

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

HÊMILY SANCHES MUTTI

**Estudos estruturais e funcionais de duas  $\beta$ -glicosidases de  
*Trichoderma harzianum***

São Carlos  
2014

HÊMILY SANCHES MUTTI

**Estudos estruturais e funcionais de duas  $\beta$ -glicosidases de  
*Trichoderma harzianum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadores: Prof. Dr. Igor Polikarpov e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina Kurachi

São Carlos  
2014

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

M993ee

Mutti, Hêmily Sanches.

Estudos estruturais e funcionais de duas  $\beta$ -glicosidases de *Trichoderma harzianum* / Hêmily Sanches Mutti. -- São Carlos : UFSCar, 2015.  
109f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Biotecnologia. 2. *Trichoderma harzianum*. 3. Cinética enzimática. I. Título.

CDD: 606.6 (20<sup>a</sup>)

**Hêmily Sanches Mutti**

Dissertação de Mestrado submetida  
à Coordenação do Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia,  
da Universidade Federal de São  
Carlos, como requisito parcial para  
a obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia

**Aprovado em: 29/08/2014**

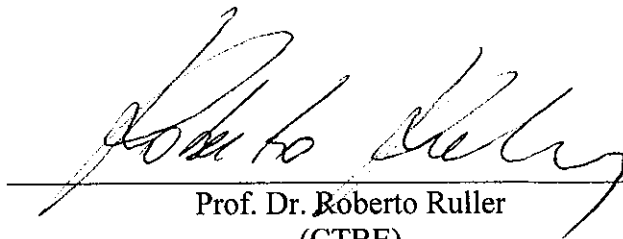
**BANCA EXAMINADORA**



Prof. Dr. Igor Polikarpov (Orientador)  
(IFSC - USP)



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristina Paiva de Souza  
(PPPGBiotec/ UFSCar e DMP/UFSCar)



Prof. Dr. Roberto Ruller  
(CTBE)

*Dedico esse trabalho aos meus pais, Dirceu e Valéria,  
e ao meu noivo, Aman, por terem sempre me apoiado  
nessa jornada e por serem tudo em minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

*Ao Prof. Dr. Igor Polikarpov pela orientação, por confiar em mim e me proporcionar trabalhar em seu laboratório. Agradeço muito pela orientação e suporte. Agradeço também à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina Kurachi por aceitar e confiar na orientação desse projeto.*

*A minha família pelo grande apoio mesmo na distância. As minhas avós, Conceição e Tutu, pelo carinho e ajuda em todas as etapas da minha vida. Aos meus pais, Dirceu e Valéria, pelo amor incondicional, por toda dedicação, carinho, paciência, por abdicarem de seus sonhos para colocarem os dos filhos em primeiro plano e por tornarem possível toda minha formação. Ao meu irmão, Hevandro, pela total compreensão mesmo com nossas brigas de vez em quando. Eu não teria chegado até aqui sem a participação de vocês. Amo e serei grata a vocês eternamente.*

*Ao meu futuro esposo, Aman Piva, por me apoiar e me incentivar sempre; por todo amor, dedicação, carinho, paciência, por ser um grande companheiro, meu porto seguro, o amor da minha vida, meu anjo da guarda e por tornar meus dias melhores. Agradeço também a minha sogra, por me tratar como uma filha e por cuidar sempre de mim, me apoiando e me ajudando sempre no que fosse preciso. A minha cunhada, Ni, pela amizade e apoio. Ao Jorge, por sempre perguntar das “minhas bactérias” e comemorar com os resultados positivos. Amo e serei grata a vocês eternamente.*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos pelo suporte e auxílio e a todos os docentes.*

*Ao Instituto de Física de São Carlos por oferecer toda estrutura necessária para desenvolvimento deste trabalho. A todos do Laboratório de Cristalografia do IFSC e todo o grupo de Biotecnologia Molecular por contribuir para o meu aprendizado numa área que eu desconhecia.*

*Ao CNPQ pela concessão da bolsa de estudos.*

*A Vanessa Arnoldi, pela paciência e por toda ajuda e ensinamento a mim depositado.*

*Ao César por ter me proporcionado o início do meu trabalho, que eu acreditava estar perdido.*

*A Renata Florindo, por ter me abrigado em sua casa e, principalmente, pela amizade, pelo companheirismo, pelas infinitas ajudas e preocupações comigo e pelos grandes momentos de risadas.*

*A Renatinha, por ser tão amiga e especial para mim e, mesmo que por pouco tempo, ter tornado meus dias no laboratório mais alegres e divertidos. Sinto muito sua falta "xuxu".*

*A Mari, pela amizade, pelos momentos de café e por sempre estar disposta a me ajudar nos momentos de sufoco, naquilo que fosse preciso.*

*Ao Caio, por toda ajuda e ensinamento de SAXS e por ser tão paciente e prestativo.*

*A Amanda e ao João por toda ajuda e ensinamento de Cristalografia.*

*A Valquíria por toda ajuda e ensinamento de Cinética.*

*A Mariana Pinatto, pela amizade de anos e apoio sempre, apesar da distância.*

*A todos os técnicos, secretários e funcionários do IFSC.*

*Aos membros da banca, por terem aceitado participar da avaliação desse trabalho.*

*A todas as pessoas que colaboraram direta ou indiretamente para realização deste trabalho...*

*Os meus mais sinceros agradecimentos!*

*“Sábio é o ser humano que tem coragem de ir  
diante do espelho da sua alma para reconhecer  
seus erros e fracassos e utilizá-los para plantar  
as mais belas sementes no terreno de sua  
inteligência”.*

*Augusto Cury*



## RESUMO

O esgotamento das fontes de combustíveis fósseis, a crescente demanda energética e a grande necessidade de redução da emissão de carbono fizeram com que aumentasse gradativamente a procura por novas fontes de energia renováveis e limpas. O bioetanol obtido da fermentação de biomassas lignocelulósicas, como o bagaço de cana-de-açúcar, pode ser considerado uma alternativa viável. Para que essa biomassa possa ser utilizada, faz-se necessário a degradação das moléculas constituintes da parede celular a açúcares fermentáveis por meio das enzimas chamadas celulases. Dentre elas existem três classes com diferentes funções: as celobiohidrolases, as endoglucanases e as  $\beta$ -glicosidases. Com o objetivo de contribuir para a viabilização e implantação de tecnologias de produção de etanol, foi realizada a purificação de duas  $\beta$ -glicosidases do fungo *Trichoderma harzianum*, denominadas nesse trabalho como *ThBgl1* e *ThBgl2*, bem como sua caracterização bioquímica e biofísica. Os clones em estudo foram obtidos por meio de uma plataforma de clonagem, expressão e purificação de proteínas recombinantes em alto desempenho e expressos na bactéria *Escherichia coli*. Através da caracterização funcional das proteínas em estudo, verificou-se que elas apresentaram o pH ótimo na faixa de 5,5 e temperatura ótima em torno de 40°C. Os resultados de cinética enzimática mostraram que *ThBgl1* tem maior preferência (especificidade) por celobiose, enquanto na *ThBgl2* a celobiose é um substrato com baixa especificidade. Na *ThBgl2* a especificidade é maior por fucosídeos. Além disso, constatou-se a ocorrência de transglicosilação catalisada pelas  $\beta$ -glicosidases em estudo e a ação de alguns inibidores em sua atividade enzimática. A análise tridimensional dessas proteínas revelou a presença de um barril tim típico das hidrolases de glicosídeos da família 1.

**Palavras-chave:** *Trichoderma harzianum*,  $\beta$ -glicosidase, cinética enzimática.

## ABSTRACT

The depletion of fossil fuels, the growing energy demand and the great need to reduce carbon emissions gradually increased the demand for new sources of renewable and clean energy. Bioethanol is obtained from the fermentation of lignocellulosic biomass, for example sugar cane, and can be considered a viable alternative. For this biomass can be used it is necessary to degrade the constituent molecules of the cell wall to fermentable sugars through the enzymes called cellulases. Among them there are three classes with different functions: the cellobiohydrolases, endoglucanases and  $\beta$ -glucosidases. In order to contribute to the viability and deployment of ethanol production technologies, purification of two  $\beta$ -glucosidases of the fungus *Trichoderma harzianum* was performed, named in this work as *ThBgl1* e *ThBgl2*, as well as their biophysical and biochemical characterization. Clones in study were obtained by a cloning platform, expression and purification of recombinant proteins in high performance and expressed in bacteria *Escherichia coli*. Through the functional characterization of proteins under study it was found that they had the optimum pH in the range of 5.5 and optimum temperature around 40°C. Results of enzyme kinetics showed that *ThBgl1* has higher preference (specificity) by cellobiose, while in *ThBgl2* cellobiose is a substrate having low specificity. In *ThBgl2* specificity is higher by fucosideos. Furthermore, it was observed the occurrence of transglycosylation catalyzed by  $\beta$ -glucosidases in study and the action of some inhibitors on its enzymatic activity. The three-dimensional analysis of these proteins revealed the presence of the barrel tim typical of family 1 of glycoside hydrolases.

**Keywords:** *Trichoderma harzianum*,  $\beta$ -glucosidase, enzyme kinetics.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química do polímero de celulose (MORAIS et al., 2005).....	24
Figura 2 - Estrutura típica da hemicelulose mostrando as diferentes ligações e compostos encontrados nas ramificações (Adaptado de DODD; CANN, 2009).....	25
Figura 3 - Estrutura Geral da Lignina (MARX, 2000).....	26
Figura 4 - Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico (FARINAS, 2011). ....	29
Figura 5 - Hidrólise de substratos catalisada por enzimas da família GH1 (adaptado de HENRISSAT & DAVIES, 1997) .....	31
Figura 6 - Mecanismo catalítico proposto para $\beta$ -glicosidases (Baseado em WHITE & ROSE, 1997; WHITES & RYE, 2000).....	32
Figura 7 - vetor pETTRX-1a.....	39
Figura 8 - Método de Clonagem Independente de Ligação (LIC). Figura de Camilo, C. M. e Polikarpov, I. ....	39
Figura 9 - curva padrão de p-ntirofenolato. ....	47
Figura 10 - Curva padrão de glicose detectada através do kit glicose PP da Analisa. ....	48
Figura 11 - Representação esquemática do Diagrama de Fases para cristalização de proteínas (modificada de McPherson, 2003). ....	53
Figura 12 - Número de aminoácidos e massa molecular da proteína <i>ThBgl1</i> ( <a href="http://web.expasy.org/protparam/">http://web.expasy.org/protparam/</a> ).....	59
Figura 13 - Número de aminoácidos e massa molecular da proteína <i>ThBgl2</i> ( <a href="http://web.expasy.org/protparam/">http://web.expasy.org/protparam/</a> ).....	60
Figura 14 - SDS-PAGE com resultado da expressão das $\beta$ -glicosidases (a) <i>ThBgl1</i> e (b) <i>ThBgl2</i> . M - marcador de peso molecular; (1) frações pré-indução; (2) frações pós-indução. ....	61
Figura 15 - SDS-PAGE - cromatografia de afinidade para a proteína <i>ThBgl1</i> , mostrando as lavagens (tampão com 5,10 e 25 mM de imidazol) e a correspondente eluição (tampão com 130 mM de imidazol). M – marcador de peso molecular. ....	62
Figura 16 - SDS-PAGE - cromatografia de afinidade para a proteína <i>ThBgl2</i> , mostrando as lavagens (tampão com 5,10 e 25 mM de imidazol) e a correspondente eluição (tampão com 130 mM de imidazol). M – marcador de peso molecular. ....	63
Figura 17 - Número de aminoácidos e Massa Molecular da proteína <i>ThBgl1</i> após clivagem ( <a href="http://web.expasy.org/protparam/">http://web.expasy.org/protparam/</a> ).....	64
Figura 18 - Número de aminoácidos e Massa Molecular da proteína <i>ThBgl2</i> após clivagem ( <a href="http://web.expasy.org/protparam/">http://web.expasy.org/protparam/</a> ).....	65

