Meio 4: extrato de levedura 0,8%,  $H_2O$  destilada 75%,  $H_2O$  de torneira 25 %;

Meio 5: extrato de malte 0,8%;

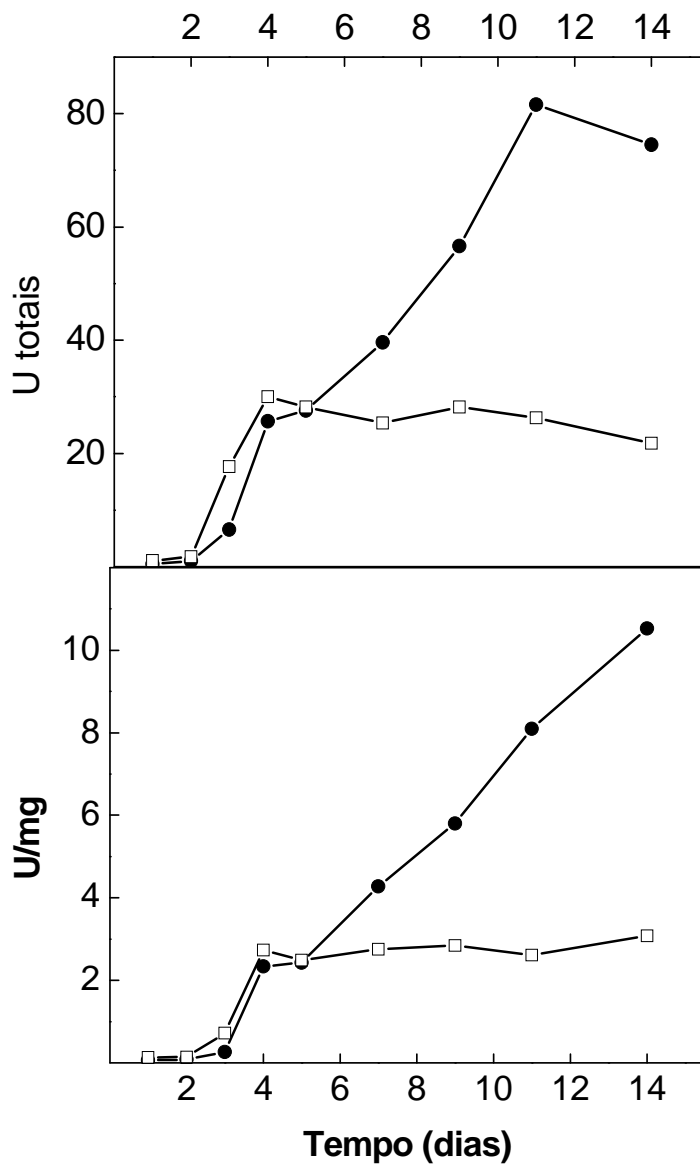
Meio 6:  $K_2HPO_4$  0,1%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,05%, extrato de levedura 0,4%,  $H_2O$  destilada 75%,  $H_2O$  de torneira 25 %.



**Figura 3. Perfil de atividade  $\beta$ -glucosidásica intracelular após PAGE**

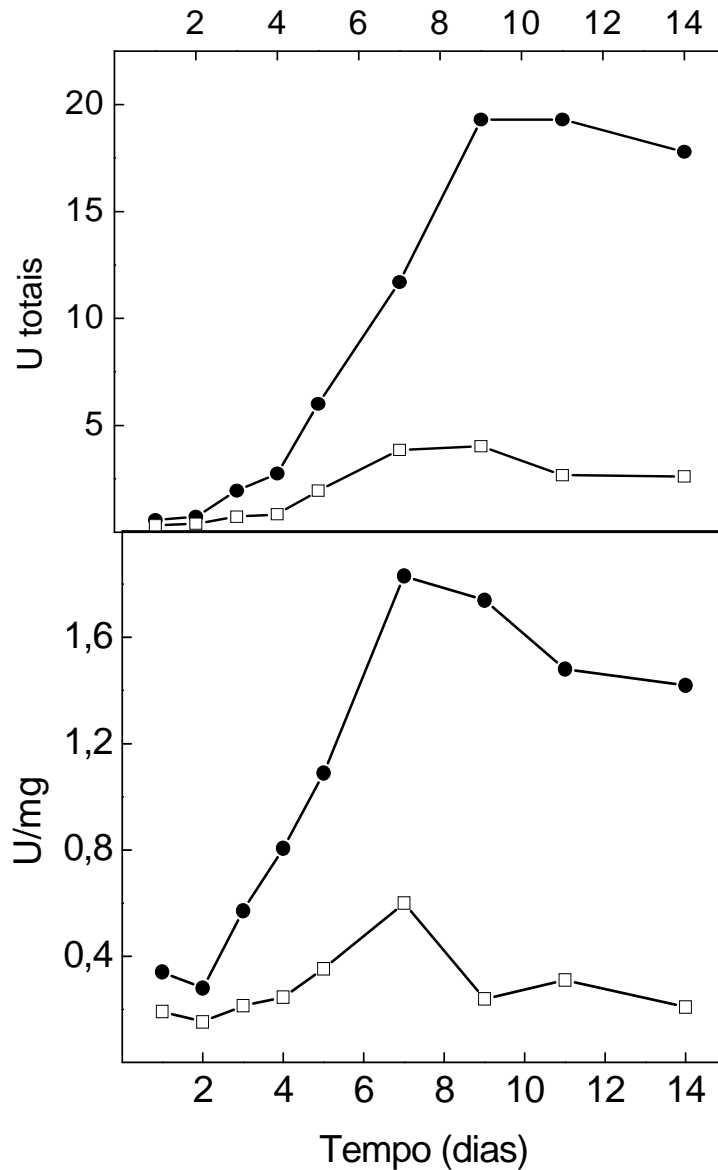
A eletroforese foi realizada em géis a 7% de acrilamida, conforme descrito em Materiais e Métodos, empregando 204  $\mu$ g de proteína. Após o término da eletroforese, o gel foi seccionado em frações de 0,5 cm. A seguir, cada fração foi subdividida em duas partes iguais, sendo uma delas ensaiada para atividade sobre PNP-Glu e a outra sobre celobiose. A atividade PNP-Glucosidásica foi determinada a 50°C, em tampão Bis-Tris 50 mM, pH 6,0, contendo PNP-Glu 2 mM. A atividade celobiásica foi determinada a 50° nas mesmas condições, empregando celobiose 10 mM.

(-●-) PNP-Glu; (--○--) celobiose.



**Figura 4. Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de  $\beta$ -glucosidases intracelulares por *H. insolens***

*Humicola insolens* foi cultivado em 100 mL de meio de cultura contendo  $K_2HPO_4$  0,1%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,05%, 25  $\mu L$  de solução de traços de elementos, extrato de levedura 0,8% e avicel 0,75%, pH 6,0. A atividade foi determinada a 50°C, num volume final de 0,6 mL, empregando tampão acetato 50 mM, pH 5,0 contendo PNP-Glu 0,5 mM, para BGH I (●), e tampão Bis-Tris 50 mM, pH 6,0 contendo PNP-Glu 2 mM para BGH II (□).



**Figura 5. Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de  $\beta$ -glucosidases extracelulares por *H. insolens***

*Humicola insolens* foi cultivado em 100 mL de meio de cultura contendo  $K_2HPO_4$  0,1%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,05%, 25  $\mu$ L de solução de traços de elementos, extrato de levedura 0,8% e avicel 0,75%, pH 6,0. A atividade foi determinada a 50°C, num volume final de 0,6 mL, empregando tampão acetato 50 mM, pH 5,0 contendo PNP-Glu 0,5 mM, para BGH I (●), e tampão Bis-Tris 50 mM, pH 6,0 contendo PNP-Glu 2 mM para BGH II (□).

#### 4.3. Distribuição sub-celular das $\beta$ -glucosidases de *H. insolens*

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos para o estudo da distribuição da atividade  $\beta$ -glucosidásica de *H. insolens*, utilizando o substrato PNP-Glu. Observam-se distribuições sub-celulares muito distintas para BGH I e BGH II, sugerindo que estas enzimas desempenham funções diferentes no microorganismo. Enquanto BGH I apresenta sua maior fração no espaço periplasmático, cerca de 50%, aproximadamente 70% de BGH II localiza-se no citoplasma. Esta diferença de distribuição pode estar relacionada ao fato da atividade de BGH I no meio extracelular ser muito superior à de BGH II, uma vez que, localizada principalmente no periplasma, BGH I tem acesso mais fácil ao meio extracelular que BGH II. É interessante notar que, com o envelhecimento da cultura, parte de BGH II foi liberada para o meio extracelular, provavelmente por autólise das células.

**Tabela 2. Distribuição sub-celular das  $\beta$ -glucosidases de *H. insolens***

Fração	BGH I (%)	BGH II (%)
Citosol	28	70
Espaço periplasmático	52	24
Parede celular	20	6

A atividade foi determinada a 50°C em tampão Bis-Tris 50 mM, pH 6,0 contendo PNP-Glu 2 mM e em tampão acetato 50 mM, pH 5,0 contendo PNP-Glu 0,5 mM, em volume final de 0,6 mL. As atividades também foram estimadas na presença de glicose 60 mM, para possibilitar a determinação da atividade de BGH I e BGH II separadamente.

#### 4.4. Purificação das $\beta$ -glucosidases miceliais de *H. insolens*

O extrato bruto micelial de *H. insolens* foi inicialmente precipitado com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  75%. A etapa de precipitação mostrou-se eficiente como método de partida, resultando numa purificação de cerca de 1,5 vezes, com rendimento de 97%. A etapa seguinte consistiu na dessalificação da amostra em coluna de Sephadex G-25 (32,00 x 2,00 cm), foi importante, uma vez que inicialmente foram realizadas diálises para remoção do sal, mas esta técnica sempre ocasionava em grande perda de atividade, possivelmente devido à aderência da enzima ao tubo de diálise.

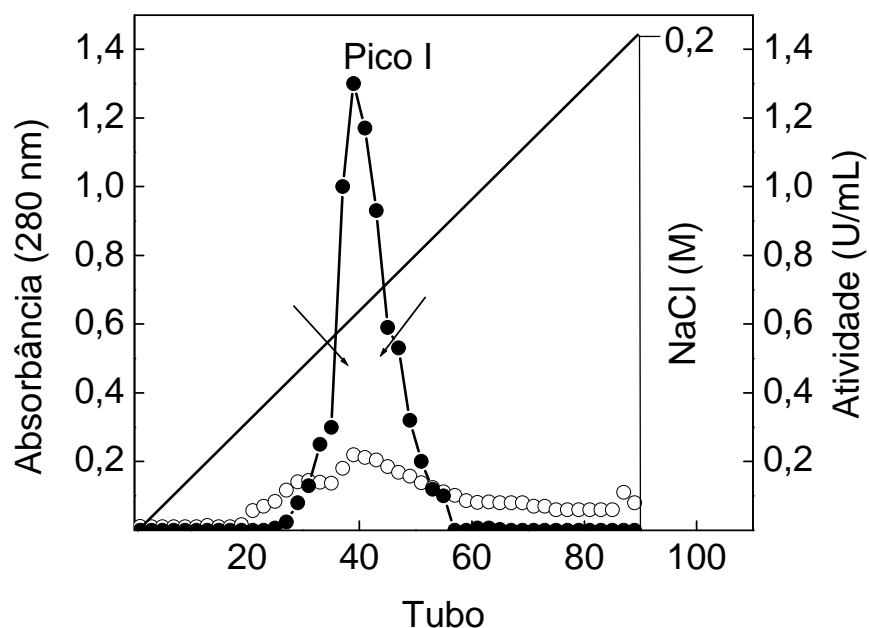
As frações apresentando maior atividade foram reunidas e aplicadas em coluna de troca iônica. As primeiras tentativas de purificação das  $\beta$ -glucosidases miceliais de *H. insolens* foram realizadas utilizando resinas com matriz celulósica (DEAE-celulose, CM-celulose). Entretanto, as  $\beta$ -glucosidases de *H. insolens* interagiram fortemente com a matriz, independentemente da carga da resina empregada, resultando em perda total da atividade. Assim, utilizou-se uma resina com matriz não-celulósica, DEAE-Fractogel. Após aplicação da amostra a coluna foi lavada até não ser mais detectada a eluição de proteínas (Abs 280 nm), em seguida um único pico de atividade foi eluído da coluna, com a aplicação de um gradiente crescente de NaCl de 0 a 200 mM. As amostras com alta atividade  $\beta$ -glucosidase eluídas da coluna foram reunidas e aplicadas em uma coluna de filtração em gel de Sephacryl S-200 (Figura 7). Dois picos de atividade foram eluídos: o primeiro pico correspondeu à forma inibida por glicose (BGH I), enquanto o segundo correspondeu à forma estimulada por glicose (BGH II).

As amostras purificadas foram estocadas em geladeira e tiveram sua atividade testada periodicamente para análise da estabilidade. A forma BGH I apresentou um

decaimento linear da ordem de aproximadamente -0,74% ao dia, e outras formas de armazenamento estão sendo estudadas para esta enzima. A enzima BGH II não apresentou perda significativa de atividade nessas condições, por até 3 meses.

Um resumo das etapas de purificação está apresentado na Tabela 3. Observa-se que BGH I foi purificada 27,5 vezes, com um rendimento de apenas 7,9%, atingindo uma atividade específica de 25 U/mg. Já BGH II foi purificada 16,5 vezes, com um rendimento cerca de 4 vezes maior (30 %) e atividade específica de 15,2 U/mg.

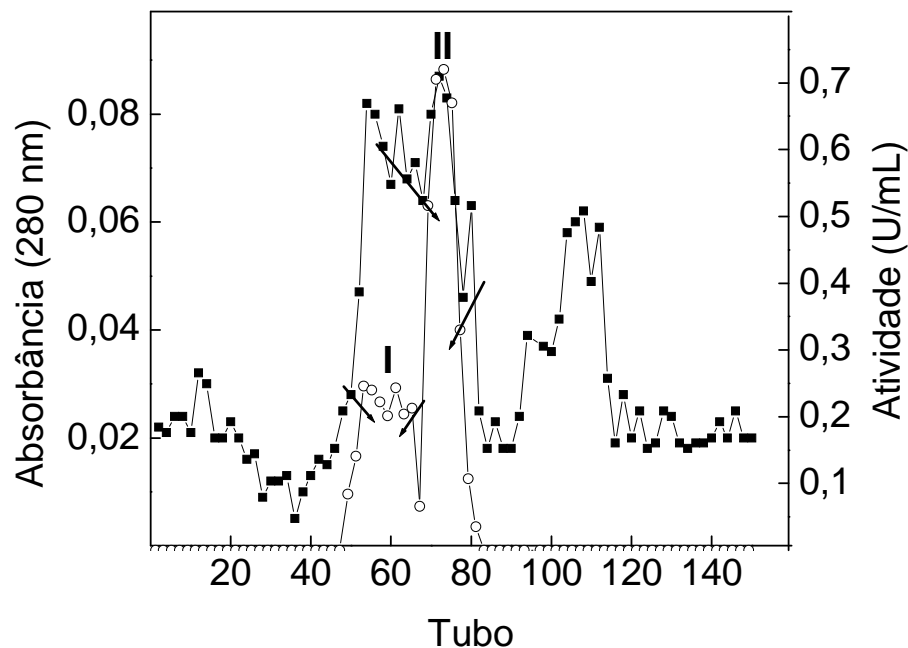
A análise de BGH I e BGH II por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não-desnaturantes (PAGE) revelou uma banda protéica única para cada amostra (Fig. 8), indicando a obtenção das duas formas de  $\beta$ -glucosidase miceliais na sua forma pura. Géis em duplicata, analisados para atividade PNP-glucosidásica, mostraram apenas um pico, coincidente com a banda protéica revelada para BGH I ou BGH II (resultado não mostrado). Estes resultados confirmam a obtenção das duas formas de  $\beta$ -glucosidase em estado puro, por meio de uma mesma estratégia de purificação.



**Figura 6. Perfil cromatográfico da atividade  $\beta$ -glucosidásica micelial de *H. insolens* precipitada com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em coluna de DEAE-fractogel**

A coluna (13,0 x 2,0 cm) Tris/HCl 50 mM pH 7,0, lavada exaustivamente com o mesmo tampão até a eluição completa de proteínas não ligadas e a seguir eluída com um gradiente linear de NaCl (0-200 mM) no mesmo tampão. Frações de 4,0 mL foram coletadas, com um fluxo de 80 mL/hora, e analisadas para atividade PNP-glucosidásica (●) e absorbância em 280 nm (○). As frações com maior atividade, correspondentes ao pico I (setas), foram reunidas.





**Figura 7. Perfil cromatográfico do pico I obtido da cromatografia em DEAE-Fractogel em coluna de Sephacryl S-200**

A amostra correspondente ao pico I-DEAE foi aplicada numa coluna de filtração em gel de Sephacryl S-200 (130,0 x 2,0 cm), equilibrada e eluída com tampão fosfato de sódio 100 mM pH 6,0, com fluxo de 15 mL/h. Frações de 4,0 mL foram coletadas e analisadas para atividade PNP-glicosidásica (●) e absorbância em 280 nm (○). As frações com maior atividade, correspondentes aos picos I (BGH I) e II (BGH II) (setas), foram reunidas separadamente, aliquotadas e mantidas a 4° C.

**Tabela 3. Purificação das  $\beta$ -glucosidases miceliais de *Humicola insolens***

<b>Etapa</b>	<b>Atividade Específica (U/mg)</b>	<b>Unidades Totais (U)</b>	<b>Proteína Total (mg)</b>	<b>Rendimento (%)</b>	<b>Purificação (vezes)</b>
<b>Extrato Bruto</b>	0,92	51,8	100	-	-
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	1,34	40,4	51,5	78,0%	1,46
<b>DEAE- fractogel</b>	1,62	35,5	37,3	68,5%	1,57
<b>Concentração da amostra</b>	1,62	33,8	35,5	65,2%	1,57
<b>Pico I- Sephacryl</b>	25	4,1	0,28	7,90%	27,5
<b>Pico II- Sephacryl</b>	15,2	15,5	1,5	30,0%	16,5



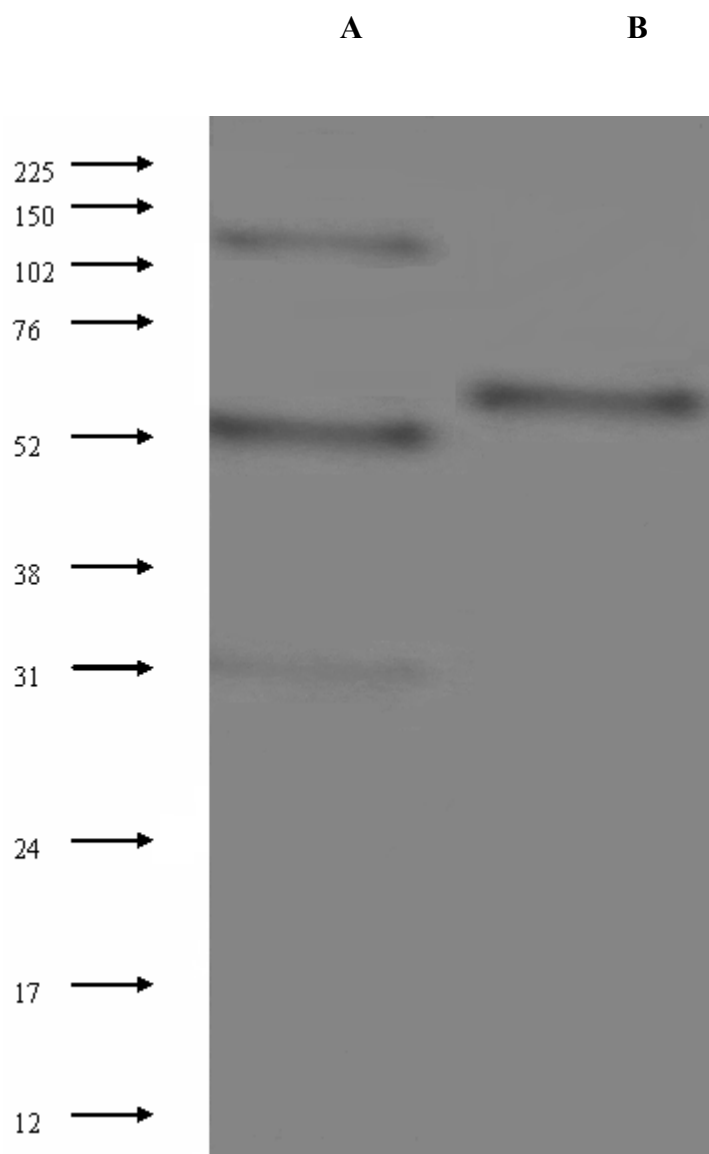
**Figura 8. Eletroforese em condições não desnaturantes das  $\beta$ -glucosidases miceliais purificadas de *H. insolens***

As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% em condições não desnaturantes, conforme descrito em Materiais e Métodos. As bandas protéicas foram reveladas com Comassie Blue. Linha A, pico I Sephacryl (BGH I), 40  $\mu$ g de proteína; Linha B, pico II Sephacryl (BGH II), 20  $\mu$ g de proteína.

#### **4.5. Propriedades Moleculares das $\beta$ -glucosidases purificadas**

O conteúdo de carboidratos estimado para as  $\beta$ -glucosidases purificadas de *H. insolens* foi de 51% para BGH I e de 21% para BGH II (p/p). A focalização isoelétrica da forma BGH II revelou um pI de cerca de 3,8. As massas moleculares aparentes das enzimas, estimadas por filtração em gel em HPLC, corresponderam a 282 kDa para BGH I e 94 kDa para BGH II.

A eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) das duas enzimas purificadas está apresentada na Figura 9. A análise de BGH I revelou 3 bandas, com massas moleculares aparentes de 31 kDa, 52 kDa e 132 kDa. Já para BGH II, observou-se uma única banda protéica, correspondente a 55 kDa, confirmando a pureza da preparação. Analisados em conjunto, os resultados de filtração em gel e SDS-PAGE sugerem que BGH II é um dímero de subunidades idênticas. Por outro lado, BGH II pode apresentar estrutura tetramérica.



**Figura 9. Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) das  $\beta$ -glucosidases intracelulares purificadas de *H. insolens***

As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% em condições desnaturantes, conforme descrito em Materiais e Métodos. As bandas protéicas foram reveladas com nitrato de prata. Linha A, BGH I, 5  $\mu$ g de proteína; Linha B, BGH II, 5  $\mu$ g de proteína.

#### 4.5.1. Análise de BGH II purificada por espectrometria de massas

A enzima BGH II purificada foi caracterizada por espectrometria de massas após hidrólise enzimática com tripsina (Fig. 10). Nove peptídeos trípticos foram detectados nos espectros de MALDI-TOF-MS: m/z 882.5 (FSISWSR); m/z 975.5 (YFNDYVR); m/z 1287.7 (SLKPLFDSLIR); m/z 1443.6 (IADGSSGAVACDSYK); m/z 1461.6 (EEFAADENYAR); m/z 1675.8 (FGVTYVDYANDQKR); m/z 1725.9 (EPWIVGHNILIAHAR); m/z 2071.0 (WGFATTAYQIEGSVNEDGR), e m/z 2241.1 (YGGFLNKEEFAADFENYAR). A análise das massas dos peptídeos trípticos (“peptide mass fingerprint”), assim como suas seqüências de aminoácidos, obtidas por CID-MS/MS de alta energia, geraram dados suficientes para demonstrar que BGH II apresenta similaridade com a  $\beta$ -glucosidase de *Humicola grisea* var. *thermoidea* (acc. number # BAA74958). Os fragmentos trípticos analisados representaram cerca de 22% da seqüência de aminoácidos de BGH II.



```

1 MSLPPDFKWG FATAAYQIEG SVNEDGRGPS IWDTFCAIPG KIADGSSGAV
51 ACDSYKRTKE DIALLKELGA NSYRFSISWS RIIPLGGRND PINQKGIDHY
101 VKFVDDLIEA GITPFITLFH WDLPDALDKR YGGFLNKEEF AADFENYARI
151 MFKAIPKCKH WITFNEPWCS AILGYNTGYF APGHTSDRSK SPVGDSAREP
201 WIVGHNILIA HARAVKAYRE DFKPTQGGEI GITLNGDATL PWDPEDPADI
251 EACDRKIEFA ISWFADPIYF GKYPDSMRKQ LGDRLPEFTP EEVALVKGSN
301 DFYGMNHYTA NYIKHKTGVP PEDDFLG NLE TLFYNKYGDC IGPETQSFWL
351 RPHAQGFRDL LNWL SKRYGY PKIYVTENGT SLKGENDMPL EQVLEDDFRV
401 KYFN DYVRAM AA VAEDGCN VRGYLAWSLL DNFEWAEGYE TRFGVTYVDY
451 ANDQKRYPKK SAKSLKPLFD SLIRKE

```

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Sequence
75 - 81	882.5000	881.4927	881.4395	0.0532	0	R.FSISWSR.I
402 - 408	976.5100	975.5027	975.4450	0.0577	0	K.YFN DYVR.A
464 - 474	1288.7900	1287.7827	1287.7551	0.0277	0	K.SLKPLFDSLIR.K
42 - 56	1443.6900	1442.6827	1442.6347	0.0480	0	K.IADGSSGAVACDSYK.R
138 - 149	1461.6800	1460.6727	1460.6208	0.0519	0	K.EEFAADFENYAR.I
443 - 456	1675.8500	1674.8427	1674.8002	0.0425	1	R.FGVTYVDYANDQKR.Y
199 - 213	1725.9900	1724.9827	1724.9474	0.0353	0	R.EPWIVGHNILIAHAR.A
9 - 27	2071.0100	2070.0027	2069.9443	0.0584	0	K.WGFATAAYQIEGSVNEDGR.G
131 - 149	2241.1000	2240.0927	2240.0174	0.0753	1	R.YGGFLNKEEFAADFENYAR.I

**Figura 10. Análise de BGH II por espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF-MS)**

Espectro de massa dos peptídeos trípticos, sequenciamento dos peptídeos e resultados do banco de dados MASCOT.

## **4.6. Caracterização Cinética das $\beta$ -glucosidases purificadas de *H. insolens***

### **4.6.1. Efeito do pH e temperatura sobre a atividade PNP-glucosidásica**

As formas purificadas de  $\beta$ -glucosidases BGH I e BGH II apresentaram comportamentos distintos em função do aumento da temperatura, numa faixa entre 40 e 70°C. Observou-se um aumento gradual da atividade  $\beta$ -glucosidásica de BGH I a partir de 40°C, atingindo 44,5 U/mg a 60°C e mantendo-se muito ativa ainda a 65°C. Uma queda considerável de atividade foi observada a partir de 70°C (Figura 11A). Para a forma BGH II, ocorreu um aumento gradual da atividade a partir de 40°C e a temperatura ótima observada também foi de 60°C. Entretanto, a atividade caiu para apenas 7% da atividade máxima já a 65°C (Figura 11B).