Figura 19 - SDS-PAGE. <i>ThBgl1</i> após todos os processos de purificação.....	66
Figura 20 - SDS-PAGE. <i>ThBgl2</i> após todos os processos de purificação.....	67
Figura 21 - Efeito do pH na atividade relativa da enzima <i>ThBgl1</i> . ....	68
Figura 22 - Efeito do pH na atividade relativa da enzima <i>ThBgl2</i> . ....	68
Figura 23 - Efeito da temperatura na atividade relativa da enzima <i>ThBgl1</i> . ....	69
Figura 24 - Efeito da temperatura na atividade relativa da enzima <i>ThBgl2</i> . ....	69
Figura 25 - Atividade da enzima <i>ThBgl1</i> contra diferentes substratos sintéticos.....	70
Figura 26 - Atividade da enzima <i>ThBgl2</i> contra diferentes substratos sintéticos.....	71
Figura 27- Curva padrão para glicose (método da glicose oxidase-peroxidase, GOD).....	72
Figura 28 - Curva de cinética enzimática para a enzima <i>ThBgl1</i> , utilizando-se o substrato pNPG.....	73
Figura 29 - Curva de cinética enzimática para a enzima <i>ThBgl2</i> , utilizando-se o substrato pNPG.....	73
Figura 30 - Cinética enzimática para <i>ThBgl1</i> , utilizando-se o substrato p-nitrofenil- $\beta$ -fucopiranosídeo. ....	74
Figura 31 - Cinética enzimática para <i>ThBgl2</i> , utilizando-se o substrato p-nitrofenil- $\beta$ -fucopiranosídeo. ....	74
Figura 32 - Cinética enzimática para <i>ThBgl1</i> , utilizando-se o substrato p-nitrofenil- $\beta$ -galactopiranosídeo. ....	75
Figura 33 - Cinética enzimática para <i>ThBgl2</i> , utilizando-se o substrato p-nitrofenil- $\beta$ -galactopiranosídeo. ....	75
Figura 34 - Cinética enzimática para <i>ThBgl1</i> , utilizando-se o substrato celobiose. ....	76
Figura 35 - Cinética enzimática para <i>ThBgl2</i> , utilizando-se o substrato celobiose. ....	76
Figura 36 - Possível ocorrência de transglicosilação catalisada pelas $\beta$ -glicosidases <i>ThBgl1</i> (1) e <i>ThBgl2</i> (2) utilizando-se 20 mM de pNPG. ....	78
Figura 37 - Possível ocorrência de transglicosilação catalisada pelas $\beta$ -glicosidases <i>ThBgl1</i> (1) e <i>ThBgl2</i> (2) utilizando-se 25 mM de pNPG. ....	78
Figura 38 - Via esquemática de reações de hidrólise e de transglicosilação catalisadas por $\beta$ -glicosidases. 1 – hidrólise; 2 - transglicosilação (FRUTUOSO, MARANA, 2013). ....	79
Figura 39 - Velocidade de formação de p-nitrofenolato (em vermelho) e de glicose (em preto) pela enzima <i>ThBgl1</i> . ....	80

Figura 40 - Velocidade de formação de p-nitrofenolato (em vermelho) e de glicose (em preto) pela enzima <i>ThBgl2</i> .....	81
Figura 41 - % da enzima <i>ThBgl1</i> seguindo as rotas de hidrólise e transglicosilação.....	82
Figura 42 - % da enzima <i>ThBgl2</i> seguindo as rotas de hidrólise e transglicosilação.....	82
Figura 43 - Velocidade de formação de p-nitrofenolato em relação à velocidade de formação de glicose em função da concentração de substrato para a enzima <i>ThBgl1</i> .....	84
Figura 44 - Velocidade de formação de p-nitrofenolato em relação à velocidade de formação de glicose em função da concentração de substrato para a enzima <i>ThBgl2</i> .....	84
Figura 45 - V (glicose) e V (p-nitrofenolato) para a enzima <i>ThBgl1</i> , utilizando-se pNPG como substrato. ....	85
Figura 46 - V (glicose) e V (p-nitrofenolato) para a enzima <i>ThBgl2</i> , utilizando-se pNPG como substrato. ....	86
Figura 47 - Efeito de inibidores na atividade enzimática de <i>ThBgl1</i> . (1) celobiose (32 mM); (2) celobiose (14 mM); (3) celotriose (14 mM); (4) celotetraose (14 mM); (5) hexil- $\beta$ -glucopiranosídeo (14 mM); (6) octil- $\beta$ -glucopiranosídeo (14 mM); (7) fenil- $\beta$ -glucopiranosídeo (14 mM); (8) metil- $\beta$ -glucopiranosídeo (14 mM); (9) Tris (14 mM). ....	88
Figura 48 - Efeito de inibidores na atividade enzimática de <i>ThBgl2</i> . (1) celobiose (32 mM); (2) celobiose (14 mM); (3) celotriose (14 mM); (4) celotetraose (14 mM); (5) hexil- $\beta$ -glucopiranosídeo (14 mM); (6) octil- $\beta$ -glucopiranosídeo (14 mM); (7) fenil- $\beta$ -glucopiranosídeo (14 mM); (8) metil- $\beta$ -glucopiranosídeo (14 mM); (9) Tris (14 mM).....	89
Figura 49 - Curvas de espalhamento para a enzima <i>ThBgl1</i> . ....	91
Figura 50 - Interface do programa SAXS MoW mostrando as curvas de saída (.out) do programa Gnom, e seus resultados para a estimativa da massa molecular da enzima <i>ThBgl1</i> . ....	92
Figura 51 - Curva de distribuição de distâncias, para os dados experimentais da enzima <i>ThBgl1</i> . ....	93
Figura 52 - Modelo <i>ab initio</i> para o envelope molecular da proteína <i>ThBgl1</i> alinhado com a estrutura de alta resolução de sua homóloga de mais alta identidade sequencial (pdb 3AHY). ....	93
Figura 53 - Cristal obtido para a proteína <i>ThBgl1</i> . ....	95
Figura 54 - Cristal obtido para a proteína <i>ThBgl2</i> .....	95
Figura 55 - Padrões de difração para os cristais das $\beta$ -glicosidases (A) <i>ThBgl1</i> e (B) <i>ThBgl2</i> . ....	96
Figura 56 - Estrutura de alta resolução da $\beta$ -glicosidase de <i>Trichoderma harzianum</i> ( <i>ThBgl1</i> ). ....	99

Figura 57 - Estrutura de alta resolução da  $\beta$ -glicosidase de *Trichoderma harzianum* (*ThBgl2*).  
..... 99

Figura 58 – Sobreposição das estruturas dos monômeros de alta resolução das enzimas  
*ThBgl1* e *ThBgl2*. ..... 100

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Oligonucleotídeos criados para amplificação das $\beta$ -glicosidases de <i>Trichoderma harzianum</i> . .....	40
Tabela 2 - Componentes do meio auto-indutor (meio ZY adaptado de STUDIER, 2005). ....	41
Tabela 3 – Parâmetros cinéticos para as enzimas <i>ThBgl1</i> e <i>ThBgl2</i> . ....	77
Tabela 4 - Parâmetros cinéticos para a enzima <i>ThBgl1</i> , utilizando-se pNPG como substrato. ....	85
Tabela 5 - Parâmetros cinéticos para a enzima <i>ThBgl2</i> , utilizando-se pNPG como substrato. ....	86
Tabela 6 - Parâmetros estruturais da enzima <i>ThBgl1</i> , obtidos por SAXS. ....	94
Tabela 7 – Parâmetros e estatísticas da coleta, processamento e refinamento dos dados cristalográficos das proteínas <i>ThBgl1</i> e <i>ThBgl2</i> . ....	97

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Å – Angstrom

Abs – Absorbância

atm – atmosfera

B<sub>0</sub>, B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> - coeficientes da equação do 2º grau

BLAST - *Basic local alignment search tool*

CAZY - *Carbohydrate-Active enZymes*

°C – Graus Celsius

CD – Dicroísmo Circular

CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono

dATP – *Deoxyadenosine triphosphate*

D<sub>máx</sub> – distância máxima do envelope protéico

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DTT - Ditioneitol

dTTP – *Deoxythymidine triphosphate*

DRX – Difração de Raios-X

χ – discrepância

EMBL – *European Molecular Biology Laboratory*

ES – Enzima-substrato

G – glicone

Ag - Aglicone

g - grama

GH – Hidrolases de Glicosídeo

GOD – Glicose-oxidase

h – hora

id. - identidade

I – intensidade

kDa - Quilodaltons

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – Fosfato de Potássio Monobásico Anidro

K<sub>m</sub> – Constante de Michaelis-Menten

K<sub>m</sub><sup>1</sup> - constante cinética do primeiro substrato

K<sub>m</sub><sup>2</sup> - constante cinética do segundo substrato



L – Litro  
LIC – Método de Clonagem Independente de Ligação  
mg – miligrama  
mL – Microlitro  
M – Molar  
mM – milimolar  
mm - milímetro  
MgSO<sub>4</sub> – Sulfato de Magnésio  
min – Minuto  
µL - Microlitro  
µm – Micrômetro  
µM – Micromolar  
NaCl – Cloreto de Sódio  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – Fosfato de Sódio Dibásico  
ng - Nanograma  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Sulfato de Amônio  
Ni<sup>2+</sup> - Níquel II  
nm – Nanômetro  
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase  
PDB – *Protein Data Bank*  
PMSF - *Phenylmethylsulfonyl Fluoride*  
pNPG - *4-Nitrophenyl-β-D-glucopyranoside*  
p/v – peso/volume  
pH – Potencial Hidrogeniônico  
pK<sub>a</sub> – Constante de Acidez  
p(r) - função de distribuição de distâncias  
q – vetor espalhamento  
R<sub>factor</sub> – fator de refinamento utilizando-se de todas as reflexões  
R<sub>free</sub> – fator de refinamento utilizando-se apenas as reflexões do conjunto de teste  
R<sub>g</sub> – raio de giro  
RMSD – *Root Mean Square Deviation*  
rpm – Rotações por Minuto  
[S] – Concentração de Substrato  
SAXS – Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo

SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulfate Poliacrylamide Gel Electrophoresis*

TEV - *Tobacco Etch Virus*

*ThBgl1* –  $\beta$ -glicosidase de *Thichoderma harzianum* (1)

*ThBgl2* –  $\beta$ -glicosidase de *Thichoderma harzianum* (2)

TRX – Tioiredoxina

U – Unidade de Atividade Enzimática

V - velocidade

v/v – volume/volume

$V_{m\acute{a}x}$  – Velocidade Máxima

$V_m^H$  - velocidade máxima da rota de hidrólise

$V_m^T$  - velocidade máxima da rota de transglicosilação

%H - função que descreve a porcentagem de enzimas que segue a rota da hidrólise em cada concentração de substrato

%T - função que descreve a porcentagem de enzimas que segue a rota da transglicosilação em cada concentração de substrato

$\theta$  - ângulo

$\lambda$  – Comprimento de Onda

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	23
2.1. Biomassa Vegetal .....	23
2.2. Hidrólise da Biomassa.....	27
2.3. Celulases.....	28
2.4. Hidrolases de Glicosídeos .....	30
2.5. $\beta$ -glicosidases .....	33
2.6. Microrganismos celulolíticos .....	35
2.7. <i>Trichoderma harzianum</i> .....	35
3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS .....	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	38
4.1. Clonagem e Transformação.....	38
4.2. Expressão Heteróloga de $\beta$ -glicosidases de <i>Trichoderma harzianum</i> em <i>Escherichia coli</i> .....	40
4.3. Extração e Purificação das $\beta$ -glicosidases .....	41
4.3.1. Cromatografia de Afinidade 1 .....	42
4.3.2. Clivagem da Tio redoxina e Cromatografia de Afinidade 2.....	43
4.3.3. Cromatografia por Exclusão de Massa Molecular .....	43
4.4. Determinação do pH e Temperatura Ótimos.....	44
4.5. Atividade específica em diferentes substratos .....	44
4.6. Atividade de $\beta$ -glicosidase.....	45
4.7. Cinética Enzimática .....	45
4.7.1. Ensaios para Determinação do pH Ótimo .....	46
4.7.2. Ensaios de Atividade e de Cinética de $\beta$ -glicosidase.....	47
4.7.3. Ajuste dos dados .....	48

4.8. Ensaio com diversos inibidores .....	50
4.9. Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS) .....	50
4.10. Ensaio de Cristalização .....	52
4.10.1. Coleta e Processamento de Dados de Difração de Raios-X .....	55
4.10.2. Determinação da Estrutura .....	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	58
5.1. Clonagem e Transformação .....	58
5.2. Expressão Heteróloga de $\beta$ -glicosidases de <i>Trichoderma harzianum</i> por <i>Escherichia coli</i> .....	61
5.3. Purificação das $\beta$ -glicosidases .....	62
5.3.1. Cromatografia de afinidade 1 .....	62
5.3.2. Clivagem da Tiorredoxina e Cromatografia de Afinidade 2 .....	63
5.3.3. Cromatografia por Exclusão de Massa Molecular .....	66
5.4. Determinação do pH e Temperatura Ótimos .....	67
5.5. Atividade específica em diferentes substratos .....	70
5.6. Atividade de $\beta$ -glicosidase .....	71
5.8. Ensaio com diversos inibidores .....	87
5.9. Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS) .....	90
5.10. Ensaio de Cristalização .....	94
5.10.1. Coleta e Processamento de Dados de Difração de Raios-X .....	95
5.10.2. Determinação das estruturas cristalográficas .....	98
6. Conclusões .....	101
7. Perspectivas .....	101
8. Referências .....	102



## 1. INTRODUÇÃO

O suprimento de energia pertence à base operacional de uma sociedade, além de constituir um fator determinante no posicionamento econômico, político e social das nações. O aumento populacional, acompanhado do desenvolvimento socioeconômico, fez com que crescesse o consumo energético. Entretanto, a negligência mundial em relação aos combustíveis não renováveis trouxe ao planeta e às indústrias de abastecimento uma grave crise energética e um dos maiores desafios enfrentados pela nossa sociedade é o de atender às demandas mundiais referentes ao consumo de energia e mudança da matriz energética (PEREIRA JR. et al., 2008; BON et al., 2008; GOLDEMBERG, 2007).