A figura 12 mostra a influência do pH sobre a atividade de ambas as formas de  $\beta$ -glucosidases purificadas. Assim como observado para a temperatura, podemos notar perfis distintos para as duas formas. A forma BGH I (figura 12 A) apresentou pH ótimo em 5,0 e a atividade decaiu cerca de 20% quando o valor do pH variou de apenas 0,5 unidade acima ou abaixo do valor ótimo. Em contraste, BGH II (figura 12 B) apresentou uma faixa mais ampla de pH ótimo, com atividade relativamente constante entre 5,5 e 7,0, decaindo para cerca de 60% da atividade máxima em pH 7,5.

A partir destes resultados, estabeleceu-se pH 5,0 como condição padrão para a dosagem da atividade de BGH I e pH 6,0 para dosagem de atividade de BGH II.

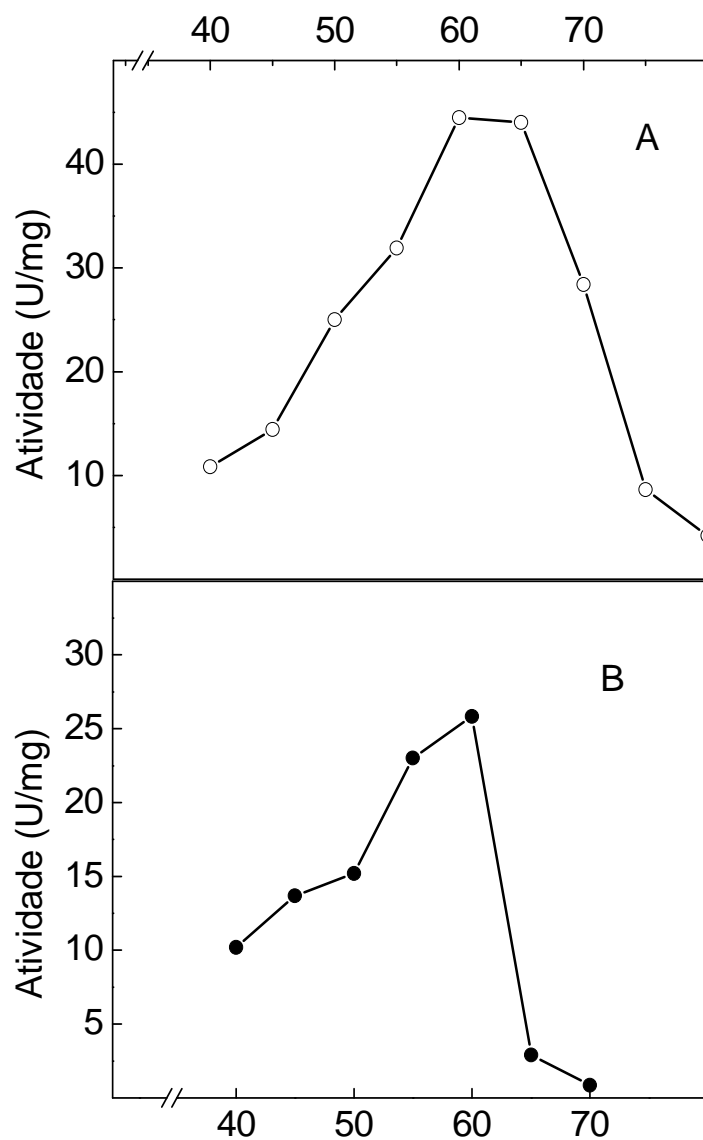
### **4.6.2. Estabilidade térmica e ao pH**

Ambas as enzimas purificadas de *H. insolens* mostraram-se termoestáveis por 60 min quando incubadas em água em temperaturas até 50°C (Figura 13). Para a forma BGH I,



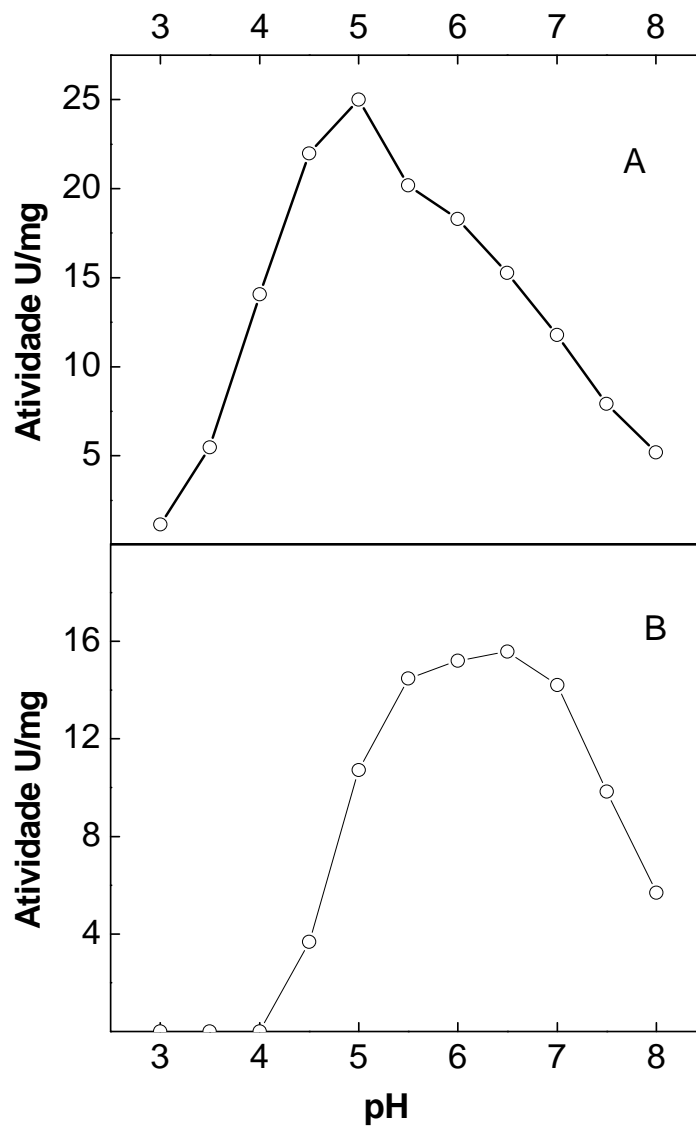
os tempos de meia-vida corresponderam a 50 min a 60°C e superior a 2 horas a 55 °C (Figura 13A). Para a forma BGH II, o tempo de meia-vida a 55°C correspondeu a 40 min (Figura 13B). Apesar da temperatura ótima observada para ambas as enzimas ser de 60°C (Figura 11), nenhuma delas apresentou estabilidade nesta temperatura. Assim, como não ocorrem perdas significativas de atividade a 50°C, fixou-se esta temperatura para outros testes com ambas as enzimas purificadas.

A estabilidade das enzimas purificadas ao pH está apresentada na Figura 14. A forma BGH I mostrou-se extremamente estável na faixa de pH 5,0 a 8,0, mantendo cerca de 99% da atividade em pH 8,0. Entretanto, foi bastante sensível a condições de pH menor que 4,0, mantendo apenas cerca de 10% de sua atividade em pH 3,0 (Fig. 14A). Já a forma BGH II mostrou-se estável entre pH 6,0 e 8,0, ocorrendo mesmo uma estimulação da atividade nesta faixa de pH (Fig. 14B). Entretanto, a atividade diminuiu gradualmente em pH menor que 6,0 e a enzima foi completamente inativada em pH menor ou igual a 4,0.



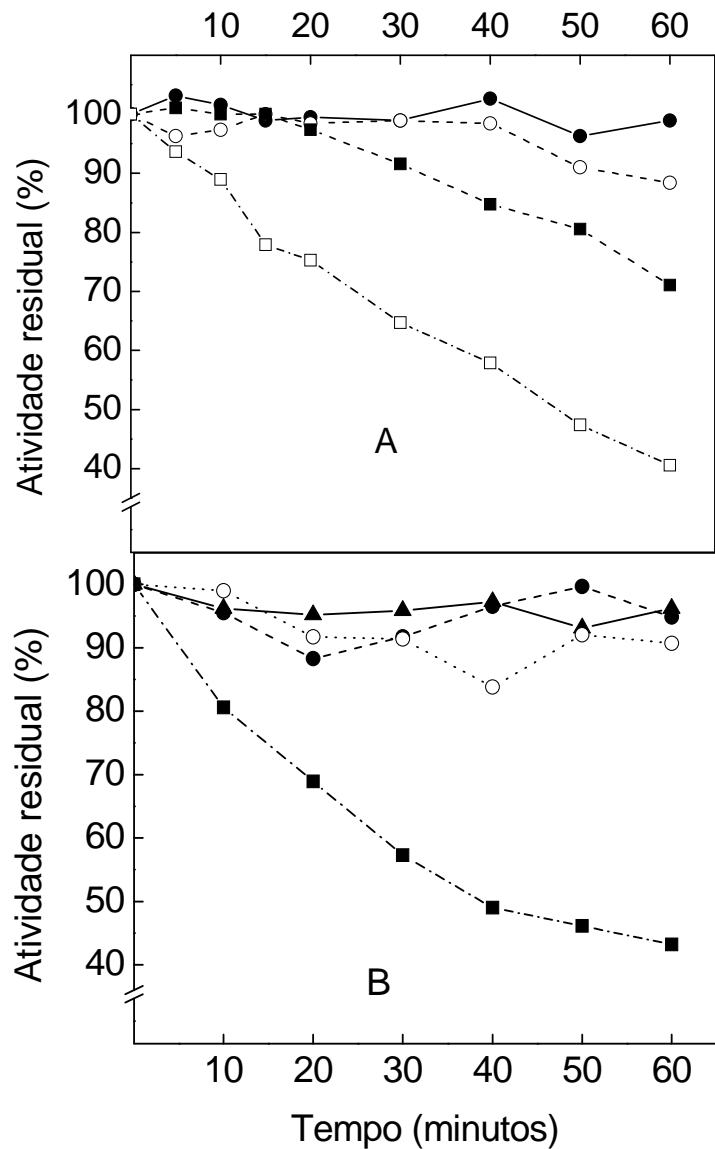
**Figura 11. Efeito da temperatura sobre a atividade  $\beta$ -glucosidásica**

A atividade foi determinada em diferentes temperaturas, num volume final de 0,6 mL, empregando tampão acetato 50 mM, pH 5,0 contendo PNP-Glu 0,5 mM, para BGH I (A), e tampão Bis-Tris 50 mM, pH 6,0 contendo PNP-Glu 2 mM para BGH II (B)



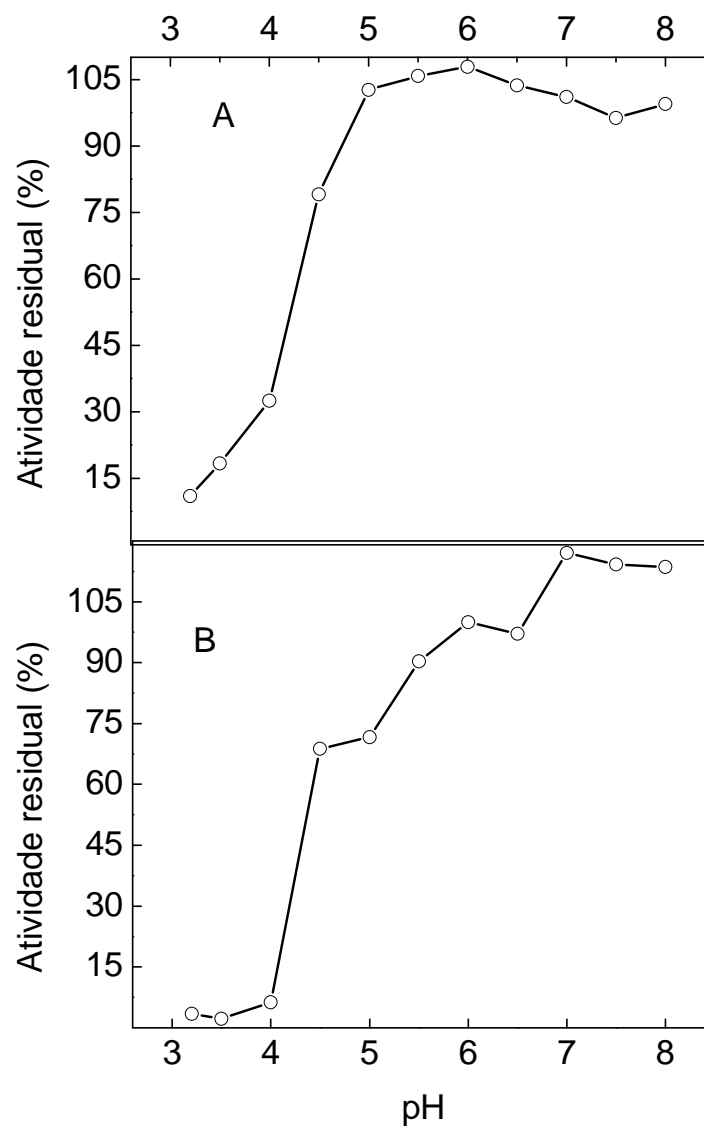
**Figura 12. Efeito do pH sobre a atividade  $\beta$ -glucosidásica**

A atividade foi determinada a 50 °C, num volume final de 0,6 mL, empregando tampão McIlvaine em diferentes pH, contendo PNP-Glu 0,5 mM, para BGH I (A), e PNP-Glu 2 mM para BGH II (B).



**Figura 13. Estabilidade térmica das  $\beta$ -glucosidases purificadas de *H. insolens***

As enzimas purificadas foram incubadas em água em diferentes temperaturas e após intervalos de tempo adequados a atividade residual foi determinada a 50 °C, num volume final de 0,6 mL, empregando tampão acetato 50 mM, pH 5,0 contendo PNP-Glu 0,5 mM, para BGH I (A), e tampão Bis-Tris 50 mM, pH 6,0 contendo PNP-Glu 2 mM para BGH II (B). As atividades controle (100%) corresponderam a 25 U/mg e 18 U/mg para as formas BGH I e BGH II, respectivamente. Temperaturas de incubação: (▲) 40 °C, (●) 45 °C, (○) 50 °C, (■) 55 °C e (□) 60°C.



**Figura 14. Estabilidade ao pH das  $\beta$ -glucosidases purificadas de *H. insolens***

As enzimas foram mantidas em geladeira por 24 h em tampão McIlvaine com pH entre 3 e 8. Após este intervalo de tempo, a atividade residual foi estimada a 50°C, num volume de 0,6 mL, em tampão Acetato 50 mM, pH 5,0 contendo PNP-Glu 0,5 mM para BGH I (A), e tampão Bis-Tris 50 mM, pH 6,0 contendo PNP-Glu 2 mM para BGH II (B). As atividades controle (100%) corresponderam àquelas determinadas para as enzimas submetidas às mesmas condições em água (25 U/mg e 18 U/mg, para BGH I e BGH II, respectivamente).

#### **4.6.3. Especificidade de substrato das $\beta$ -glucosidases purificadas**

A especificidade de substrato das enzimas BGH I e BGH II foi analisada empregando diferentes substratos sintéticos (ONP-Gal, PNP-Fuc, PNP-Gal, PNP-Xil e salicina), além de vários substratos naturais (Tabela 4). Estes experimentos foram realizados com o objetivo de analisar diferenças no reconhecimento de diferentes carboidratos e diferentes tipos de ligações glicosídicas pelas enzimas.

As formas BGH I e BGH II apresentaram uma grande diferença de especificidade para os substratos testados. A enzima BGH I foi capaz de hidrolisar apenas substratos apresentando glicose unida por ligação  $\beta$ -glicosídica a outro monossacarídeo ou grupo químico, indicando uma alta especificidade do sítio ativo desta enzima para a glicose, ligada exclusivamente em configuração  $\beta$ . Em contraste, a forma BGH II foi capaz de hidrolisar todos os substratos que apresentaram ligações glicosídicas em configuração  $\beta$ , independente da presença de glicose, indicando alta especificidade para o tipo de ligação e não para o resíduo de glicose. Entretanto, moléculas maiores, mesmo apresentando monômeros de glicose ligados em configuração  $\beta$ , como a carboximetilcelulose (CMC) e a celulose microcristalina (Avicel), não foram hidrolisadas por BGH I ou BGH II.

**Tabela 4. Especificidade por substratos de BGH I e BGH II**

Sustrato	Atividade (%)		Tipo de Ligação
	BGH I	BGH II	
PNP-Glu	<b>100</b>	<b>23</b>	Glicose $\beta$ 1
Celobiose	<b>100</b>	<b>100</b>	Glicose $\beta$ 1,4
PNP-Gal	NH	<b>6</b>	Galactose $\beta$ 1
PNP Xil	NH	<b>2,5</b>	Xilose $\beta$ 1
PNP-Fuco	NH	<b>84</b>	Fucose $\beta$ 1
ONP-Gal	NH	<b>2,5</b>	Galactose $\beta$ 1
Salicina	<b>5</b>	<b>6,5</b>	Glicose $\beta$ 1
Lactose	NH	<b>5</b>	Galactose $\beta$ 1,4
CMC	NH	NH	Glicose $\beta$ 1,4
Avicel	NH	NH	Glicose $\beta$ 1,4
Maltose	NH	NH	Glicose $\alpha$ 1,4
Trealose	NH	NH	Glicose $\alpha$ 1,1
Sacarose	NH	NH	Glicose $\alpha$ 1,2

A atividade foi determinada a 50°C, num volume final de 0,6 mL, empregando tampão acetato 50 mM, pH 5,0 para BGH I e tampão Bis-Tris 50 mM, pH 6,0 para BGH II. Os substratos foram testados em concentração 5 mM por 1 hora. O controle (100%) corresponde à maior atividade estimada, para cada enzima. Para BGH I o controle correspondeu a 25 U/mg e para BGH II 80 U/mg.

(NH) – não mensurável nas condições de medida.

#### **4.6.4. Determinação dos parâmetros cinéticos para a estimulação de BGH I e BGH II por diferentes substratos**

Com a finalidade de averiguar as diferenças de afinidade, atividade específica máxima e eficiência catalítica das enzimas em relação a diferentes substratos foi caracterizada a estimulação das formas BGH I e BGH II por todos os substratos que foram capazes de hidrolisar.

A forma BGH I apresentou atividade sobre PNP-Glu, Celobiose e Salicina (Fig. 15). A atividade PNP-glucosidásica (Fig. 15A) foi estimulada pelo substrato até um valor máximo  $V = 25$  U/mg, apresentando cooperatividade positiva ( $n_H = 1,7$ ), com um valor de  $K_{0,5} = 0,062$  mM. A atividade celobiásica (Fig. 15B) também foi estimulada cooperativamente ( $n_H = 1,4$ ), com  $V = 25$  U/mg e  $K_{0,5} = 0,45$  mM. Finalmente, a hidrólise de salicina (Fig. 15C) ocorreu com menor atividade específica e afinidade ( $V = 1,5$  U/mg e  $K_{0,5} = 1,5$  mM), mas a estimulação também envolveu cooperatividade positiva ( $n_H = 1,7$ ).

Os valores dos parâmetros cinéticos determinados para a hidrólise dos diferentes substratos por BGH I estão reunidos na tabela 5. Analisando estes parâmetros, observa-se que, embora PNP-Glu e celobiose sejam hidrolisados com a mesma velocidade máxima (25 U/mg), a enzima apresenta uma afinidade aparente cerca de 7 vezes maior para o substrato sintético. Desta forma, com base nos valores de eficiência catalítica, o PNP-Glu ( $V_M/K_M = 403,2$  U/mg.mM) é um melhor substrato para BGH I que a celobiose ( $V_M/K_M = 55,6$  U/mg.mM). Já a salicina é hidrolisada com atividade específica 17 vezes menor e reconhecida com uma afinidade aparente (1,52 mM) 3 vezes menor que a celobiose, representando o pior substrato para esta enzima.

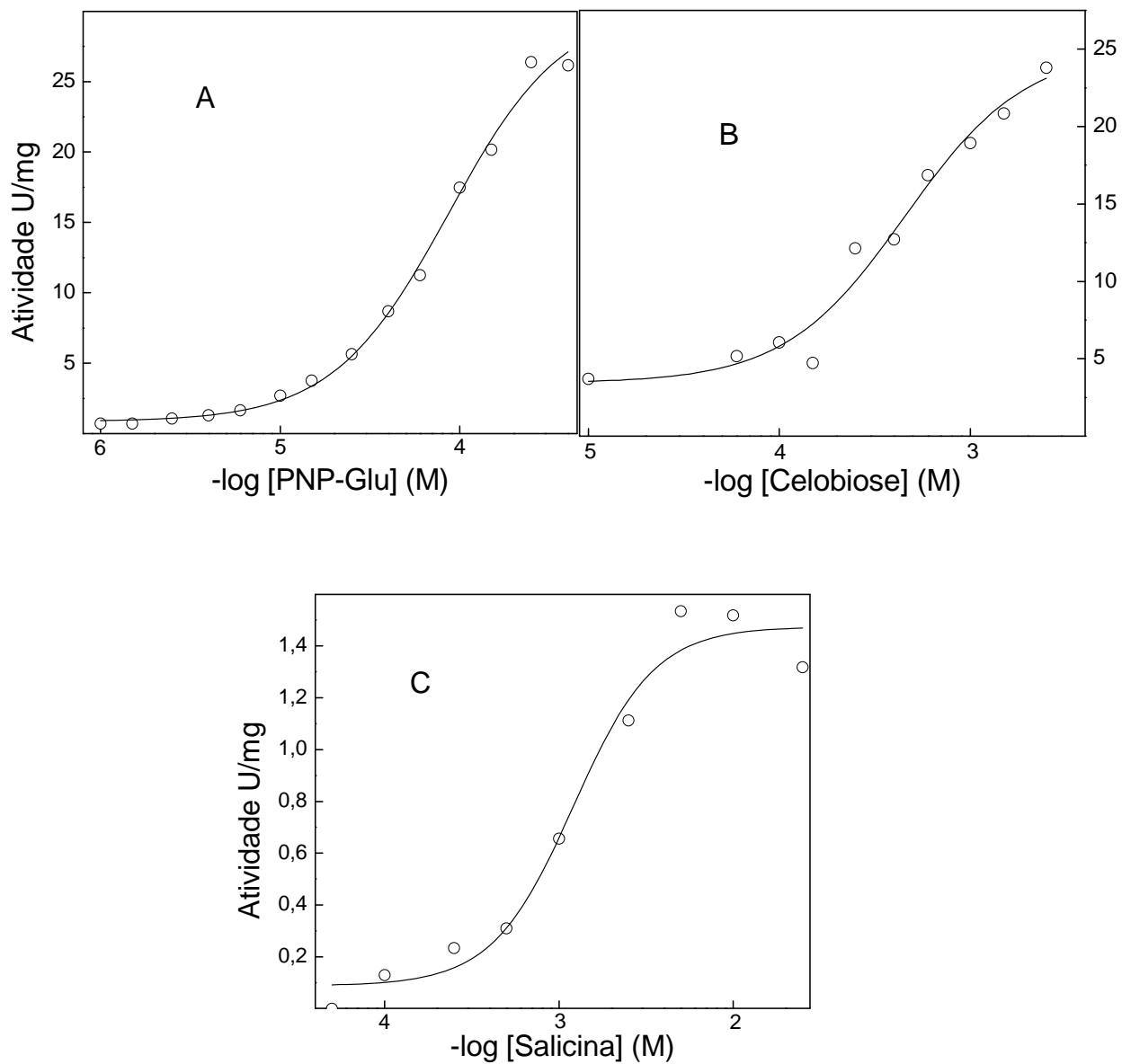


**Tabela 5. Parâmetros cinéticos calculados para a estimulação da forma BGH**

**I por diferentes substratos.**

Substrato	$K_{0,5}$ (mM)	$V_{máx}$ (U/mg)	$n_H$	$V_{máx}/K_{0,5}$
PNP-Glu	0,062	25	1,7	403,2
Celobiose	0,45	25	1,4	55,6
Salicina	1,52	1,5	1,7	0,99

A atividade foi determinada a 50°C, num volume final de 0,6 mL, empregando tampão acetato 50 mM, pH 5,0 com adição de BGH I convenientemente diluída.



**Figura 15. Estimulação da atividade de BGH I por PNP-Glu, celobiose e salicina**

As atividades foram determinadas a 50°C em tampão acetato 50 mM, pH 5,0, num volume final de 0,6 mL. A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio reacional, conforme descrito em Materiais e Métodos.

A enzima BGH II mostrou afinidade por substratos apresentando ligação glicosídica do tipo  $\beta$  e não pela glicose, em contraste com BGH I. Por isso, foi capaz de hidrolisar uma variedade muito maior de substratos. Os substratos que tiveram sua curva de estimulação sobre a atividade de BGH II caracterizada foram: PNP-Glu, celobiose, PNP-Gal, PNP-Xil, PNP-Fuc, ONP-Gal, salicina e lactose.

O PNP-Glu (Fig. 16A) estimulou a forma BGH II até um valor máximo  $V= 18,1$  U/mg, com cooperatividade positiva ( $n_H= 1,4$ ) e com um valor de  $K_{0,5}= 0,16$  mM. Uma única curva de saturação foi observada para a estimulação da atividade por celobiose (Fig. 16B), que seguiu cinética Michaeliana, com  $V= 86$  U/mg e  $K_M= 0,51$  mM. A forma BGH II também apresentou baixa atividade específica e afinidade para salicina (Fig 16C), com  $V= 7,9$  U/mg e  $K_{0,5}= 1,5$  mM, e a estimulação ocorreu com cooperatividade positiva ( $n_H= 1,9$ ).

BGH II foi capaz de hidrolisar tanto PNP-Gal quanto ONP-Gal. No entanto, não foi possível estimar os parâmetros cinéticos para a estimulação da atividade por ONP-Gal, uma vez que não foi possível alcançar a saturação, devido à baixa solubilidade do substrato. Para PNP-Gal (Fig 17A) os parâmetros cinéticos determinados foram  $V= 8,5$  U/mg e  $K_M= 3,9$  mM e a estimulação seguiu cinética Michaeliana. Lactose (Fig. 17B) estimulou a atividade enzimática com baixa afinidade ( $K_M= 19,3$  mM), segundo cinética cooperativa ( $n_H= 1,3$ ) e com  $V= 44,4$  U/mg.

A estimulação da atividade de BGH II por PNP-Fuc ocorreu segundo cinética Michaeliana, com  $V= 58,2$  U/mg e  $K_M= 0,18$  mM (Fig. 18A). Já a estimulação por PNP-Xil apresentou baixa atividade específica ( $V= 5,3$  U/mg) ocorrendo com cooperatividade positiva ( $n_H= 1,2$ ) e  $K_M= 0,43$  mM (Fig. 18B).