Há, ainda, forte dependência de combustíveis fósseis como carvão, petróleo e gás. O Fórum Econômico Mundial lançou um relatório em março de 2013 mostrando que o consumo mundial de energia aumentou 27% desde 2000, com 87% do abastecimento de energia primária representado por combustíveis fósseis. Essa situação não pode persistir por muito tempo, pois, além da exaustão gradativa das reservas fósseis há também efeitos negativos ao meio ambiente resultantes das emissões de carbono (ENERGY INFORMATION, 2005). Dentre os problemas oriundos dessas emissões podemos citar o aumento da temperatura global, o derretimento das calotas polares com conseqüente aumento dos níveis dos oceanos, impactos na agricultura e perda da biodiversidade (PEREIRA Jr. et al., 2008).

A tentativa pela redução do aquecimento global encorajou o surgimento de pesquisas com o objetivo de desenvolver métodos que contenham as emissões de gases responsáveis pelo efeito estufa. As fontes energéticas renováveis e limpas podem ser a solução para esse problema, uma vez que poderão reduzir o impacto climático global gerado pelo uso desenfreado dos combustíveis fósseis, e, além disso, atender à crescente demanda energética (CHUNDAWAT et al., 2011; MOHANRAM et al., 2013). Nesse cenário ganham destaque os biocombustíveis, em especial o etanol.

O etanol é o principal recurso para substituição do petróleo, principalmente como combustível para alguns meios de transporte. Entretanto, apesar de viável e muito bem estabelecido, o etanol obtido pelo processo de primeira geração não será

suficiente para suprir a crescente demanda mundial. Além disso, cria-se um cenário no qual a demanda por matéria-prima compete com o setor de alimentos quando terras destinadas ao cultivar são utilizadas na plantação de vegetais para produção desse combustível. Nesse contexto, uma alternativa surgiu nas últimas décadas, desenvolvida por pesquisas baseadas em biomassas lignocelulósicas para obtenção de combustíveis renováveis, uma vez que esses materiais representam uma alternativa de substrato renovável, de baixo custo e sustentável, além de tratar-se de uma fonte neutra de emissão de carbono (CHUNDAWAT et al., 2011; DEMIRBAS, 2007).

No Brasil, por exemplo, o bagaço de cana-de-açúcar é um dos mais abundantes subprodutos derivados da indústria sucroalcooleira, remanescente do processo de obtenção do caldo de cana para produção de açúcar e álcool (BOCCHINI, 2005). Com isso, os laboratórios de pesquisa desenvolveram uma alternativa econômica para esse substrato, que consiste na sua utilização como matéria-prima para a produção de biocombustíveis, em especial o etanol (FINGUERUT et al., 2006). Diferentemente do etanol convencional, o bioetanol é feito com base em materiais da biomassa celulósica ou, mais designadamente, lignocelulósica. Esse processo de produção de etanol é referido como uma segunda geração de combustíveis, cujo processamento é uma das mais promissoras tecnologias apresentadas pelo homem (BASTOS, 2007).

A biomassa é a única fonte apropriada e renovável de energia primária que, em curto prazo, pode ser convertida em biocombustíveis e energia. Entretanto, os materiais lignocelulósicos não contêm prontamente os monossacarídeos disponíveis para bioconversão e precisam ser hidrolisados por ácidos ou enzimas em açúcares fermentáveis. A hidrólise enzimática é o caminho mais promissor, porém a baixa acessibilidade da celulose nativa é um problema chave para o processo de obtenção de etanol, tornando-se necessário um pré-tratamento a fim de aumentar a porosidade do material e a susceptibilidade à celulose (CARDONA et al., 2010).

Muitos microrganismos desempenham um importante papel na conversão da biomassa vegetal ao produzirem coquetéis enzimáticos capazes de degradar os componentes da parede celular. Esse complexo de enzimas é composto pelas celulasas identificadas como hidrolases de glicosídeos e é capaz de quebrar a recalcitrância da biomassa, catalisando a hidrólise da celulose em açúcares

redutores, podendo ser utilizado em condições mais amenas e apresentando alto rendimento de carboidratos fermentáveis (FARINAS, 2011). Entretanto, o alto custo das celulases ainda é um entrave ao processo de obtenção de etanol a partir de resíduos orgânicos.

Desta forma, a conversão de grande quantidade de biomassa em açúcar fermentável tem aplicação potencial na área de geração de bioenergia e o objetivo principal é tornar o processo de conversão da biomassa viável, com custo competitivo, ambientalmente favorável e altamente sustentável em comparação aos seus equivalentes petroquímicos. Dentro desse contexto, o entendimento da estrutura da parede celular vegetal e da atuação das enzimas que degradam os polissacarídeos em açúcares fermentáveis torna-se de fundamental importância na viabilização do uso da biomassa vegetal como fonte de energia renovável (FARINAS et al., 2010).

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Biomassa Vegetal**

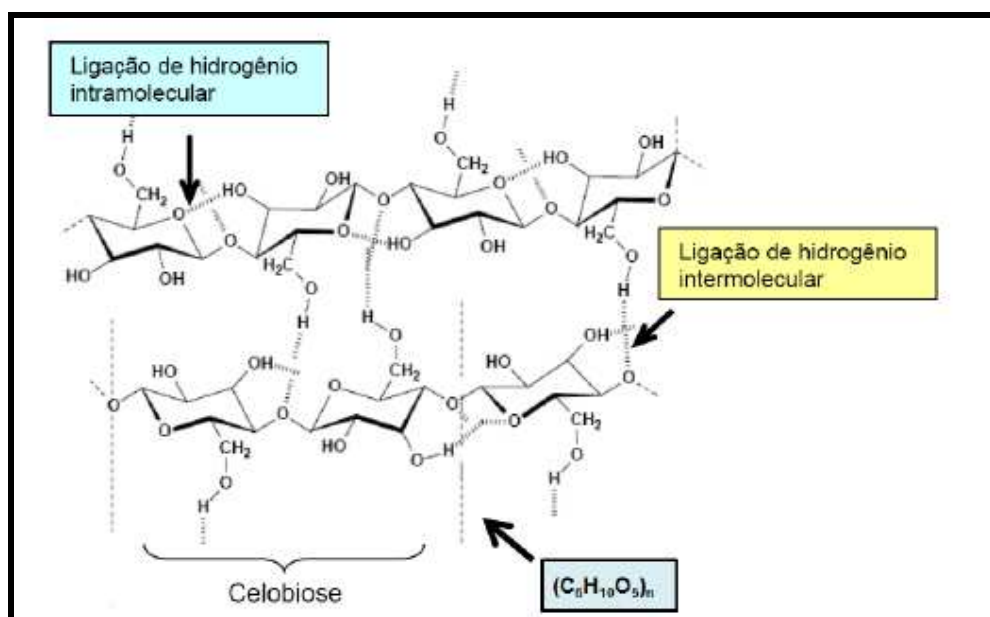
Em geral, denomina-se biomassa lignocelulósica qualquer matéria de origem vegetal, que dispõe de componentes energéticos e pode ser processada para fornecer formas bioenergéticas mais elaboradas e adequadas para o uso final. Como destaque, tem-se a conversão de resíduos agrícolas e agroindustriais, resíduos florestais, resíduos orgânicos urbanos e outros resíduos agropecuários em biocombustíveis líquidos (RAVEN, EVERT, EICHCHORN, 2001). Os materiais lignocelulósicos apresentam-se vantajosos nesse sentido por serem abundantes, renováveis, e, sobretudo, possuírem baixo custo de produção, altos índices de rendimentos, boa adequação ao solo, bem como baixos impactos ambientais (BALAT et al., 2008; BALAT, 2011).

A principal fonte de matéria-prima para produção do bioetanol, contida na biomassa lignocelulósica, é a parede celular vegetal. A maioria do carbono fixado fotossinteticamente é incorporado aos polímeros da parede celular vegetal, tornando esse material a fonte mais abundante de biomassa terrestre. Quanto a sua



composição, trata-se de uma mistura de polissacarídeos, proteínas, compostos fenólicos e sais minerais. Os polissacarídeos representam cerca de 90% do peso seco da parede e consistem em celulose, hemiceluloses e pectinas. Além dos polissacarídeos, a parede celular também contém lignina, um polímero aromático que fornece rigidez à planta (FARINAS, 2011).

A celulose é o principal polímero constituinte da parede celular das plantas, sendo constantemente renovada pelo processo de fotossíntese. Quimicamente é um polímero linear simples formado unicamente por moléculas de glicose unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4 e estabilizadas por ligações de hidrogênio intramoleculares (ligações entre unidades de glicose da mesma molécula) e intermoleculares (entre unidades de glicose de moléculas adjacentes). As moléculas de celobiose, um dissacarídeo formado por unidades de D-glicose invertidas 180° em relação à anterior, são a unidade repetitiva deste polissacarídeo natural (Figura 1) (MORAIS et al., 2005).



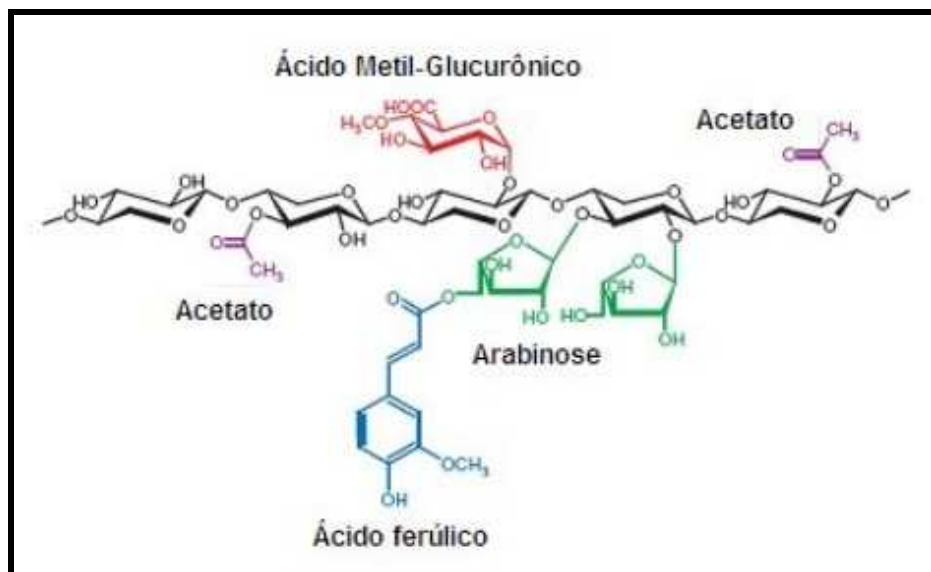
**Figura 1-** Estrutura química do polímero de celulose (MORAIS et al., 2005).

As ligações intermoleculares são as responsáveis pela formação de fibrilas, estruturas altamente ordenadas que associam-se formando as fibras de celulose. As fibrilas apresentam desde regiões com elevado grau de cristalinidade até regiões com menor grau de ordenação chamadas regiões amorfas. A celulose amorfa é a

forma na qual a celulose encontra-se mais suscetível à degradação enzimática (HALL, 2010; TESTONI, 2010).

O arcabouço de celulose é preenchido por lignina e por moléculas denominadas hemiceluloses (LAGAERT et al., 2009). Em razão de suas propriedades bioquímicas, as hemiceluloses mantêm interações covalentes com as moléculas de lignina e não covalentes com as moléculas de celulose. A associação covalente de hemiceluloses com lignina forma uma camada sobre as fibras de celulose, protegendo-as contra a degradação por celulases (ROCHA, 2010).