Os valores dos parâmetros cinéticos determinados para a hidrólise de diferentes substratos por BGH II estão reunidos na Tabela 6. A análise destes dados mostra que a

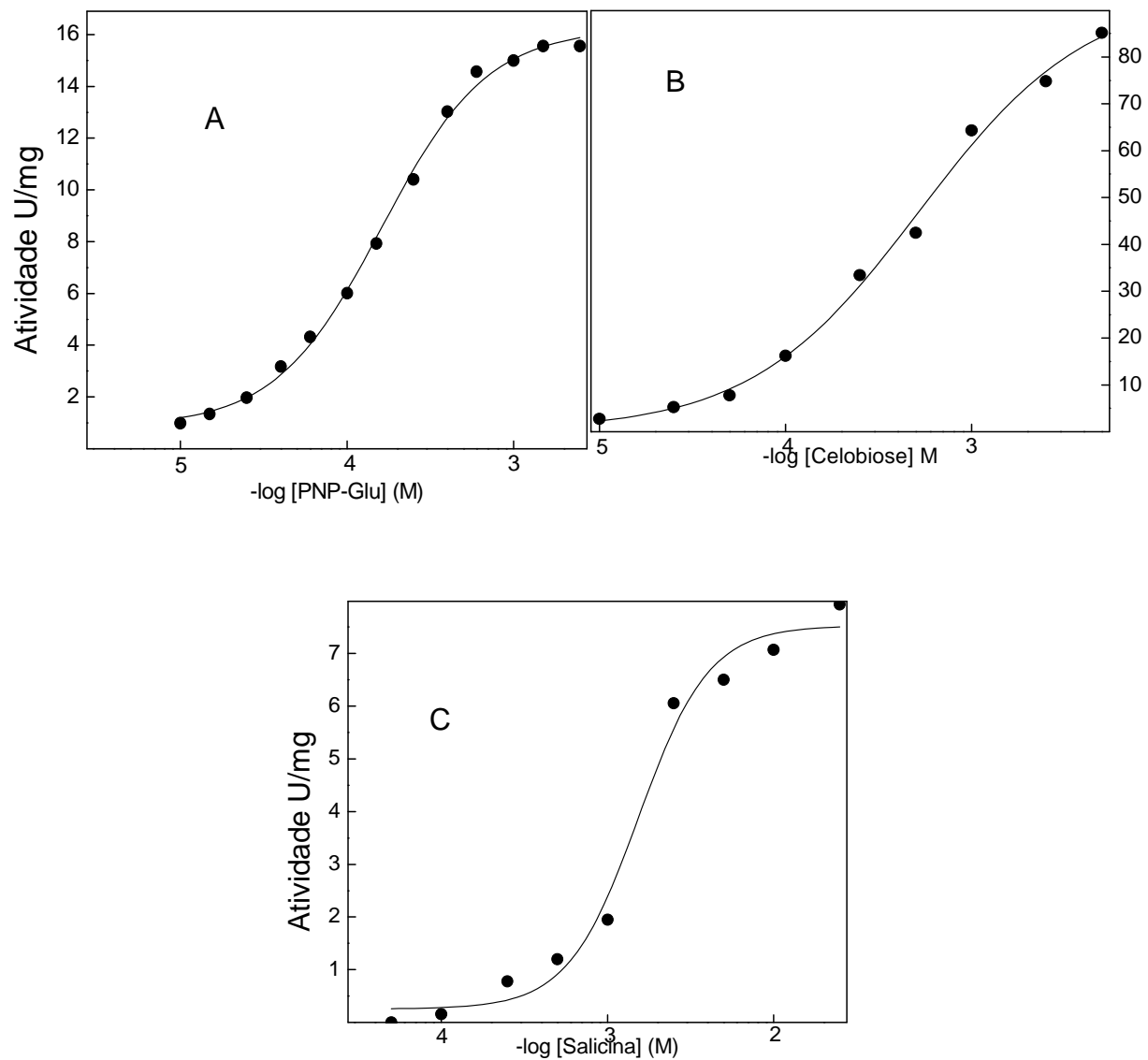
celobiose foi hidrolisada com a maior atividade específica (86,0 U/mg), seguida por pNP-Fuc (58,2 U/mg), lactose (44,4 U/mg), e pNP-Glu (18,1 U/mg). Salicina, pNP-Gal e pNP-Xyl foram hidrolisados com velocidades máximas muito baixas, correspondentes a apenas 9, 10 e 6%, respectivamente, daquela estimada para a celobiose. Por outro lado, a enzima apresentou maior afinidade aparente por pNP-Glu (0,16 mM) e pNP-Fuc (0,18 mM), seguidos por pNP-Xyl (0,43 mM) e celobiose (0,51 mM). Salicina, PNP-Gal e lactose foram reconhecidos com afinidades aparentes 10, 24 e 120 vezes menores que PNP-Glu. Em conjunto, estes resultados sugerem que são reconhecidos com maior afinidade pelo sítio ativo de BGH II aril- $\beta$ -glicosídeos e dissacarídeos que apresentam um grupo OH, no carbono 4, localizado abaixo do plano do anel de piranose que tem o carbono anomérico participando da ligação  $\beta$ -glicosídica.

A eficiência da utilização de diferentes substratos, avaliada pela eficiência catalítica, mostra que o melhor substrato para BGH II é o pNP-Fuc ( $V_M/K_M = 323,3$  U/mg.mM), seguido pela celobiose ( $V_M/K_M = 168,0$  U/mg.mM) e pNP-Glu ( $V_M/K_M = 113,1$  U/mg.mM). Em contraste, a lactose foi um dos piores substratos testados ( $V_M/K_M = 2,32$  U/mg.mM). Comparando-se as duas  $\beta$ -glucosidases purificadas de *H. insolens*, observa-se ainda que, com relação ao substrato natural, BGH II apresenta uma eficiência catalítica cerca de 3 vezes maior que BGH I.

**Tabela 6. Parâmetros cinéticos calculados para a estimulação da forma BGH II por diferentes substratos**

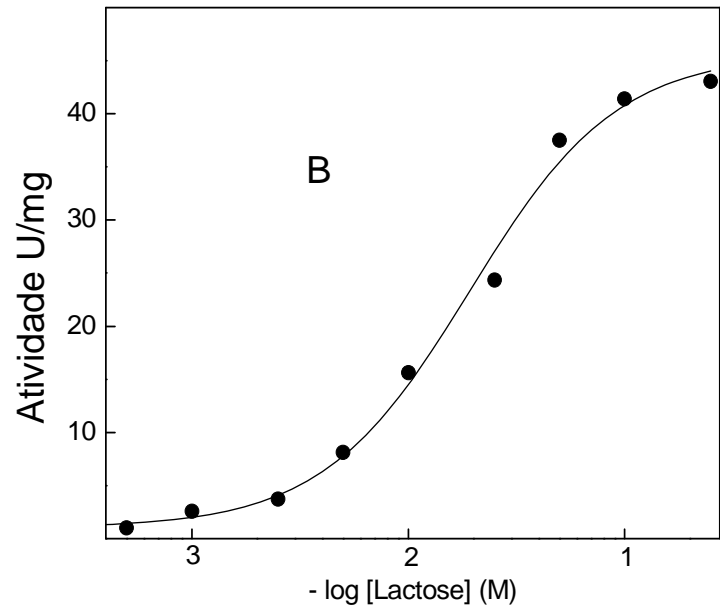
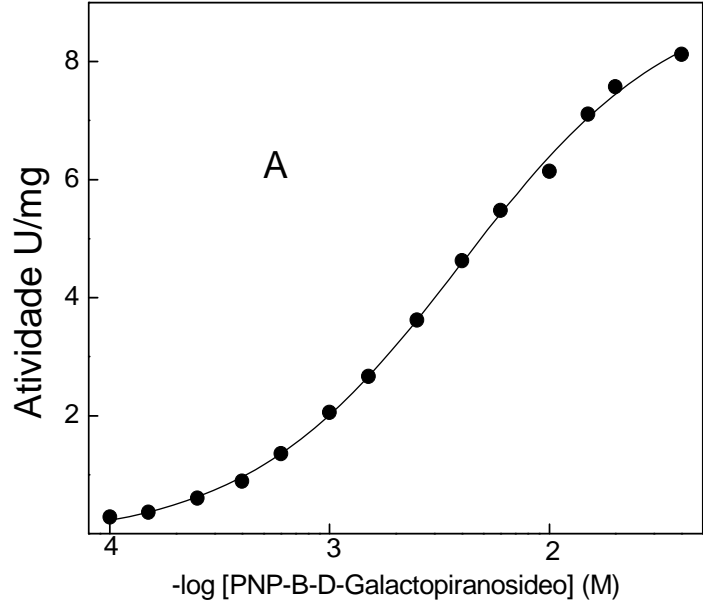
Substrato	$K_{0,5}$ (mM)	$V_{\text{máx}}$ (U/mg)	$n_H$	$V_{\text{máx}}/K_{0,5}$
PNP-Glu	0,16	18,1	1,4	113,1
Celobiose	0,51	86,0	1,0	168,0
PNP-Gal	3,9	8,5	1,0	2,2
PNP-Xil	0,43	5,3	1,2	12,3
PNP-Fuco	0,18	58,2	1,1	323,3
Salicina	1,5	7,9	1,9	5,3
Lactose	19,3	44,4	1,3	2,3

A atividade foi determinada a 50°C, num volume final de 0,6 mL, empregando tampão Bis-Tris 50 mM, pH 6,0 com adição de BGH II convenientemente diluída.



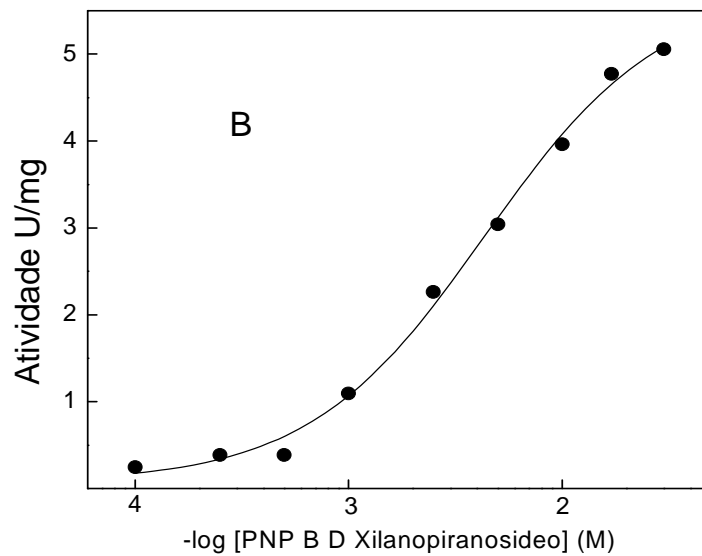
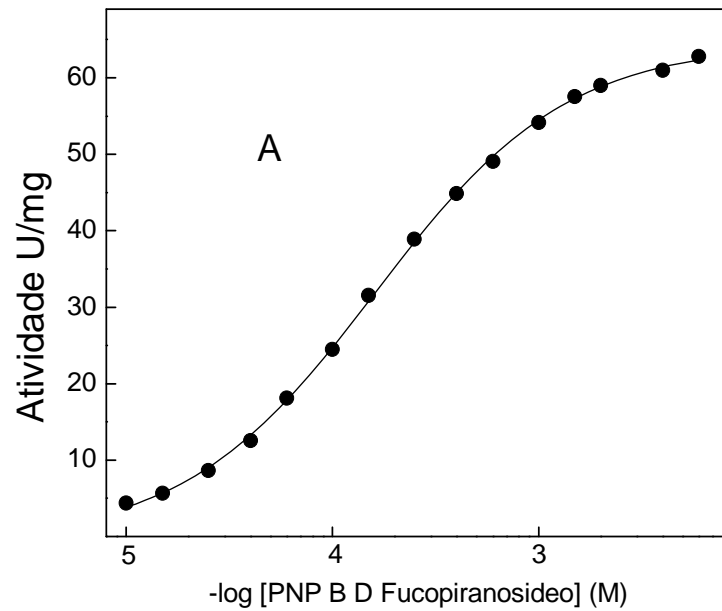
**Figura 16. Estimulação da atividade de BGH II por PNP-Glu, celobiose e salicina**

As atividades foram determinadas a 50°C em tampão Bis-Tris 50 mM, pH 6,0, num volume final de 0,6 mL. A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio reacional, conforme descrito em Materiais e Métodos.



**Figura 17. Estimulação da atividade de BGH II por PNP-Gal e lactose**

As atividades foram determinadas a 50°C em tampão Bis-Tris 50 mM, pH 6,0, num volume final de 0,6 mL. A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio reacional, conforme descrito em Materiais e Métodos.



**Figura 18. Estimulação da atividade de BGH II por PNP-Xil e PNP-Fuc**

As atividades foram determinadas a 50°C em tampão Bis-Tris 50 mM, pH 6,0, num volume final de 0,6 mL. A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio reacional, conforme descrito em Materiais e Métodos.



#### **4.6.5. Efeito de íons e EDTA sobre a atividade das $\beta$ -glucosidases miceliais purificadas de *H. insolens***

O efeito de diferentes íons e EDTA, sobre a atividade PNP-glucosidásica das enzimas purificadas BGH I e BGH II, estão apresentados na Tabela 7. Observa-se que BGH I é tolerante à presença da maioria dos íons testados sendo fortemente inibida apenas por  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ . Já a forma BGH II foi inibida por todos os íons testados, com destaque para  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Pb}^{2+}$ , que levaram à supressão completa da atividade. Por outro lado, o EDTA não apresentou efeito sobre as duas enzimas, sugerindo que não se trata de metaloenzimas.

#### **4.6.6. Efeito de carboidratos sobre a atividade de BGH I e BGH II**

O efeito de diversos carboidratos, em concentração 50 mM no meio reacional, sobre a atividade PNP-glucosidásica das  $\beta$ -glucosidases miceliais purificadas de *H. insolens* está apresentado na Tabela 8. Observa-se que as formas BGH I e BGH II apresentaram respostas totalmente distintas face à presença de carboidratos no meio reacional. Em particular, enquanto a atividade de BGH I foi fortemente inibida por glicose (5% de atividade residual), BGH II teve sua atividade estimulada 1,8 vezes por este monossacarídeo. Similarmente, a presença de xilose levou a uma estimulação de cerca de 2 vezes da atividade de BGH II, mas inibiu a atividade de BGH I em cerca de 40%. Além disso, a atividade de BGH I foi fortemente inibida por quase todos os carboidratos testados, exceto frutose, ribose, galactose e sacarose, que não tiveram efeito significativo sobre a atividade. Em contraste, a forma BGH II foi levemente estimulada por manose, galactose e L-sorbose, enquanto frutose, ribose, L-arabinose e sacarose não apresentam efeito. Além disso, lactose e maltose inibiram apenas 25% e 33%, respectivamente, a atividade de BGH

II, uma inibição leve comparada à observada para a forma BGH I (82 e 94% para lactose e maltose, respectivamente). É interessante destacar, ainda, que a inibição da atividade PNP-glucosidase de BGH II por lactose pode ser atribuída ao fato deste dissacarídeo ser um substrato da enzima.

A partir deste resultado foi estudada a estimulação das atividades PNP-glucosidase e celobiase de BGH II por glicose e/ou xilose (Fig. 20). O efeito estimulatório máximo tanto de glicose quanto de xilose foi observado na faixa de 50 a 100 mM, atingindo atividades sobre o PNP-Glu de cerca de 35 U/mg (Fig 20A). De modo muito interessante, atividades maiores que o controle foram estimadas para concentrações de xilose ou glicose até 400 mM. Não foi observada estimulação sinérgica da hidrólise de PNP-Glu por xilose e glicose.

A atividade celobiase da enzima também foi estimulada fortemente por xilose (Fig. 20B). Observou-se uma estimulação de cerca de 2,2 vezes, atingindo uma atividade específica de 186 U/mg para uma concentração de xilose de 60 mM.

**Tabela 7. Efeito de diferentes íons e EDTA sobre a atividade PNP-glicosidásica das  $\beta$ -glucosidases miceliais purificadas de *H. insolens*.**

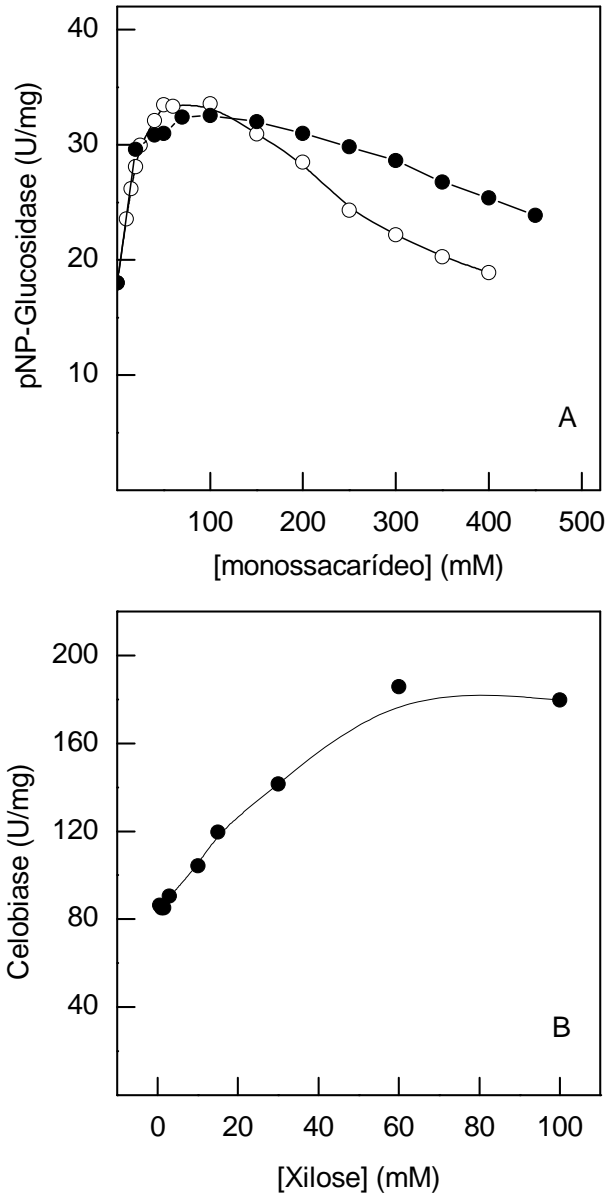
Íons (2 mM)	Atividade (%)	
	BGH I	BGH II
Controle	100	100
Ag	5	55
Ca	96	83
Co	38	80
Cu	44	0
Fe	91	0
Hg	83	0
Mg	95	73
Mn	67	81
Ni	97	50
Pb	92	0
Zn	90	20
EDTA	100	100

A atividade controle (100%) foi determinada em ausência dos íons testados e correspondeu a 25 U/mg para a forma BGH I e 18 U/mg para a forma BGH II.

**Tabela 8. Efeito de diferentes carboidratos sobre a atividade PNP-glucosidásica das  $\beta$ -glucosidases miceliais purificadas de *H. insolens***

Carboidrato (50mM)	Atividade (%)	
	BGH I	BGH II
Controle*	100	100
Glicose	5	180
Xilose	64	200
Manose	38	120
Frutose	112	100
Ribose	125	105
Galactose	100	115
Lactose	18	75
L-Sorbose	56	118
L-Arabinose	85	85
Maltose	5,3	67
Sacarose	100	92

A atividade controle (100%) foi determinada em ausência de carboidratos livres e correspondeu a 25 U/mg para a forma BGH I e 18 U/mg para a forma BGH II.



**Figura 19. Estimulação da atividade de BGH II por glicose e xilose**

A atividade foi determinada a 50°C em tampão Bis-Tris 50 mM, pH 6,0, com (A) PNP Glu 2 mM ou (B) celobiose 10 mM como substratos, num volume final de 0,6 mL, em presença de concentrações crescentes de (○) glicose ou (●) xilose. A reação foi iniciada pela adição de enzima ao meio reacional, conforme descrito em Materiais e Métodos.

#### **4.7. Sinergismo entre BGH II e celulases de *Trichoderma reesei* na hidrólise de papel e bagaço de cana**

Por meio de alguns testes preliminares, foi avaliado o potencial de ação sinérgica entre BGH II e um extrato bruto extracelular rico em celulases, produzido por um mutante hiperprodutor de celulases de *Trichoderma reesei*, na hidrólise de materiais celulósicos (papel de filtro e bagaço de cana explodido).

A adição de 1,5 U de atividade celulásica sobre papel de filtro (FPU) do extrato de *T. reesei* a uma mistura reacional contendo bagaço de cana explodido ou papel de filtro picado em concentração 5%, resultou numa hidrólise de 13% do bagaço e 38% do papel após 5 dias de incubação a 40°C, sob agitação. Já quando o mesmo tratamento foi realizado empregando 1,0 U de atividade celobiase de BGH II purificada, a hidrólise foi nula.

De modo muito interessante, a adição de uma mistura de 1,5 FPU de *T. reesei* e 1,0 U celobiase de BGH II resultou numa hidrólise de 30% do bagaço e 60% do papel, no mesmo intervalo de tempo. Estes resultados demonstram o forte sinergismo entre as celulases de *T. reesei* e BGH II, levando a uma estimulação de cerca de 1,6 vezes para a hidrólise do papel e 2,3 vezes para o bagaço.

Até o momento, foi difícil obter boa reprodutibilidade nestes experimentos, pois ainda não foram otimizados os parâmetros para produção de celulases por *T. reesei*, bem como as condições de pH e temperatura para a hidrólise de papel e bagaço de cana empregando a mistura enzimática.

## 5. Discussão

Poucas linhagens de fungos filamentosos são reconhecidas como boas produtoras de  $\beta$ -glucosidases. Entre os fungos termófilos e termotolerantes, *H. insolens* pode ser considerado um bom produtor de  $\beta$ -glucosidases, como demonstrado em trabalho recente de Sonia et al. (2008), comparando a produção de várias linhagens (*Absidia corymbifera* MTCC 4620, *Aspergillus caespitosus* MTCC 6326, *Aspergillus terreus* MTCC 6335, *Chaetomium thermophilum* MTCC 4981, *Chrysosporium lucknowense* MTCC 3921, *Emericella nidulans* var. *lata* MTCC 6327, *Humicola insolens* MTCC 4520, *Humicola fuscoatra* MTCC 6329, *Melanocarpus* sp. MTCC 3922, *Malbranchea flava* MTCC 4887, *Penicillium lagena* MTCC 6334, *Thermoascus aurantiacus* MTCC 4890 e *Thermomyces lanuginosus* D2W3). Nesse estudo, dentre todas as linhagens testadas, *H. insolens* apresentou produção inferior apenas a *C. thermophilum*.

Tem sido relatado, também, que apenas algumas linhagens de fungos filamentosos são capazes de produzir mais de uma forma de  $\beta$ -glucosidase. Segundo Sonia et al. (2008), quatro diferentes  $\beta$ -glucosidases são produzidas por *Aspergillus tubigenensis*, sete por *Trichoderma reesei* e seis por *Humicola grisea*. Duas  $\beta$ -glucosidases já foram purificadas do fungo termófilo *Humicola grisea* var. *thermoidea* (Peralta et al., 1990, 1997). A linhagem de *Humicola insolens* utilizada neste trabalho também demonstrou ser capaz de produzir duas  $\beta$ -glucosidases com características muito distintas, em especial quanto à sua sensibilidade à presença de carboidratos.

No que diz respeito ao tempo de cultivo para máxima produção de  $\beta$ -glucosidases, resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho foram relatados por Yoshioka & Hayashida (1980) para *H. insolens* da cepa YH-8. Em contraste, tempos de cultivo de

apenas 20 e 48 horas levaram à máxima produção de atividade  $\beta$ -glucosidásica micelial por *H. grisea* var. *themoidea* (Peralta et al., 1990, 1997) e *S. thermophilum* (Zanoelo et al., 2004), enquanto 148h foram necessárias para máxima produção de uma forma extracelular por *C. thermophilum* var. *coprophilum* (Venturi et al., 2002).

Similarmente ao observado neste trabalho para a forma BGH I, de uma maneira geral as  $\beta$ -glucosidases de fungos celulolíticos apresentam-se majoritariamente associadas à parede celular, sendo liberadas para o meio extracelular apenas em pequenas quantidades (Lynd et al., 2002; Kumar et al., 2008). Acredita-se que a presença destas enzimas em grande proximidade com a parede celular seja interessante para o microorganismo, no sentido de limitar a perda de glicose para o ambiente, após a hidrólise da celulose. A proporção majoritária de BGH II no citosol, por sua vez, sugere um papel fisiológico distinto para esta enzima, comparada a BGH I, o que merece uma investigação mais detalhada.

Do ponto de vista de aplicação, a localização intracelular ou periplasmática das  $\beta$ -glucosidases de *H. insolens* representa um problema no que diz respeito ao desenvolvimento de um coquetel enzimático capaz de hidrolisar extensivamente a celulose, *in vitro*. Além disso, Segundo Chaves et al. (1989), as exo- e endoglucanases produzidas por *H. insolens* encontram-se também em grande parte associadas ao micélio.

Entretanto, os resultados obtidos neste estudo mostram que em tempos mais longos de cultivo ocorre um aumento pronunciado da atividade total tanto de BGH I quanto de BGH II no meio extracelular. Outros resultados preliminares mostram ainda que BGH II é secretada para o meio extracelular quando o microorganismo é cultivado em meio semi-sólido, uma possibilidade que vem sendo investigada em nosso laboratório.



Os resultados obtidos para a distribuição subcelular das  $\beta$ -glucosidases de *H. insolens* foram bastante diferentes daqueles relatados para *Scytalidium thermophilum*, outro fungo termófilo produtor de uma enzima estimulada por xilose ou glicose (Zanoelo et al., 2004). Nesse fungo, cerca de 80% da atividade  $\beta$ -glucosidásica está ligada à superfície celular e apenas 13% são encontrados no meio intracelular. Por outro lado, a distribuição subcelular da atividade em *H. grisea*, com 9% das  $\beta$ -glucosidases no espaço periplasmático, 84 % no citosol e 7% na parede celular (Peralta et al., 1990), foi muito similar à encontrada neste trabalho para a enzima BGH II.

A estratégia de purificação desenvolvida neste trabalho permitiu a obtenção das duas formas de  $\beta$ -glucosidases de *H. insolens* empregando um único procedimento. Embora a produção de duas isoformas de  $\beta$ -glucosidase por *H. insolens* já tenha sido relatada anteriormente (Sonia et al., 2008), até o momento não há relatos da purificação destas enzimas.

As primeiras tentativas de purificação realizadas neste estudo envolveram a utilização de resinas de troca iônica com matriz celulósica (DEAE-celulose, CM-celulose), uma estratégia utilizada com sucesso para a purificação de  $\beta$ -glucosidases de outros microorganismos (Peralta et al., 1997; Zanoelo et al., 2004). Entretanto, como as  $\beta$ -glucosidases de *H. insolens* interagiram fortemente com a matriz celulósica, foi necessário utilizar resinas com matriz não-celulósica, como DEAE-Fractogel. É importante destacar ainda que o procedimento padronizado neste estudo foi bastante eficiente para a purificação de BGH II, foco principal deste trabalho. Ao final da purificação, 1,5 mg de proteína pura foram obtidas, o que permitirá estudos futuros da estrutura de uma  $\beta$ -glucosidase com propriedades muito interessantes quanto à estimulação por glicose e xilose.