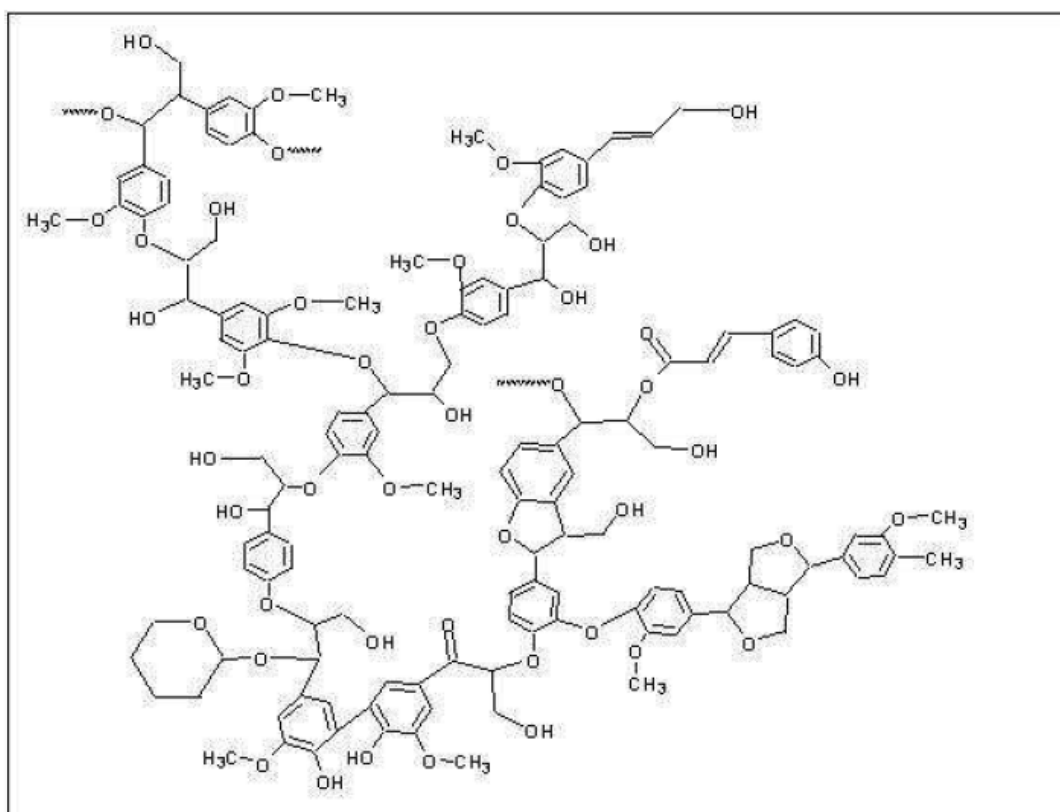
As hemiceluloses são heteropolissacarídeos formados por vários resíduos de açúcares pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glicose, manose e galactose), ácidos urônicos e grupos acetila. Os açúcares estão ligados entre si, formando uma estrutura principal composta por um tipo específico de resíduo, a partir da qual surgem ramificações laterais de cadeias curtas de outros compostos. As hemiceluloses são classificadas de acordo com o açúcar predominante na cadeia principal e na ramificação lateral. As principais hemiceluloses encontradas em plantas são os xiloglucanos (XyG), os glucuronoarabinoxilanos (GAX) e os mananos (MN). Em todos os casos, há uma cadeia principal de monossacarídeos de glicose, xilose e manose, respectivamente, que pode ser ramificada com diferentes monossacarídeos (Figura 2) (BUCKERIDGE, 2010).



**Figura 2** - Estrutura típica da hemicelulose mostrando as diferentes ligações e compostos encontrados nas ramificações (Adaptado de DODD; CANN, 2009).

A lignina não possui moléculas de açúcar e envolve as moléculas de celulose e hemicelulose. É responsável pelo suporte estrutural, impermeabilidade e resistência ao ataque microbiano da célula. A lignina está presente em quantidades menores em relação à fração celulósica, mas, mesmo assim, é suficiente para retardar, ou mesmo impedir completamente, a atuação microbiana sobre o material. Dessa forma, faz-se imprescindível o uso de pré-tratamentos no material, com o intuito de aumentar sua susceptibilidade ao agente de interesse, pela remoção da lignina e redução da cristalinidade da estrutura celulósica (CASTRO, PEREIRA JR., 2009).

A lignina representa um dos maiores estoques de carbono/energia da natureza, sendo o maior depósito de compostos aromáticos, constituindo-se, assim, em uma fonte potencial de valiosos insumos para a indústria química (SEABRA, MACEDO, 2011). As unidades monoméricas precursoras da lignina são hidroxilas fenólicas dos alcoóis trans-p-cumarílico, trans-coniferílico e álcool trans-sinapílico (FENGEL; WEGENER, 1989). A Figura 3 mostra a estrutura geral desse composto.



**Figura 3** - Estrutura Geral da Lignina (MARX, 2000).

A recalcitrância da parede celular consiste da própria organização cristalina da celulose, proveniente da estrutura linear de suas cadeias compactadas em microfibrilas, e a alta proteção conferida pela lignina e pela hemicelulose, atuando, dessa forma, como uma barreira física ao ataque enzimático, principal obstáculo para a hidrólise da celulose presente nas biomassas vegetais (RABELO, 2010).

Muitos organismos vivos tiram proveito da diversidade existente de carboidratos e usam polissacarídeos e oligossacarídeos para um grande número de funções biológicas, desde estruturais e de armazenamento de energia, até a sinalização de processos altamente específicos. Nesse sentido, a hidrólise seletiva de ligações glicosídicas é crucial para obtenção de energia, expansão e degradação da parede celular (DAVIES, HENRISSAT, 1995).

## **2.2. Hidrólise da Biomassa**

Há um interesse crescente na produção e uso do bioetanol, produzido pela fermentação de açúcares provenientes de biomassas vegetais (SÁNCHEZ, CARDONA, 2008). Porém, a fim de viabilizar o processo de produção do etanol lignocelulósico, tornando o seu valor competitivo com o etanol produzido a partir do caldo de cana, maiores estudos são necessários, bem como uma tecnologia mais eficiente de conversão da biomassa.

O Brasil, devido à sua vasta atividade industrial e agrícola, possui uma grande variedade de resíduos agroindustriais, cujo bioprocessamento é de grande interesse econômico e social (RAMOS, 2001). A utilização desses resíduos em bioprocessos é uma alternativa para obtenção de energia com base em matéria orgânica renovável, ajudando a solucionar o problema da poluição ambiental.

A composição química dos materiais lignocelulósicos é um dos principais fatores que afetam o processo de conversão em etanol (BALAT et al., 2008). A conversão da celulose em glicose requer três etapas principais: o pré-tratamento para liberação da celulose e da hemicelulose do complexo formado com a lignina; hidrólise (através de rota química ou enzimática) destes polímeros para produção de açúcares livres e fermentação da mistura de hexoses e pentoses para produção de etanol propriamente dito (LEE et al., 2002).

O pré-tratamento objetiva a remoção da lignina e o rompimento da estrutura cristalina da celulose, de modo que a hidrólise possa ser alcançada mais rapidamente e com maior rendimento. (ZUÑIGA, 2010).

O processo de hidrólise destina-se à quebra de moléculas de celulose ou hemicelulose, por meio da ação de ácido sulfúrico aos resíduos, no caso da hidrólise ácida, ou pela ação de enzimas (celulases), no caso da hidrólise enzimática, e, assim, produzir açúcares fermentescíveis (WYMAN, 2005).

Entre as dificuldades para o processo de hidrólise, podemos citar aquelas decorrentes de fatores físico-químicos do processo e fatores estruturais da biomassa (MOSIER et al., 2005) além do elevado custo de produção de enzimas celulases (ZHUANG et al., 2007). Apesar do alto custo da utilização de enzimas, a hidrólise enzimática, em comparação ao tratamento químico, apresenta-se como uma alternativa mais adequada à produção de etanol devido à maior possibilidade em se obter rendimentos glicosídicos elevados, ao mesmo tempo em que são obtidos hidrolisados com reduzida toxicidade aos microrganismos (FINGUERUT et al., 2006). Além disso, os tratamentos biológicos incluem condições de reação mais brandas, inexistindo problemas de corrosão; menor número de reações secundárias e menor demanda energética, além de eliminarem o descarte de resíduos prejudiciais ao meio ambiente (TESTONI, 2010).

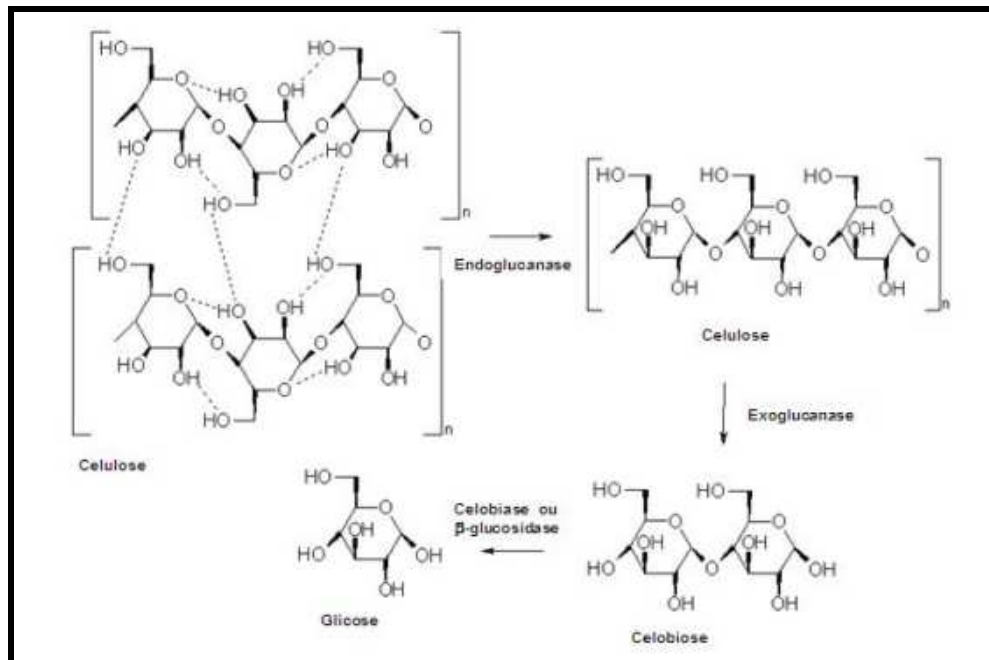
### **2.3. Celulases**

A hidrólise enzimática da celulose envolve um complexo arranjo de enzimas que clivam ligações O-glicosídicas e são conhecidas como celulases.

A produção de celulases em escala industrial começou em meados da década de 80, visando sua aplicação como um aditivo para ração animal, a fim de aumentar a digestibilidade de rações por ruminantes e monogástricos. Em seguida, essas enzimas começaram a ser utilizadas como um insumo para a indústria de alimentos, objetivando melhorar as propriedades sensoriais de massas. Nesse setor, as celulases também começaram a atuar no processamento de bebidas, promovendo a clarificação de sucos de frutas e vinhos. Posteriormente, as enzimas celulolíticas começaram a ser utilizadas em larga escala nas seguintes indústrias: têxtil, nos processos de biopolimento (desfibrilação de tecidos como algodão, linho e

lã) e bioestonagem (amaciamento e desbotamento do brim); de polpa e papel, para a modificação controlada de propriedades mecânicas da polpa e liberação de tintas da superfície das fibras a serem recicladas; e em lavanderia, de forma a aumentar o brilho, a remoção de sujeiras e a maciez dos tecidos, além de amenizar o desgaste das peças (CASTRO, PEREIRA JR., 2009).

Em se tratando da produção de bioetanol, as celulases têm importante papel no processo de hidrólise enzimática da celulose e são constituídas por três componentes principais: as endoglucanases (EG), que causam mudança rápida no grau de polimerização através da hidrólise de ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 intramoleculares da cadeia de celulose, criando novos sítios para atuação das exoglucanases; as exoglucanases ou celobiohidrolases que são ativas sobre celulose cristalina, liberando glicose (livre) ou celobiose a partir dos terminais da cadeia e as  $\beta$ -glicosidases que hidrolisam ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 da molécula de celobiose e de pequenos oligossacarídeos, com liberação de glicose (ZHANG et al., 2006). A Figura 4 ilustra a ação das celulases na hidrólise da fibra celulósica.



**Figura 4** - Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico (FARINAS, 2011).

Bactérias e fungos são utilizados na produção de enzimas celulolíticas, porém, devido à baixa produção dessas enzimas por bactérias, os estudos têm direcionado sua síntese por fungos, como, por exemplo, espécies de *Trichoderma*

(BALAT, 2011). A degradação de celulose catalisada por enzimas provenientes de fungos é de grande importância no nosso ecossistema. O interesse primário nas celulases desses microrganismos vem do fato de muitos produzirem celulases extracelulares em quantidades significantes (ZHOU, INGRAM, 2000).