Praticamente todas as  $\beta$ -glucosidases são glicoproteínas (Masheshwari et al., 2000). Por outro lado, é bem conhecido que fungos termófilos normalmente produzem  $\beta$ -glucosidases altamente glicosiladas, particularmente aquelas que são secretadas para o meio extracelular (Peralta et al. 1997; Venturi et al., 2002; Yang et al., 2008). O teor de carboidratos de BGH II (21%) e especialmente BGH I (51%) pode ser considerado alto, especialmente para enzimas miceliais, e conteúdos de carboidratos totais muito menores que os encontrados neste trabalho foram relatados para as  $\beta$ -glucosidases de outros isolados de *H. insolens* (2,5%, Yoshioka & Hayashida, 1980; 10%, Rao & Murthy, 1988). Entretanto, teores de carboidratos similares ao determinado para BGH II foram relatados para as  $\beta$ -glucosidases miceliais de *H. grisea* var. *thermoidea* (23%, Peralta et al., 1990) e *S. thermophilum* (15%, Zanoelo et al., 2004). Já o conteúdo de carboidratos de BGH I aproxima-se mais daquele relatado para as formas extracelulares de *H. grisea* var. *thermoidea* (35%, Peralta et al., 1997) e *C. thermophilum* var. *coprophilum* (73%, Venturi et al., 2002).

A diferença no teor de carboidratos de BGH I e BGH II pode estar relacionada à diferença de localização celular das enzimas. A maior percentagem de BGH I encontra-se no espaço periplasmático e na parede celular, sugerindo que o organismo produza esta enzima para agir fora da célula. Desta forma, esta enzima seria “protegida” por um maior teor de carboidratos. De fato, vários autores têm atribuído à glicosilação de enzimas um efeito protetor contra a desnaturação térmica e o ataque de proteases (Venturi et al., 2002; Kern et al., 1992; Varki, 1993; Meldgaard e Svendsen, 1994; Lige et al., 2001). Por outro lado, BGH II concentra-se no citoplasma, não sendo necessária uma quantidade tão elevada de carboidratos para preservar sua estrutura.

O valor determinado para o ponto isoelétrico da forma BGH II encontra-se na faixa encontrada para a maioria das  $\beta$ -glucosidases microbianas, entre 3,5 e 5,5 (Perez-Pons et al., 1995). As massas moleculares aparentes estimadas para BGH I (94 kDa) e BGH II (282 kDa) também se encontram na faixa (40 a 250 kDa) relatada na literatura para enzimas de outros fungos (Hayashida *et al.*, 1988; Masheshwari *et al.*, 2000; Bhatia *et al.*, 2002; Yoon *et al.*, 2008).

Em contraste com a provável estrutura dimérica sugerida para BGH II, as  $\beta$ -glucosidases de *H. grisea* var. *thermoidea* (Peralta et al., 1990, 1997), *S. thermophilum* (Zanoelo et al., 2004), *Talaromyces thermophilus* (Nakkharat & Haltrich, 2006), *C. thermophilum* var. *coprophilum* (Venturi et al., 2002) assim como de outro isolado de *H. insolens* (Rao & Murthy, 1988) são monoméricas, com massas moleculares aparentes em torno de 40-50 kDa. Enzimas diméricas foram descritas para *Paecilomyces thermophila* (Yang et al., 2008) e *Thermomyces lanuginosus* (Lin et al., 1999), com massas moleculares aparentes de cerca de 200 kDa.

Quanto a uma possível estrutura tetramérica para BGH I, os resultados devem ser analisados com muita cautela, uma vez que, devido ao seu elevado teor de carboidratos, as determinações de massa molecular aparente podem levar a resultados imprecisos, tanto por filtração em gel quanto por SDS-PAGE (Hames, 1985).

A grande similaridade na seqüência de aminoácidos determinada por espectrometria de massas entre BGH II e uma  $\beta$ -glucosidase isolada de *H. grisea* var. *thermoidea* reflete a proximidade entre esses dois microorganismos. Alguns autores colocam *H. insolens* no chamado complexo *Torula-Humicola* ou *Torula thermophila*. O complexo *Torula-thermophila*, conforme proposta de Straastma & Samson (1993)

compreende os fungos filamentosos *Humicola grisea* var. *thermoidea*, *Scytalidium thermophilum* e *Humicola insolens*. A proposta preconiza que as três linhagens seriam uma única espécie, apresentando ligeiras diferenças morfológicas observáveis a olho nu, devido às diferentes condições de cultivo empregadas nos diversos laboratórios. Entretanto, análises microscópicas mostram diferenças acentuadas nas formas dos conidióforos dos três diferentes fungos (Cooney & Emerson, 1964). Além disso, a análise dos três fungos, sob as mesmas condições de cultivo, tem mostrado diferenças marcantes na morfologia, velocidade de crescimento e produção de enzimas com propriedades claramente distintas (Kadowaki et al., 1996; Cardello et al., 1994). Por outro lado, resultados anteriores já demonstraram que *H. grisea* var. *thermoidea* também produz uma  $\beta$ -glucosidase estimulada por glicose e xilose (Peralta, 1989).

Em geral, as temperaturas ótimas de reação para  $\beta$ -glucosidases fúngicas estão entre 40 e 50°C (Bhatia et al., 2002; Karnchanatat et al., 2007). Já as  $\beta$ -glucosidases da maioria dos fungos termófilos mostram temperatura ótima entre 55 e 75°C, e geralmente são mais termoestáveis que as enzimas dos fungos mesófilos (Mashewari et al., 2000; Yang et al., 2008; Kaur et al., 2007). As enzimas purificadas de *H. grisea* (Peralta et al. 1990,1997) e também de outros isolados de *H. insolens* (Yoshioka & Hayashida, 1980; Rao & Murthy, 1988) apresentaram temperatura ótima de 50°C. Já as  $\beta$ -glucosidases purificadas de *S. thermophilum* (Zanoelo et al. 2004) e *C. thermophilum* (Venturi et al. 2002) apresentaram temperaturas ótimas de 65 e 60°C, respectivamente. Perfis de termoestabilidade semelhantes aos encontrados para BGH I e BGH II foram relatados para as  $\beta$ -glucosidases de outros fungos termófilos, incluindo *H. grisea* (Peralta et al., 1990,1997), *C. thermophilum* (Venturi et al., 2002) e outros isolados de *H. insolens* (Yoshioka &

Hayashida, 1980). Comparada à enzima estimulada por glicose e xilose purificada de *S. thermophilum* (Zanoelo et al., 2004), BGH II mostrou temperatura ótima similar e maior termoestabilidade, uma característica interessante para aplicações industriais.

Boa parte das  $\beta$ -glucosidases fúngicas conhecidas apresentam pH ótimo na faixa de 4,0 a 6,5 (Bhatia et al., 2002; Sonia et al. 2008). Assim, as enzimas BGH I e BGH II de *H. insolens* apresentaram o perfil esperado de pH ótimo. Uma  $\beta$ -glucosidase purificada de outro isolado de *H. insolens* por Yoshioka & Hayashida (1980) apresentou pH ótimo similar ao encontrado para BGH I. Já as  $\beta$ -glucosidases purificadas de *H. grisea* (Peralta et al., 1990,1997) e *S. thermophilum* (Zanoelo et al., 2004) apresentaram pH ótimo próximo ao estimado para BGH II.

Analogamente ao observado neste estudo, a maioria das  $\beta$ -glucosidases fúngicas são estáveis numa ampla faixa de pH (Bhatia et al., 2002; Yang et al., 2008; Bhiri et al., 2008). Uma faixa de estabilidade ao pH similar à de BGH I foi descrita por Yoshioka & Hayashida (1980) para uma  $\beta$ -glucosidase purificada de outro isolado de *H. insolens*.

Assim como observado para BGH I e BGH II, forte inibição da atividade por íons  $\text{Ag}^+$  e  $\text{Hg}^{2+}$  também foi relatada para as  $\beta$ -glucosidases miceliais dos fungos termófilos *S. thermophilum*, *H. grisea* var. *thermoidea* e *Chaetomium thermophilum* (Zanoelo et al., 2004; Peralta, 1989; Venturi et al. 2002), entre outras (Yang et al, 2008; Karnchanatat et al., 2007; Kaur et al., 2007; Bhiri et al., 2008; Riou et al., 1998). Entretanto, a alta sensibilidade a íons  $\text{Zn}^{2+}$  parece ser uma característica particular de BGH II. Além de não apresentarem efeito sobre a atividade de BGH I, íons  $\text{Zn}^{2+}$  estimularam levemente (20%) as  $\beta$ -glucosidases de *H. grisea* (Peralta, 1989) e não tiveram qualquer efeito sobre aquelas

produzidas por *S. thermophilum* e *C. thermophilum* (Zanoelo et al., 2004; Venturi et al., 2002).

Por outro lado, os íons  $Mn^{2+}$  estimularam levemente (20%) a atividade PNP-glucosidásica da enzima de *H. grisea* (Peralta, 1989), embora tenham inibido levemente a atividade de ambas as enzimas purificadas de *H. insolens*. De uma maneira geral, os resultados relatados por Yoshioka & Hayashida (1980) referentes à estimulação por íons da atividade de uma  $\beta$ -glicosidase purificada de um isolado diferente de *H. insolens* são muito semelhantes aos encontrados neste trabalho para a forma BGH I.

As  $\beta$ -glicosidases representam um grupo heterogêneo de enzimas, e não existe um sistema único definido para a sua classificação. De acordo com a classificação baseada na especificidade por substratos (Bhatia et al., 2002), as duas  $\beta$ -glicosidases de *H. insolens* caracterizadas neste trabalho pertencem ao terceiro grupo, ou seja, são  $\beta$ -glicosidases com ampla especificidade de substrato, capazes de hidrolisar uma variedade de substratos. Dados da literatura demonstram que a grande maioria das  $\beta$ -glicosidases já caracterizadas pertencem a esta classe (Bhatia et al., 2002; Yang et al., 2008; Nakkharat et al., 2006; Karnchanatat et al., 2007).

Apesar de serem classificadas no mesmo grupo, BGH I e BGH II são bem diferentes no que diz respeito ao reconhecimento e à hidrólise de carboidratos. A forma BGH I foi capaz de hidrolisar apenas substratos apresentando glicose e, além disso, somente glicose unida por ligação  $\beta$ -glicosídica a outro monossacarídeo ou grupo químico, indicando uma alta especificidade do seu sítio ativo para a glicose ligada exclusivamente em configuração  $\beta$ . Em contraste, BGH II foi capaz de hidrolisar todos os substratos que apresentaram ligações glicosídicas em configuração  $\beta$ , independente da presença de glicose, indicando alta especificidade para o tipo de ligação e não para a molécula de glicose. Similarmente

aos resultados deste trabalho, Peralta et al. (1990) e Zanoelo et al. (2004) relataram que as  $\beta$ -glucosidases intracelulares de *H. grisea var thermoidea* e *S. thermophilum* hidrolisam substratos com ligações glicosídicas em configuração  $\beta$ , independente da presença de glicose. Desta forma, parece haver grande similaridade entre as  $\beta$ -glucosidases intracelulares produzidas por estas espécies de fungos termófilos. No entanto, apesar da análise da hidrólise de diferentes substratos ser uma importante ferramenta para identificação das diferenças entre  $\beta$ -glucosidases, informações mais completas podem ser obtidas através do seqüenciamento e resolução da estrutura destas enzimas.

A maioria das  $\beta$ -glucosidases fúngicas, incluindo as dos fungos termófilos, usualmente apresentam velocidades máximas de hidrólise e afinidades maiores para pNP-Glu que para o substrato natural, celobiose (Yang et al., 2008; Zanoelo et al., 2004; Peralta et al., 1990,1997; Venturi et al., 2002). A mesma observação foi relatada para  $\beta$ -glucosidases de diferentes isolados de *H. insolens* (Hayashida et al., 1988; Yoshioka & Hayashida, 1980).

Em concordância com os dados da literatura, ambas as  $\beta$ -glucosidases purificadas de *H. insolens* neste estudo apresentaram maior afinidade por PNP-Glu que pela celobiose. Enquanto a forma BGH I apresentou uma afinidade 7,3 vezes maior pelo PNP-Glu, comparado à celobiose, para BGH II essa relação foi de apenas 3,2 vezes. Além disso, segundo Yoshioka e Hayashida (1980), uma  $\beta$ -glucosidase purificada de outro isolado de *H. insolens* apresentou constantes de afinidade aparente de 0,86, 1,52 e 0,53 mM para salicina, celobiose e PNP-Glu, respectivamente. Comparativamente, BGH I e BGH II apresentaram afinidades cerca de três vezes maiores pela celobiose, o que é interessante do

ponto de vista de uma possível aplicação destas enzimas. Além disso, a afinidade tanto de BGH I quanto de BGH II por celobiose foi maior que pela salicina.

As afinidades aparentes de BGH I e BGH II para pNP-Glu e celobiose estão dentro da faixa relatada para  $\beta$ -glucosidases de outros fungos (Bhatia et al., 2002; Yang et al., 2008; Karnchanatat et al., 2007; Bhiri et al., 2008; Zanoelo et al., 2004; Peralta et al., 1990, 1997; Venturi et al., 2002; Mashewari et al., 2000).

Com base nos dados de eficiência catalítica, o melhor substrato para BGH I foi o PNP-Glu, hidrolisado sete vezes mais eficientemente que a celobiose. Já para BGH II, o melhor substrato foi PNP-Fuc, seguido pela celobiose e PNP-Glu. Uma característica muito relevante de BGH II é a hidrólise do substrato natural com atividade específica 1,5 e 5 vezes maior que as estimadas para PNP-Fuc e PNP-Glu, a despeito da afinidade 3 vezes maior pelos substratos sintéticos. Desta forma, a enzima apresenta uma eficiência catalítica 1,5 vezes maior para a celobiose, comparada ao PNP-Glu, uma propriedade pouco comum entre as  $\beta$ -glucosidases fúngicas (Hayashida et al., 1988; Yoshioka & Hayashida, 1980; Peralta et al., 1990, 1997; Venturi et al., 2002; Zanoelo et al., 2004; Yang et al., 2008). Comparando-se as duas  $\beta$ -glucosidases purificadas de *H. insolens*, observa-se ainda que, em relação à celobiose, BGH II apresenta uma eficiência catalítica cerca de 3 vezes maior que BGH I.