## 2.4. Hidrolases de Glicosídeos

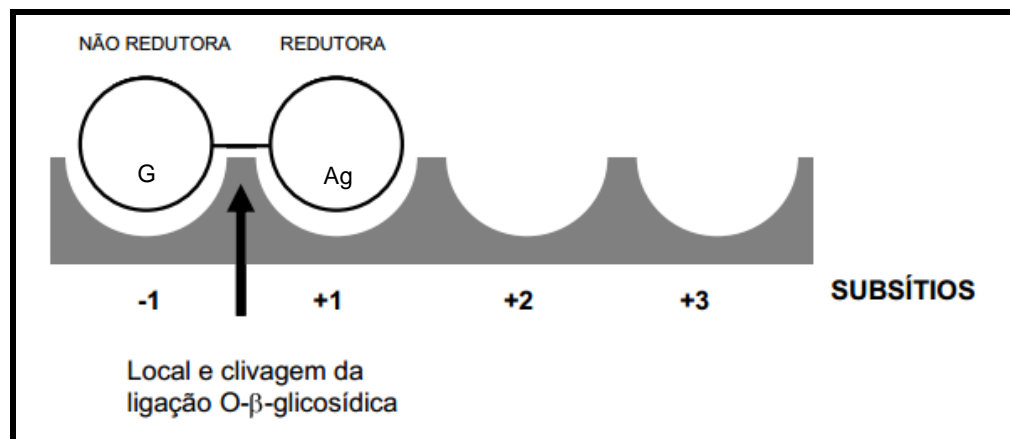
A variedade e complexidade de estruturas que os oligossacarídeos e polissacarídeos podem adotar torna este grupo de moléculas essenciais e empregadas pelos organismos vivos para uma grande quantidade e variedade de funções biológicas. Com base no princípio de atuação sobre tais moléculas, criou-se o grupo das enzimas que são ativas sobre carboidratos ou moléculas glicosiladas e elas foram agrupadas em um banco de dados chamado *Carbohydrate-Active enZymes* (CAZy) (HENRISSAT; BAIROCH, 1993) (CANTAREL et al., 2009). Nesse banco de dados estão inclusos vários grupos de enzimas, sendo que o grupo das hidrolases de glicosídeos é o mais representativo e abundante e é o grupo no qual se encontram as enzimas estudadas.

As hidrolases de glicosídeos (GHs) correspondem a enzimas que agem hidrolisando ligações glicosídicas e foram agrupadas em famílias com base na semelhança de suas sequências de aminoácidos e na análise de grupamentos hidrofóbicos (HENRISSAT; BAIROCH, 1993) (CANTAREL et al., 2009). Essa classificação também é realizada por novos métodos que incluem análises filogenéticas das enzimas, de forma a promover a interação entre a sequência e a especificidade das mesmas e aprimorar tal divisão em subfamílias (LOMBARD et al., 2013).

As enzimas em estudo nesse trabalho estão agrupadas dentro da família 1 das hidrolases de glicosídeos (GH1), que é uma das mais importantes, tanto em termos qualitativos quanto quantitativos. Nessa família, a maioria é  $\beta$ -glicosidase, mas existem também  $\beta$ -galactosidases,  $\beta$ -manosidases, entre outras (HENRISSAT et al., 2005).

As GH1 tipicamente hidrolisam substratos do tipo G-O-X, no qual G representa a extremidade não redutora, também chamada de glicone, glicona ou glicônica da molécula, e X a extremidade redutora, ou aglicone. A extremidade G é

conectada à extremidade X por uma ligação do tipo  $\beta$ . O aglicone pode ser um outro monossacarídeo ou um grupo não carboidrato, de tal forma que esta é a porção mais variável entre os substratos dessas enzimas. A letra O indica que este grupo de enzimas hidrolisa ligações do tipo  $\beta$  de O-glicosídeos. Em geral, as funções fisiológicas de glicosídeos naturais são determinadas pela natureza química do aglicone (HENRISSAT; DAVIES, 1997). A Figura 5 traz o mecanismo de hidrólise catalisado pelas enzimas da família GH1. Os dois círculos conectados representam, cada um, um monossacarídeo de um substrato, e a parte escura o sítio ativo de uma  $\beta$ -glicosidase com seus respectivos subsítios.



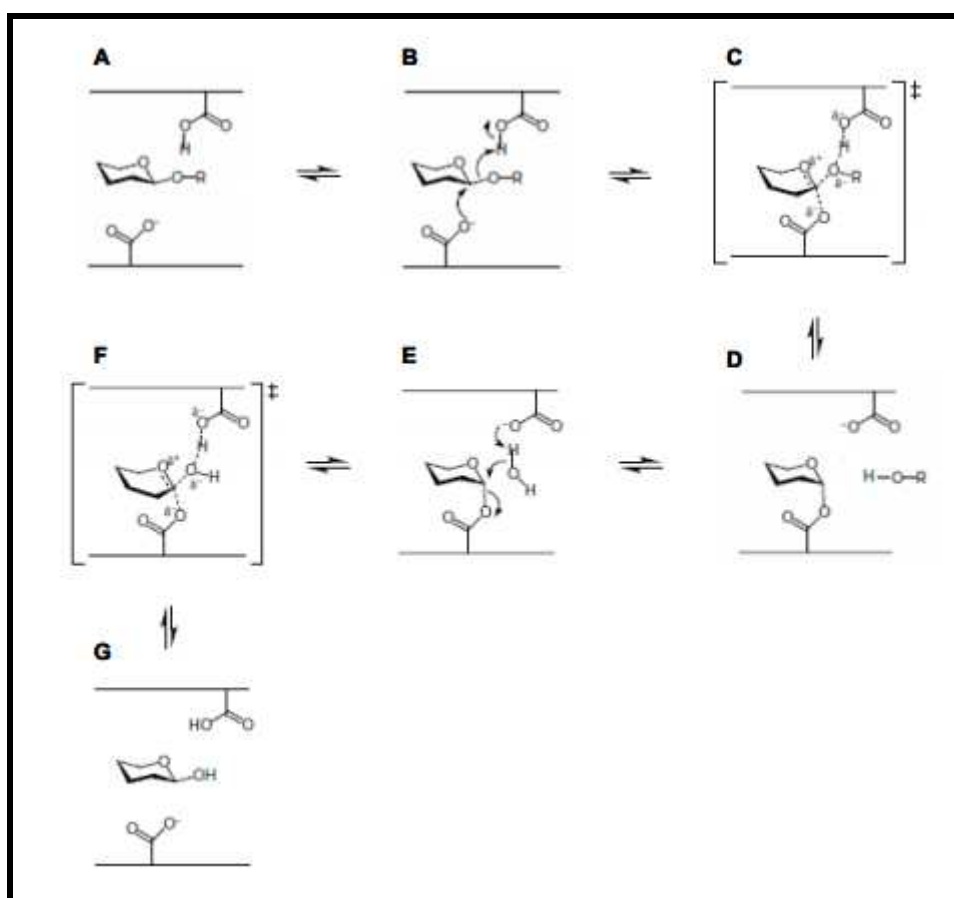
**Figura 5** - Hidrólise de substratos catalisada por enzimas da família GH1 (adaptado de HENRISSAT & DAVIES, 1997)

O sítio ativo das  $\beta$ -glicosidases apresenta um subsítio de ligação da extremidade não redutora do substrato, conhecido como subsítio -1 (subsítio do glicone), enquanto a extremidade redutora do substrato é acomodada nos subsítios +1, +2, +3 etc (subsítio do aglicone). A clivagem da ligação glicosídica ocorre entre os subsítios -1 e +1 (representado pela flecha).

As  $\beta$ -glicosidases, classificadas na família 1, constituem o maior grupo de enzimas das hidrolases de glicosídeos e têm sido o principal foco de pesquisas devido às suas funções nos sistemas biológicos, mas também devido a interesses na aplicação dessas enzimas em processos biotecnológicos (HENRISSAT et al., 2005). Elas têm como uma de suas principais características a retenção da configuração do carbono anomérico no produto liberado. Em linhas gerais, o mecanismo de reação se processa da seguinte maneira (Figura 6): a) um substrato



ocupa o sítio ativo, com o glicone no subsítio -1 e seu aglicone (-OR) no +1. B) o ácido glutâmico catalítico que age como ácido/base doa um próton ao O da ligação glicosídica. O ácido glutâmico catalítico que age como um nucleófilo efetua um ataque sobre o carbono anomérico. C) há formação de um estado de transição com o glicone adotando uma configuração do tipo “meia-cadeira”; a ligação glicosídica com o aglicone está sendo desfeita e uma ligação glicosil-enzima está sendo formada. D) o aglicone é liberado e o intermediário covalente glicosil-enzima está formado. O glicone assume uma conformação do tipo “cadeira”. E) uma molécula de água difunde-se para o sítio ativo onde tem seu próton abstraído pela base catalítica, possibilitando que ela realize um ataque nucleofílico no C anomérico. F) um estado de transição igual ao da etapa C é novamente formado, dessa vez uma ligação entre o carbono anomérico e a água está sendo formada e a ligação glicosil-enzima está sendo desfeita. G) o produto final é liberado, um monossacarídeo.



**Figura 6** - Mecanismo catalítico proposto para  $\beta$ -glicosidases (Baseado em WHITE & ROSE, 1997; WHITES & RYE, 2000).

Do ponto de vista estrutural, as enzimas da família GH1 apresentam uma estrutura terciária do tipo barril tim -  $(\beta/\alpha)_8$ , com o sítio ativo localizado na porção C-terminal do barril (WANG, 1995; JENG et al., 2011). Estas enzimas hidrolisam ligações do tipo  $\beta$ -glicosídicas através de um mecanismo que envolve dois ácidos glutâmicos catalíticos presentes em regiões conservadas da enzima. Nas  $\beta$ -glicosidases da família GH1 o conjunto de aminoácidos do interior do sítio ativo e dois ácidos glutâmicos catalíticos participam da ligação do substrato e estabilização do complexo enzima-substrato no estado de transição, sendo, assim, responsáveis pela atividade e especificidade destas enzimas (MARANA, 2006).

## 2.5. $\beta$ -glicosidases

As  $\beta$ -glicosidases catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 em uma variedade de glicosídeos pela remoção de monossacarídeos da extremidade não-redutora do substrato (CANTAREL et al., 2009).

Essas enzimas são capazes de atuar no metabolismo de glicosídeos e glicolipídeos em animais, defesa, lignificação da parede celular, ativação de fito-hormônios, liberação de compostos aromáticos em plantas e conversão da biomassa em microrganismos (CAIRNS; ESEN, 2010). O interesse inicial pelo estudo das  $\beta$ -glicosidases surgiu na década de 1950, devido ao seu envolvimento na conversão biológica da celulose (LYND et al., 2002; ZHANG et al., 2006).

No complexo celulolítico, as  $\beta$ -glicosidases são cruciais para a hidrólise eficiente da celulose, sendo responsáveis pela liberação de moléculas de glicose, produtos finais da hidrólise. Além disso, a atividade  $\beta$ -glicosídica pode otimizar a ação sinérgica de outras celulasas, aumentando o rendimento do produto final e diminuindo a concentração de celobiose que é forte inibidor do complexo celulolítico (KOROTKOVA, 2009).

Entretanto, a hidrólise enzimática de biomassas lignocelulósicas heterogêneas requer  $\beta$ -glicosidases com diferentes níveis de especificidade para di- ou oligossacarídeos. Assim, estudos detalhados sobre a estrutura dessas enzimas, tais como atividade e especificidade, são necessários para aprofundar o conhecimento a respeito das bases moleculares que regem o mecanismo de ação das  $\beta$ -glicosidases. Além de sua importância como constituinte do sistema de

degradação da celulose, as  $\beta$ -glicosidases são consideradas de grande interesse industrial devido às suas aplicações na indústria alimentícia, como, por exemplo, na liberação de compostos fenólicos, importantes agentes antioxidantes (DAN, 2000).

As  $\beta$ -glicosidases representam um grupo heterogêneo de enzimas, não existindo um sistema único definido para sua classificação. Em geral, dois sistemas de classificação são descritos na literatura, um baseado na especificidade de substrato e o outro na similaridade na sequência de nucleotídeos (BHATIA et al., 2002).

Na classificação baseada na especificidade de substrato, as  $\beta$ -glicosidases são divididas em três grupos: a) aril  $\beta$ -glicosidases, que agem em aril-glicosídeos; b) celobiasas verdadeiras, capazes de hidrolisar celobiose e c)  $\beta$ -glicosidases com ampla especificidade de substrato, que hidrolisam uma variedade de substratos; sendo que a maioria das  $\beta$ -glicosidases já caracterizadas encontram-se neste último grupo (BHATIA et al., 2002).

Entre as classificações propostas para identificação das  $\beta$ -glicosidases com base na similaridade da sequência de nucleotídeos, a mais aceita é baseada tanto na similaridade das sequências de nucleotídeos quanto nos padrões de enovelamento destas enzimas (BHATIA et al., 2002). Nesta classificação as  $\beta$ -glicosidases representam um grupo importante entre as hidrolases de glicosídeos e estão reunidas nas famílias 1 e 3. Dentro da família 1 a estrutura tridimensional de algumas  $\beta$ -glicosidases já foi resolvida, revelando um padrão comum de disposição de  $\alpha$ -hélices e folhas- $\beta$ , além da presença de vários resíduos de aminoácidos altamente conservados, localizados nas proximidades do sítio ativo (JENKINS et al., 1995; BHATIA et al., 2002).

As  $\beta$ -glicosidases são consideradas responsáveis pela regulação de todo processo celulolítico, constituindo o fator limitante da hidrólise enzimática da celulose, uma vez que endoglucanases e celobiohidrolases são inibidas por celobiose. Além de serem responsáveis pela produção de glicose a partir de celobiose, permitem também a ação eficiente de exoglucanases e endoglucanases (KAUR et al., 2007). Por outro lado, grande parte das  $\beta$ -glicosidases conhecidas é inibida por glicose (BHATIA et al., 2002; LYND et al., 2002; YANG et al., 2008). Dessa maneira, existe um interesse crescente na busca por enzimas tolerantes ao

produto final, o que melhoraria acentuadamente a eficiência do processo de hidrólise da celulose.

## **2.6. Microrganismos celulolíticos**

A grande quantidade de celulose formada anualmente não se acumula sobre o planeta devido à ação de fungos e bactérias que são capazes de degradar eficientemente os materiais das paredes celulares de plantas. A biodegradação da celulose por celulasas, produzidas por uma grande variedade de microrganismos, representa o maior ciclo de carbono da biosfera e pode ser amplamente utilizada na produção de bioprodutos, sem emissão líquida de CO<sub>2</sub> na atmosfera (ARO et al., 2005; LYND et al., 2002; ZHANG et al., 2006).

Os microrganismos celulolíticos estão distribuídos em grupos taxonômicos extremamente variados e podem ser encontrados em toda a biota em que se acumulem resíduos celulolíticos (LYND et al., 2002).

A procura de fontes de enzimas celulolíticas é de grande interesse para um melhor processo de bioconversão de celulose. Embora vários microrganismos como fungos e bactérias tenham sido avaliados pela sua capacidade de degradar celulose em monômeros de glicose, poucos foram selecionados por suas potenciais produções de celulasas (DAS, ROYER, LEV, 2007; YU et al., 2007).

Em se tratando da degradação da parede celular das plantas por fungos filamentosos celulolíticos, consiste de um processo complexo que envolve a ação de um grande número de enzimas extracelulares, celulasas, hemicelulasas, pectinases e ligninases, o que dá a esses organismos meios para obtenção de energia e nutrientes (ARO et al, 2005).

## **2.7. *Trichoderma harzianum***

O interesse pelos microrganismos começou na antiguidade, com a utilização da fermentação para produzir pães, queijos e cerveja (LIMA, 1975). Durante a Segunda Guerra Mundial, com a descoberta da penicilina, eles passaram a possíveis fontes de substâncias bioativas (TURNER, 1975; LIMA, 2003). Os fungos

(Reino Fungi), em especial, além de fornecedores de metabólitos secundários de interesse para o homem, são muito empregados na transformação de moléculas orgânicas, revelando sua grande importância na síntese assimétrica de moléculas biologicamente ativas e com interesse comercial (GÁRCIA-PAJÓN, 2003; RAVEN, 2001).

Os fungos filamentosos constituem um grupo de organismos multicelulares, eucarióticos, com um núcleo contendo vários cromossomos, delimitado por uma membrana nuclear e organelas citoplasmáticas. O citoplasma encontra-se limitado pela membrana plasmática e pela parede celular que é composta, fundamentalmente, por proteínas e polissacarídeos como quitina, manana e glucana (ALEXOPOULOS et al., 1996). São organismos quimioheterotróficos, alimentando-se por absorção dos metabólitos encontrados no ambiente. Quando se trata de um substrato insolúvel, os fungos sintetizam e secretam enzimas apropriadas a fim de solubilizar e absorver tais metabólitos, fato que contribuiu para a descoberta de exoenzimas de importância biotecnológica (GRONDONA et al., 1997; TILBURG et al., 1993).

Com relação aos fungos do gênero *Trichoderma*, algumas espécies têm sido largamente utilizadas na área industrial para produção de celulases, pelo fato de estarem presentes em todos os lugares e terem rápida colonização. A atividade de controle biológico deste fungo depende da versatilidade metabólica e do potencial secretor, os quais são responsáveis pela produção de uma grande quantidade de diversas enzimas altamente hidrolíticas envolvidas na degradação da parede celular (HARMAN et al., 2004).

A espécie *Trichoderma harzianum* em particular, é um fungo pertencente à classe dos Deuteromicetos, atua inibindo fitopatógenos habitantes de solo, utilizando-se, normalmente, de antibiose, competição ou parasitismo. Além disso, pode atuar na decomposição de matéria orgânica e na degradação de resíduos tóxicos em solos contaminados com agrotóxicos (EZIASHI, 2007; MENEZES, 1993). O *Trichoderma harzianum* tem tido destaque na produção de celulases, embora outras espécies afins possam também fazer parte de todo o processo de produção.

### 3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O Fórum Econômico Mundial lançou um relatório em março de 2013 mostrando que o consumo mundial de energia aumentou 27% de 2000 para cá, com 87% do abastecimento de energia primária representado por combustíveis fósseis. Essa situação precisa ser revertida, uma vez que o uso desenfreado de fontes de combustíveis fósseis gera a exaustão gradativa dessas reservas, além de mudanças climáticas drásticas. Dessa forma, torna-se fundamental o aumento de estudos com o objetivo de encontrar e desenvolver substitutos para esses combustíveis. Entre eles, a produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica, como o bagaço de cana-de-açúcar, mostra-se uma alternativa sustentável e racional.

A tecnologia para conversão dessa biomassa em etanol combustível tem como princípio a hidrólise enzimática da celulose usando um complexo de enzimas conhecidas como celulasas. No entanto, o custo de conversão da biomassa pré-tratada em açúcares fermentáveis ainda é um grande gargalo para a produção de biocombustíveis (JORGENSEN et al., 2007). Com isso, trabalhos com um enfoque como o apresentado nessa dissertação são cada vez mais necessários visando a otimizar a produção de etanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar, por meio da caracterização de enzimas envolvidas na hidrólise enzimática da biomassa.

Como as  $\beta$ -glicosidases têm importante função no mecanismo de regulação da degradação enzimática da celulose, podendo ser consideradas como limitantes para o processo de hidrólise (ZHANG, LYND, 2004), o objetivo geral desse trabalho consistiu em realizar estudos sistemáticos estruturais e funcionais de duas  $\beta$ -glicosidases produzidas pelo fungo *Trichoderma harzianum*, denominadas neste trabalho como *ThBgl1* e *ThBgl2* e, assim, entender o mecanismo de ação dessas enzimas no organismo do fungo e contribuir para otimização do processo de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.

Os objetivos específicos foram:

- Clonagem das  $\beta$ -glicosidases (*ThBgl1* e *ThBgl2*) do fungo *Trichoderma harzianum*;
- Transformação dos vetores em célula de propagação;
- Expressão heteróloga e purificação das proteínas de interesse;
- Determinação das condições ótimas para atividade  $\beta$ -glicosídica;

- Caracterização molecular das  $\beta$ -glicosidases obtidas através de técnicas bioquímicas (SDS-PAGE - 15% de poliacrilamida) e da cinética enzimática;
- Cristalização e estudos de difração de raios-X (DRX) visando determinação de suas estruturas tridimensionais.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Clonagem e Transformação

Os clones em estudo (classificados como *ThBgl1* e *ThBgl2*) foram obtidos por meio de uma plataforma de clonagem, expressão e purificação de proteínas recombinantes em alto desempenho desenvolvida em nosso grupo de pesquisa pelo Dr. César Moises Camilo (Processo Fapesp: 2009/11536-3). O vetor utilizado nesse processo de clonagem foi o pETTRXA-1a/LIC, cedido ao nosso laboratório pelo Dr. Arie Geerlof (EMBL - Heidelberg), que é uma modificação do vetor pETTRX-1a (Figura 7), uma vez que foi adaptado para o método de clonagem independente de ligação (LIC) (ASLANIDIS; DE JONG, 1990) (Figura 8), que se baseia na atividade exonuclease 3' → 5' da enzima T4 DNA Polimerase para criar regiões de fita simples de 10 a 15 nucleotídeos nas pontas 5' do vetor. Paralelamente, são gerados produtos de PCR dos genes desejados, com caudas de fitas simples a 5', complementares à do vetor. Essas regiões de fitas simples complementares são criadas porque são adicionadas extensões apropriadas nos *primers* de tal modo que o fragmento amplificado não tenha timina (no caso do vetor) ou adenina (no caso do gene) nos 10 últimos nucleotídeos. Após o tratamento com T4 DNA Polimerase na presença somente de dATP (para o gene) ou somente dTTP (para o vetor) a atividade exonuclease 3' → 5' se encarrega de retirar, base a base, uma das fitas, até parar numa adenina (gene) ou timina (vetor). O pareamento do vetor com o inserto é então feito na ausência de ligase, simplesmente misturando-se os dois fragmentos de DNA. Em seguida transforma-se a mistura em bactérias *Escherichia coli* DH10B competentes para propagação do DNA recombinante. Este processo acaba sendo bastante eficiente e com poucos falsos-positivos, pois as bactérias só incorporarão DNAs circulares e, portanto, contendo o inserto.

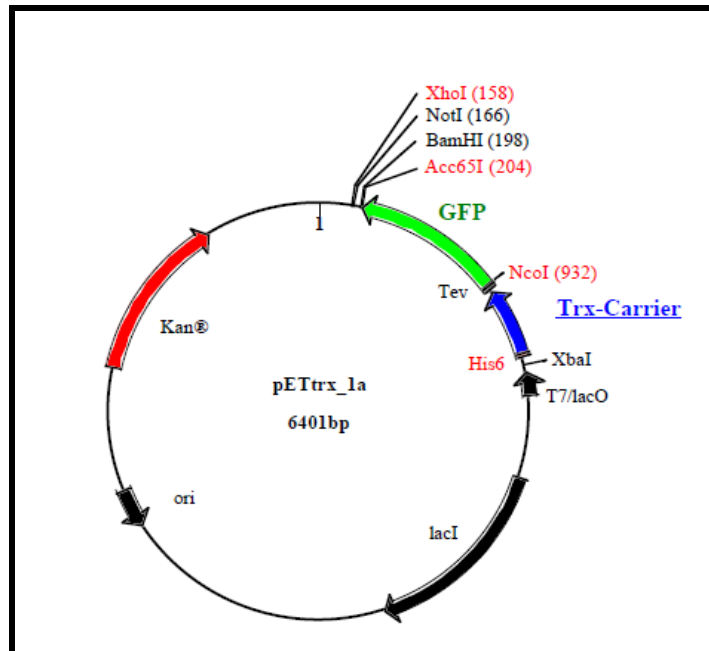


Figura 7 - vetor pETTRX-1a.