Embora rara, a estimulação de  $\beta$ -glucosidases por glicose já foi descrita para algumas enzimas purificadas de bactérias (Wright et al., 1992; Perez-Pons et al., 1995) e fungos termófilos (Peralta, 1989; Zanoelo et al., 2004; Sonia et al., 2008). Alta tolerância à glicose também foi relatada para algumas enzimas fúngicas (Osaki & Yamada, 1991; Riou et al., 1998; Saha & Bothast, 1996a,b; Harchand & Singh, 1997), inclusive de certos



isolados de *H. insolens* (Sonia et al. 2008). A primeira  $\beta$ -glucosidase fúngica estimulada por glicose e xilose já descrita foi purificada do micélio de *H. grisea* var. *thermoidea*, um organismo termofílico, por Peralta (1989). Em trabalho recente, Zanoelo et al. (2004) relataram a purificação e caracterização de outra  $\beta$ -glucosidase micelial simultaneamente estimulada por glicose e xilose, obtida do fungo termófilo *S. thermophilum*. Assim, as  $\beta$ -glucosidases ativadas por glicose e xilose podem constituir uma nova classe de celobiasas, características de fungos termófilos.

Embora como discutido acima *H. insolens* e *S. thermophilum* sejam considerados por alguns autores como linhagens de uma única espécie (Straatsma & Samson, 1993), as  $\beta$ -glucosidases estimuladas por glicose e xilose purificadas destes organismos mostram algumas características distintas. Primeiramente, a enzima de *S. thermophilum* é monomérica (42 kDa) (Zanoelo et al., 2004), em contraste com a natureza dimerica da enzima de *H. insolens* (94 kDa). Além disso, a enzima de *H. insolens* é, em grande parte, intracelular, embora seja liberada para o meio de cultivo em tempos mais longos. Ao contrário, a enzima de *S. thermophilum* é predominantemente ligada à superfície celular. Por outro lado, embora as duas enzimas apresentem temperatura ótima de reação semelhante, a enzima de *H. insolens* apresentou maior termoestabilidade. Finalmente, a enzima de *S. thermophilum* apresenta uma constante de afinidade aparente para a celobiose (1,61 mM) três vezes maior que a estimada para BGH II. Além disso, este substrato é hidrolisado com atividade máxima de 4,12 U/mg, cerca de 21 vezes menor que a determinada para BGH II. Esses valores resultam numa eficiência catalítica para a hidrólise da celobiose 65 vezes maior para BGH II, comparada à enzima de *S. thermophilum*. Em conjunto, estas características mostram que BGH II apresenta vantagens claras sobre a  $\beta$ -

glucosidase estimulada por glicose e xilose purificada de *S. thermophilum*, no que diz respeito ao seu aproveitamento em processos de sacarificação de celulose.

Na maioria dos casos, na natureza, as fibras celulósicas estão embebidas numa matriz complexa de outros polímeros estruturais, primariamente hemicelulose e lignina (Kumar et al., 2008). Esta característica torna a degradação da biomassa celulósica mais complexa que a da cellulose pura. As hemiceluloses, entretanto, também são fontes importantes de açúcares fermentáveis para aplicações industriais, constituindo uma fonte abundante de xilose. Nesse contexto, uma  $\beta$ -glucosidases estimulada tanto por glicose como por xilose pode ser considerada particularmente interessante para atingir a máxima degradação de materiais lignocelulósicos, atuando em ação conjunta com endo- e exocelulases e xilanases.

Os mecanismos cinéticos de ativação de BGH II por glicose ou xilose ainda não são conhecidos e estudos estruturais são importantes para uma boa compreensão da relação estrutura-função desta enzima com características tão particulares de ativação pelo produto. Entretanto, do ponto de vista biotecnológico, as suas características bioquímicas, tais como alta eficiência catalítica para a celobiose, boa termoestabilidade, forte estimulação por glicose e xilose e tolerância a concentrações muito elevadas desses monossacarídeos, fazem com que esta enzima seja altamente interessante para aplicações industriais. Um fator que contribui, ainda, para este grande potencial de aplicação é a ação sinérgica da enzima com celulases de *T. reesei* na degradação de bagaço de cana explodido, evidenciado em estudos preliminares em nosso laboratório.

## 6. Referências

- Aro N, Pakula T, Penttila M (2005). Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *Microbiology Reviews* **29**: 719-739
- Béguin P, Aubert JP (1994). The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol Rev* **13**:25-58.
- Bergmeyer HU, Bernt E (1974) In: *Methods of enzymatic analysis* (Bergmeyer, H.U. ed.) vol. 3, pp. 1205-15. Verlag/Academic Press. New York.
- Bhatia Y, Mishra S, Bisaria VS (2002) Microbial  $\beta$ -glucosidase: Cloning, properties and applications. *Crit Rev Biotechnol* **22**:375-407.
- Bhiri F, Chaabouni SE, Limam F, Ghrir R, Marzouki N(2008) Purification and biochemical characterization of extracellular  $\beta$ -glucosidases from the hypercellulolytic Pol6 mutant of *Penicillium occitanis*. *Appl Biochem Biotechnol* **149**:169-182.
- Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**:93-99
- Boisset C, Fraschini C, Schülein M, Henrissat B, Chanzy H (2000). Imaging the Enzymatic Digestion of Bacterial Cellulose Ribbons Reveals the Endo Character of the Cellobiohydrolase Cel 6<sup>a</sup> from *Humicola insolens* and Its Mode of Synergy with Cellobiohydrolase Cel7A. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:1444-1452
- Boyce COL (1986). Cellulases – Enzymes that hydrolyze fibers. In: *Novo's Handbook for Pratical Biotechnology*. Novo Industri. 2<sup>nd</sup> edition, pp.77-89.
- Chaves VMG, Silva DO, Brune W, Moreira MA (1989). Cellulolytic Activities of *Humicola sp.* *Rev. Microbiol.* **20**(4):460-465.
- Cooney DG, Emerson R (1964) In: *Thermophilic Fungi*. WH Freeman Publ., Co. San Francisco, USA.

Davies GJ, Henrissat B (1995). Structure and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* **3**:853-859.

Davies GJ, Henrissat B (2002). Plant Glyco-related Genomics. *Biochemical Society Transactions* **30**:part2.

Davis BJ (1964) Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann N Y Acad Sci* **121**:404-27.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**, 350-356

Farrell AE, Plevin RJ, Turner BT, Jones AD, O'Hare M, Kammen DM (2006) Ethanol can contribute to energy and environmental goals. *Science* **113**:506–508

Gray KA, Zhao L, Emptage M (2006). Bioethanol. *Current Opinion in chemical Biology* **10**:141-146

Gusakov AV, Salanovich TN, Antonov AI, Ustinov BB, Okunev ON, Burlingame RE, Malfarb M, Baez M, Sinitsyni AP (2007). Design of Highly Efficient Cellulase Mixtures for Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. *Biotechnology and Bioengineering* **97**:1028-1038

Hames BD (1985) An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. Chapter 1, p.17. in : *Gel electrophoresis of proteins.* (edited by BD Hames & D Rickwood, IRL Press, Oxford.).

Jenkins J, Leggio LL, Harris G, Pickersgill R (1995)  $\beta$ -Glucosidase,  $\beta$ -galactosidas, family A cellulases, family F xylanases and two barley glycanases form a superfamily of enzymes with a 8-fold  $\alpha/\beta$  architecture and with two conserved glutamates near the carboxy-terminal ends of  $\beta$ -strands four and seven. *FEBS Lett.* **362**:281-285.

Kadowaki MK, Polizeli MLTM, Terenzi HF, Jorge JA (1996) Characterization of trehalase activities from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. *Biochim*

Biophys Acta **1291**: 199-205

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

Kaur J, Chadha BS, Kumar BA, Kaur GS, Saini HS (2007). Purification and characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Melanocarpus* sp. Electronic Journal of Biotechnology **10**:260-270

Kumar R, Singh S, Singh OV (2008) Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. J Ind Microbiol Biotechnol **35**:377-391

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**, 680-685

Leone FA, Baranauskas JA, Furriel RPM, Borin IA (2005). SigrafW: an easy-to-use program for fitting enzyme kinetic data. Biochem. Mol. Biol. Educ. 33: 399-403.

Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, Pretorius IS (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiol Mol Biol Rev **66**:506-77.

Mackenzie LF, Sulzenbacher G, Divne C, Jones TA, Wöldike HF, Schülein M, Withers SG, Davies GJ (1998). Crystal structure of the family 7 endoglucanase I (Cel7B) from *Humicola insolens* at 2.2 Å resolution and identification of the catalytic nucleophile by trapping of the covalent glycosyl-enzyme intermediate. Biochem. J. **335**:409-416

Maheshwari R, Bharadwaj G, Bhat MK (2000). Thermophilic Fungi: Their physiology and enzymes. Microbiology and Molecular Biology Reviews **64**:461-488

Mellvaine TC, (1921). A buffer solution for colorimetric comparison. J. Biol. Chem. **49**:183-186.

Miller GL, (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry* **31**:426-428

Mirjam C, Muzaffer C, Vronique Z, Wim PB, David RB, Bernard H, Assim E (2001). Crystal structure of a monocotyledon (*maize ZMGlul*)  $\beta$ -glucosidase and a model of its complex with p-nitrophenyl  $\beta$ -D-thioglucoside. *Biochemical Journal* **354**:37-46

Monti R, Terenzi HF, Jorge JA (1991) Purification and properties of an extracellular xylanase from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var *thermoidea*. *Can J Microbiol* **37**: 675-681

O'Farrel PZ, Goodman HM, O'Farrel PH. (1977). High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* **12**, 1133-1142.

Osaki H, Yamada K (1991) Isolation of *Streptomyces* sp. producing glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidases and properties of the enzymes. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 979-987.

Peralta RM, (1989) Caracterização bioquímica das beta-glucosidases de *Humicola grisea* var. *thermoidea* RP 17. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Peralta RM, Kadowaki MK, Terenzi HF, Jorge JA (1997) A highly thermostable  $\beta$ -glucosidase activity from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*: purification and biochemical characterization. *FEMS Microbiol Letters* **146**: 291-295.

Peralta RM, Terenzi HF, Jorge JA (1990)  $\beta$ -Glycosidase activities of *Humicola grisea*: biochemical and kinetic characterization of a multifunctional enzyme. *Biochim Biophys Acta* **1033**:243-9.

Perez-Pons JA, Rebordosa X, Querol E (1995) Properties of a novel glucose-enhanced  $\beta$ -glucosidase purified from *Streptomyces sp.* (ATCC 11238). *Biochim. Biophys. Acta* **1251**, 145-153.

Rao US, Murthy SK (1988) Purification and characterization of a beta-glucosidase and endocellulase from *Humicola insolens*. *Indian J Biochem Biophys* **25**:687-94.

Read SM, Northcote DH (1981) Minimization of variation in the response to different protein of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal Biochem* **116**:53-64.

Riou C, Salmon JM, Vallier MJ, Gunata Z, Barre P (1998) Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Environ.* **64**, 3607-3614.

Saha BC, Feer N, Bothast RJ (1995) Thermostable  $\beta$ -glucosidases In: *Enzymatica Degradation of insoluble Carbohydrates* (Sadler, JN, Penner, NH, Eds), pp. 197-207. American Chemical Society, Washington, DC.

Schurz J (1999). Trends in polymer science: A bright future for cellulose. *Prog Polym Sci* **24**:481-3.

Sonia KG, Chadha BS, Badhan AK, Saini HS, Bhat MK (2008). Identification of glucose tolerant acid active  $\beta$ -glucosidases from thermophilic and thermotolerant fungi. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24**:599-604

Reedy N, Yang YQ (2005) Properties and potential applications of natural cellulose fibers from cornhusks. *Green Chemistry* **7**:190-195.

Venturi LL, Terenzi HF, Furriel RPM, Jorge JA (2002) Extracellular  $\beta$ -D-glucosidase from *Chaetomium thermophilum var coprophilum*: Production, Purification and some Biochemical Properties. J. Basic Microbiol. 42: 55-66.

Vogel AI (1989). Análise Química Quantitativa. Em: Análise Titrimétrica. Pp. 264-270. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Warren RAJ (1996). Microbial hydrolysis of polysaccharides. Annu Rev Microbiol **50**:183-212.

Wright RM, Yablonsky MD, Shalita ZP, Goyal AK, Eveleigh DE (1992) Cloning, characterization, nucleotide sequence of a gene encoding *Microbispora* BglB, a thermostable  $\beta$ -glucosidase expressed in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 58, 3455-3465.

Yang S, Jiang Z, Yan Q, Zhu H (2008) Characterization of a thermostable extracellular  $\beta$  - glucosidase with activities of exoglucanase and transglycosylation from *Paecilomyces thermophila*. J Agric Food Chem **56**:602-608.

Yoshioka H, Hayashida S (1980). Purification and properties of  $\beta$ -glucosidase from *Humicola insolens* YH-8. Agric. Biol. Chem. **44**(8): 1729-1735.

Zanoelo FF, Polizeli MLTM, Terenzi HF, Jorge JA (2004).  $\beta$ -glucosidase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose. FEMS Microbiol Letters **240**:137-43.

Zhang YHP, Himmel ME, Mielenz JR (2006). Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. Biotechnol Adv **24**: 452-481.



Zimmermann ALS, Terenzi HF, Jorge JA (1990) Purification and properties of an extracellular conidial trehalase from *Humicola grisea* var *thermoidea*. *Biochim Biophys Acta* **1036**: 41-46.