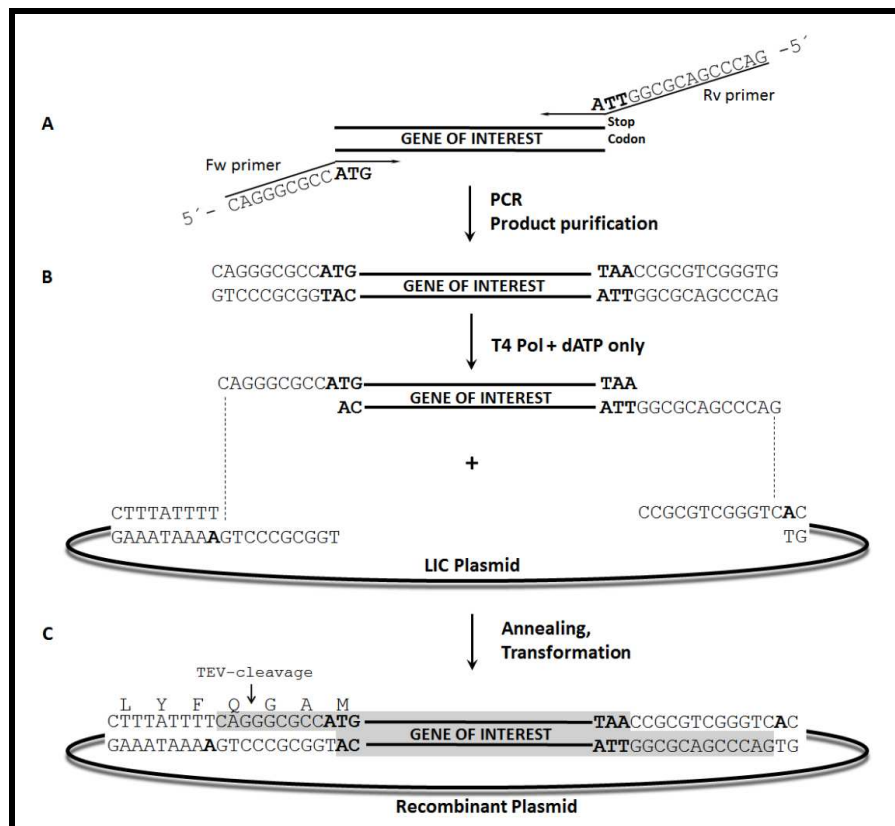


Figura 8 - Método de Clonagem Independente de Ligação (LIC). Figura de Camilo, C. M. e Polikarpov, I.



Na tabela 1, encontram-se os oligonucleotídeos confeccionados para amplificação dos genes de interesse, para cada uma das proteínas em estudo. Como molde, foi utilizada uma biblioteca de cDNA do fungo *Trichoderma harzianum* cultivado em meio contendo celulose como fonte de carbono.

**Tabela 1-** Oligonucleotídeos criados para amplificação das  $\beta$ -glicosidases de *Trichoderma harzianum*.

<b>Primer</b> <b>F<sub>v</sub></b>	CAGGGCGCCATGTTGCCCAA GGACTTTCA	CAGGGCGCCATGTCCGAGTCG CTATCTCTG
<b>Primer</b> <b>R<sub>v</sub></b>	GACCCGACGCGGTTACTCCT TCGCAATCAACTCG	GACCCGACGCGGTTAAGCGG CTACTTTAACCCTTTG

Após as etapas de multiplicação e divisão da célula hospedeira contendo o gene de interesse, foi feito o plaqueamento da cultura de células e, após confirmação por PCR das colônias positivas, foi extraído o plasmídeo recombinante e procedeu-se com a transformação em células de *Escherichia coli* competentes (*Rosetta*) para a expressão das proteínas de interesse.

#### **4.2. Expressão Heteróloga de $\beta$ -glicosidases de *Trichoderma harzianum* em *Escherichia coli***

Células de *E. coli* transformadas foram inoculadas em 5 mL de meio de cultura LB (pré-inóculo) esterilizado contendo kanamicina (0,05 mg/mL) e clorafenicol (0,08 mg/mL) e incubadas por 16 h sob agitação de 150 rpm a 37 °C. Passado esse período, cada uma das culturas (pré-inóculo) foi inoculada em 1 L de meio de cultura auto-indutor estéril (STUDIER, 2005) contendo kanamicina (0,05 mg/mL) e clorafenicol (0,08 mg/mL), mantendo-se agitação de 130 rpm a uma temperatura de 37 °C até atingir o valor de 0,6 de absorvância num comprimento de onda de 600 nm (densidade óptica). Atingido esse valor, a temperatura do inóculo foi abaixada para 17 °C, ainda sob agitação de 130 rpm, por mais 16 h, para expressão das proteínas de interesse. A tabela 2 traz os componentes do meio auto-indutor (meio ZY adaptado de STUDIER, 2005).

**Tabela 2** - Componentes do meio auto-indutor (meio ZY adaptado de STUDIER, 2005).

<b>ZY</b>	<b>20 X NPS (400 mL)</b>	<b>50 X 5052 (200 mL)</b>
10 g de triptona	360 mL de água	50 g de glicerol
5 g de extrato de levedura	26,4 g de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	146 mL de água
925 mL de água	54,4 g de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 g de glicose
ajustar o pH entre 6,0 e 6,5	56,8 g de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20 g de α-lactose
	ajustar o pH para 6,75	

Após os componentes do meio auto-indutor serem autoclavados (1 atm/ 120 °C/ 20 min), eles foram adicionados na seguinte proporção (mantendo-se a ordem especificada):

- 1) 928 mL de ZY;
- 2) 1 mL de MgSO<sub>4</sub> (1 M);
- 3) 20 mL de 50 X 5052;
- 4) 50 mL de 20 X NPS (Nitrogênio, Fósforo e Potássio).

### 4.3. Extração e Purificação das β-glicosidases

Passado o período de expressão, o volume total de cada uma das culturas foi centrifugado por 30 min a 6.000 rpm, descartando-se o sobrenadante (meio de cultura) e recuperando-se o *pellet* (células de *E. coli* contendo as β-glicosidases expressas em seu citoplasma). O *pellet* foi então ressuscitado em 40 mL de tampão de Lise (50 mM Tris pH 8,0; 300 mM NaCl; 10% (v/v) glicerol; 0,1 mM PMSF) com 0,25 mg/mL de lisozima e deixado em repouso por 60 min no gelo.

A suspensão foi submetida a 8 ciclos de 30 segundos em modo *ON* e 30 segundos no modo *OFF*, alternados, em sonicador *550 Sonic Dismembrator – Fisher Scientific* para completa lise celular. Após a lise celular, as amostras foram centrifugadas por 30 min a 10.000 rpm a 4 °C, a fim de separar a fração solúvel da insolúvel.

### 4.3.1. Cromatografia de Afinidade 1

Nas duas construções, o gene que codifica a enzima é precedido por uma sequência codificadora que permite a expressão da proteína fusionada a uma cauda de histidina (6x His) na região N-terminal e uma fusão com tioredoxina (TRX). A presença dessa cauda confere à proteína alta afinidade de ligação em resinas cromatográficas com íons de metal quelados, no caso o utilizado foi o  $\text{Ni}^{2+}$  (*GE-Healthcare*). O composto químico imidazol (composto heterocíclico contendo dois nitrogênios com  $\text{pK}_a = 7.0$  e  $\text{pK}_a = 14.9$ ) foi utilizado para realizar a eluição da proteína que se liga à resina contendo os íons  $\text{Ni}^{2+}$ , já que o anel imidazólico tem maior afinidade química para a ligação a esses íons em pH 8,0 e pode competir com os resíduos de histidina pela ligação. O procedimento de purificação adotado foi o mesmo para as duas  $\beta$ -glicosidases em estudo. Esse processo teve início com o empacotamento de 4 mL de resina de níquel e a exaustiva lavagem com água deionizada, seguida do equilíbrio da resina com 10 volumes (no caso 40 mL) de tampão (50 mM Tris pH 8,0; 500 mM NaCl; 5 mM imidazol). A fração solúvel proveniente da lise celular de 1 L de cultura bacteriana descrito na seção anterior (seção 4.3) foi incubada com a resina equilibrada, durante uma hora a 4 °C. Posteriormente, voltou-se a fração solúvel e a resina para uma coluna de empacotamento, deixou-se passar o lisado pela resina e, então, lavou-se a resina com o mesmo tampão do equilíbrio. Foi passado quatro volumes de resina de tampão (o mesmo do equilíbrio) com concentrações diferentes de imidazol (10 mM e 25 mM), para lavagem e eliminação das proteínas com baixa interação pela resina. A eluição das  $\beta$ -glicosidases de interesse foi realizada utilizando-se quatro volumes de resina de tampão (o mesmo do equilíbrio) com 130 mM de imidazol. O restante das proteínas foi eluído com 500 mM de imidazol. As frações que foram eluídas da coluna empacotada com a resina, em cada etapa dessa purificação (incluindo o lisado), foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), utilizando 15 % de poliacrilamida.

#### 4.3.2. Clivagem da Tioredoxina e Cromatografia de Afinidade 2

As proteínas purificadas foram diluídas quatro vezes em tampão (50 mM Tris pH 8,0) para retirada de todo imidazol. Posteriormente, foram concentradas em concentradores (*GE-Healthcare*) de corte de 30 kDa e adicionou-se 1 mM de DTT à mistura reacional. Foi realizado, logo em seguida, o tratamento com protease TEV (nome comum dado para o domínio catalítico de 27 kDa de uma proteína de Inclusão Nuclear codificada pelo vírus do tabaco) para a remoção da cauda de histidina, juntamente com a tioredoxina (aplicando a relação de 1 mg de protease TEV para cada 50 mg da proteína alvo (YOUNGCHANG et al., 2003)), uma vez que as construções possuem sítio pra TEV. Incubou-se as proteínas com a protease TEV a 4 °C e a clivagem foi analisada por SDS-PAGE. Após a clivagem, a mistura reacional contendo a proteína alvo (clivada e sem clivar), a protease TEV, a cauda de histidina e a tioredoxina foi submetida a uma nova cromatografia de afinidade, em coluna com resina de níquel (4 mL de resina para cada proteína). A resina foi equilibrada com 10 volumes de tampão (50 mM Tris pH 8,0; 300 mM NaCl). Coletou-se manualmente o *flow through* (contendo a proteína clivada) e o restante das proteínas foi eluído com 2 volumes de resina de tampão (50 mM Tris pH 8,0; 300 mM imidazol). As frações que saíram da coluna empacotada com a resina foram analisadas por SDS-PAGE.

#### 4.3.3. Cromatografia por Exclusão de Massa Molecular

Nesse tipo de cromatografia as moléculas são separadas de acordo com seus tamanhos. Para a purificação das  $\beta$ -glicosidases foi utilizada uma coluna *Superdex 75 HR 16/60 (GE)* acoplada ao sistema de cromatografia *AKTA Explorer 10 (GE-Healthcare)*.

As  $\beta$ -glicosidases clivadas, obtidas da etapa anterior de purificação (seção 4.3.2), foram então concentradas para um valor estabelecido pelo fabricante e submetidas a uma cromatografia em coluna de gel filtração, com a coluna previamente equilibrada com tampão (50 mM Tris pH 8,0 e 150 mM de NaCl). Foi realizada uma eluição isocrática com uma unidade de volume de coluna total, com fluxo de 1 mL/min de tampão, com monitoramento a 280 nm por espectrofotometria.

As frações recuperadas da coluna foram analisadas por SDS-PAGE corado com *Coomassie Brilliant Blue* (R-250), para validação do processo de purificação.

#### 4.4. Determinação do pH e Temperatura Ótimos

A atividade de uma enzima é dependente do pH e da temperatura, uma vez que estes parâmetros podem provocar mudanças na sua distribuição de cargas, conseqüentemente, em seu enovelamento, atividade catalítica e conformação. Foram determinados o pH e temperatura ótimos na atividade das  $\beta$ -glicosidasas contra o substrato sintético pNPG (*4-Nitrophenyl- $\beta$ -D-glucoopyranoside*), um substrato sintético cromogênico. Para os testes utilizou-se as enzimas na concentração de 0,1 mg/mL. Primeiramente, a temperatura foi mantida a 30 °C por 10 minutos, variando-se apenas o pH a fim de se obter o valor de pH ótimo de atividade da enzima (30 °C/ 10 min para cada pH analisado). A mistura reacional, para determinação do pH ótimo, consistiu de 50  $\mu$ L de substrato (10 mM de pNPG), 40  $\mu$ L de tampão nos diferentes pHs (tampão citrato-fosfato (McILVAINE, 1921)) e 10  $\mu$ L de enzima (0,1 mg/mL). Incubou-se as reações por 10 minutos a 30 °C, parando a reação com a adição de 1 M de carbonato de sódio. A leitura da absorbância ocorreu em um espectrofotômetro a 405 nm. Para determinação da temperatura ótima, utilizou-se 40  $\mu$ L de tampão no pH ótimo encontrado no teste anterior, 50  $\mu$ L de substrato (10 mM pNPG) e 10  $\mu$ L da enzima (0,1 mg/mL). Variou-se a temperatura de 5 em 5 °C, iniciando-se o teste na temperatura de 20 °C e terminando em 70 °C, deixando a reação acontecendo 10 minutos em cada temperatura, interrompendo-a com 1 M de carbonato de sódio a cada temperatura analisada e medindo a absorbância em espectrofotômetro a 405 nm.

#### 4.5. Atividade específica em diferentes substratos

A atividade específica das enzimas em estudo foi avaliada contra os seguintes substratos sintéticos: *p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucoopyranoside*, *4-nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside*, *4-nitrophenyl- $\beta$ -D-mannopyranoside*, *4-nitrophenyl- $\beta$ -D-cellobioside*, *4-nitrophenyl- $\beta$ -D-fucoopyranoside*, *4-nitrophenyl- $\alpha$ -D-galactopyranoside*,

*2-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside*, *n-octyl-β-D-glucopyranoside*. Os ensaios enzimáticos foram realizados a 35 °C (para *ThBgl1*) e a 40 °C (para *ThBgl2*) durante 15 minutos, contendo 100 µL de mistura reacional: 40 µL de tampão 100 mM fosfato de sódio pH 5,5, 10 µL de enzima (10 ng/µL) e 50 µL da solução de substrato (10 mM) no mesmo tampão.

A reação foi paralisada utilizando-se 0,5 M de carbonato de sódio e a quantidade de p-nitrofenolato liberada foi quantificada a 415 nm. A atividade específica foi expressa em relação à atividade em pNPG.

#### **4.6. Atividade de β-glicosidase**

A atividade de β-glicosidase, para cada uma das enzimas, foi determinada medindo-se a quantidade de glicose liberada a partir de celobiose utilizada como substrato. Os ensaios de atividade foram realizados em triplicata, utilizando-se 50 µL de solução de celobiose (2% p/v em 100 mM de fosfato de sódio pH 5,5), 40 µL de tampão (100 mM de fosfato de sódio pH 5,5) e 10 µL da enzima β-glicosidase. As reações ocorreram a 35°C (*ThBgl1*) e 40°C (*ThBgl2*) durante 15 min, seguida de aquecimento a 95 °C durante 10 min para desnaturação da enzima. A quantidade de glicose liberada foi estimada empregando o método da glicose oxidase-peroxidase, GOD (KUNST, DRAEGER, ZIEGENHORN, 1984), utilizando kit Laborlab. O produto da reação, antipirilquinonimina vermelha, proporcional à glicose liberada, foi dosado em 505 nm. Controles sem adição da enzima foram incluídos com a finalidade de avaliar a hidrólise espontânea do substrato nas condições dos ensaios. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol 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 reacional (U/mg).

#### **4.7. Cinética Enzimática**

O estudo da catálise enzimática é baseado em medidas da velocidade de reação catalisada pela enzima. A variação da velocidade em função da

concentração de substrato, muitas vezes, pode ser descrita pela equação de Michaelis-Menten (Equação 1). Esta equação descreve a reação catalisada através de duas etapas principais, sendo que na primeira a enzima liga-se reversivelmente ao substrato, formando um complexo enzima-substrato, e, na segunda etapa, o produto é liberado e a enzima fica livre para se ligar a outra molécula de substrato (MARZZOCO et al., 1999).

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad \text{(Equação 1)}$$

Quando não há mais enzimas em solução em sua forma livre, diz-se que a velocidade reacional é máxima, a partir da qual qualquer aumento na concentração de substrato não provocará efeitos perceptíveis sobre a velocidade da reação. Além disso, a velocidade de reação é proporcional à concentração de enzimas presentes no meio (MARZZOCO et al., 1999).

Os ensaios de cinética enzimática foram realizados em colaboração com o Professor Doutor Sandro Roberto Marana, do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP de São Paulo e com sua aluna de doutorado Valquiria Pianheri Souza.

#### 4.7.1. Ensaios para Determinação do pH Ótimo

Primeiramente, ensaios de atividade enzimática das  $\beta$ -glicosidases foram realizados utilizando-se 50  $\mu$ L de amostra contendo a enzima (em uma diluição adequada) e 50  $\mu$ L do substrato pNPG (25 mM), preparado em tampão. Inicialmente, os ensaios de atividade foram realizados em diferentes pHs para garantir que os ensaios cinéticos fossem realizados no pH ótimo. Com isso, foram executados experimentos de atividade enzimática em tampão citrato-fosfato 50 mM pH 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 e 7,0; em tampão fosfato 50 mM pH 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0 e em tampão bicina 50 mM pH 7,5; 8,0; 8,5; 9,0 e 9,5.

#### 4.7.2. Ensaios de Atividade e de Cinética de $\beta$ -glicosidase

Após determinação do pH ótimo da enzima, optou-se por realizar todos os demais ensaios em tampão citrato-fosfato 50 mM pH 5,5. Os ensaios de cinética foram feitos de forma similar ao ensaio anterior (item 4.7.1), em placas de ELISA, misturando-se 50  $\mu$ L de enzima (em diluição adequada) e 50  $\mu$ L de substrato, sendo que foram utilizados pNPG, p-nitrofenil- $\beta$ -fucopiranosídeo, p-nitrofenil- $\beta$ -galactopiranosídeo e celobiose como substrato.

No caso da utilização dos substratos sintéticos, a mistura reacional foi incubada a 30 °C por 5, 10, 15 e 20 minutos e, em seguida, interrompida com 100  $\mu$ L de solução de carbonato de sódio 0,5 M. Nessas condições, o produto formado (p-nitrofenol) é convertido para a forma desprotonada (p-nitrofenolato), pois a solução de carbonato torna o meio alcalino. Com isso, o p-nitrofenolato foi detectado por meio da absorbância a 415 nm em um leitor de placas Elx800 (Biotek®). Ao final, as absorbâncias foram convertidas em mols de produto utilizando a curva padrão apresentada na Figura 9.

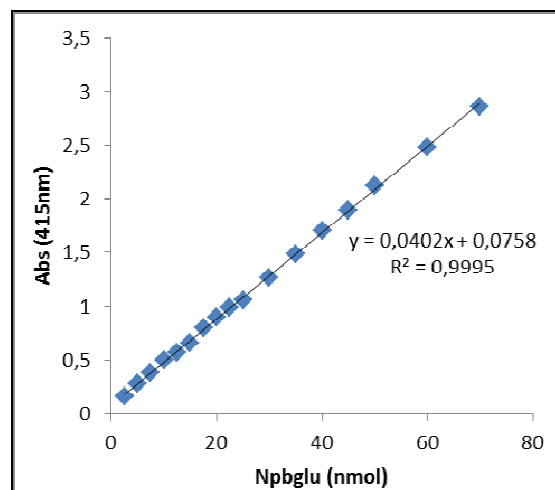
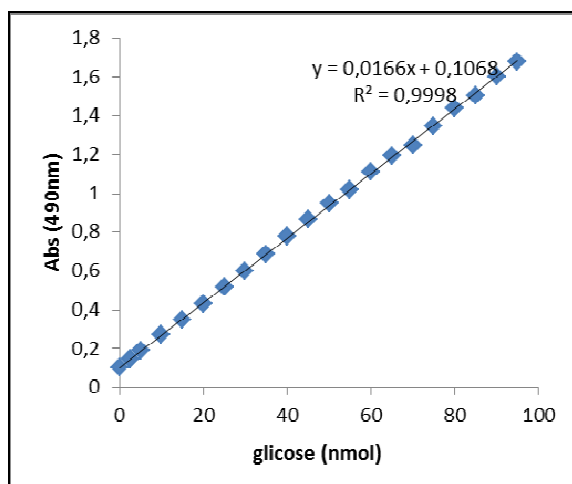


Figura 9 - curva padrão de p-nitrofenolato.

No caso do uso de celobiose como substrato, as reações foram feitas a 30 °C em diferentes intervalos de tempo, seguidas de aquecimento a 95 °C durante 2 min para desnaturação das enzimas. A quantidade de glicose liberada foi estimada empregando o método da glicose oxidase-peroxidase, GOD (KUNST, DRAEGER, ZIEGENHORN, 1984), utilizando-se o kit glicose PP (Analisa), sendo que o produto



liberado (glicose) foi lido a 490 nm. Ao final, as absorvâncias foram convertidas em mols de produto utilizando a curva padrão apresentada na Figura 10.



**Figura 10** - Curva padrão de glicose detectada através do kit glicose PP da Analisa.

Para determinação dos parâmetros cinéticos, foram feitos ensaios de atividade enzimática utilizando diversas concentrações de substrato, e a partir desses dados foram feitos gráficos da variação da velocidade em função da concentração de substrato. As curvas foram, inicialmente, ajustadas ao modelo de Michaelis-Menten (Equação 1), utilizando o programa Origin 8.5.1.

Desta forma, foram determinados o  $K_m$  e  $V_{máx}$  das enzimas *ThBgl1* e *ThBgl2* contra os substratos pNPG, p-nitrofenil- $\beta$ -fucopiranosídeo, p-nitrofenil- $\beta$ -galactopiranosídeo e celobiose. De acordo com a equação de Michaelis-Menten, o  $K_m$  é equivalente à concentração de substrato [S] na qual a velocidade inicial da reação é equivalente à metade de  $V_{máx}$ , correspondendo à afinidade de uma enzima pelo seu substrato. Assim, quanto menor for a constante enzimática ( $K_m$ ), maior será a afinidade de uma enzima pelo seu substrato.

#### 4.7.3. Ajuste dos dados

Como após obtenção da curva de cinética enzimática (Velocidade *versus* [S]), verificou-se que para alguns substratos havia uma queda na velocidade em concentrações maiores de substrato, não foi possível ajustar os dados com o modelo de Michaelis-Menten. Desta forma, os dados foram ajustados de acordo com

a equação 2, que descreve o caso no qual uma segunda molécula de substrato se liga ao complexo ES e age como inibidor.

$$V = \frac{V_{máx} \cdot [S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_i}} \quad \text{(Equação 2)}$$

Esses resultados podem ser explicados por dois mecanismos. Um deles seria a inibição de enzima pela alta concentração de substrato, enquanto que o outro seria a ocorrência de reação de transglicosilação catalisada pelas enzimas *ThBgl1* e *ThBgl2*, que é um mecanismo bastante comum em  $\beta$ -glicosidases. Para comprovar se há reação de transglicosilação, foi feito um ensaio de atividade enzimática (para as enzimas *ThBgl1* e *ThBgl2*) utilizando-se a altas concentrações de pNPG (20 e 25 mM). Foram utilizados 75  $\mu$ L de enzima em uma diluição adequada e 75  $\mu$ L de substrato. Ao final, os ensaios foram divididos em duas partes, no qual em 100  $\mu$ L foi detectada glicose e, em 50  $\mu$ L, p-nitrofenolato. A absorbância de p-nitrofenolato foi multiplicada por 2 para ser compatível à de glicose, uma vez que o volume reacional foi a metade.

Após comprovação da ocorrência de transglicosilação catalisada pelas enzimas *ThBgl1* e *ThBgl2*, foram feitos novos ensaios utilizando-se pNPG em diversas concentrações e acompanhou-se a formação dos produtos p-nitrofenolato e glicose em cada uma das concentrações. Para isso, da mesma forma que o ensaio anterior, as reações foram divididas em duas partes, sendo que em uma delas foi detectada a formação de p-nitrofenolato e, na outra, de glicose. As curvas (Velocidade *versus* [S]) obtidas nesse ensaio foram ajustadas nas Equações 3 e 4 utilizando o programa Origin 8.5.1, sendo que essas equações descrevem a velocidade de produção de glicose e de p-nitrofenolato, respectivamente.

$$V(\text{glicose}) = \frac{V_m^H \cdot [S]}{K_m^1 + [S]} \cdot \%H \quad \text{(Equação 3)}$$

$$V(p-nitro) = \frac{V_m^H \cdot [S]}{K_m^1 + [S]} \cdot \%H + \frac{V_m^T \cdot [S]^2}{K_m^1 \cdot [S] + K_m^2 \cdot [S] + [S]^2} \cdot \%T \quad \text{(Equação 4)}$$

$V_m^H$  é a velocidade máxima da rota de hidrólise;

$V_m^T$  é a velocidade máxima da rota de transglicosilação;

$K_m^1$  e  $K_m^2$  são as constantes cinéticas do primeiro e segundo substratos, respectivamente;

%H é uma função que descreve a porcentagem de enzimas que segue a rota da hidrólise em cada concentração de substrato;

%T é uma função que descreve a porcentagem de enzimas que segue a rota da transglicosilação em cada concentração de substrato.

#### 4.8. Ensaios com diversos inibidores

Foram testados diversos inibidores na atividade enzimática das enzimas *ThBgl1* e *ThBgl2*: celobiose (32 mM e 14 mM), celotriose (14 mM), celotetraose (14 mM), metil- $\beta$ -glucosídeo (14 mM), hexil- $\beta$ -glucosídeo (14 mM), Tris (14 mM) e octil- $\beta$ -glucosídeo (14 mM).

Para isso, realizou-se um ensaio de ao menos quatro tempos para determinação da velocidade inicial enzimática. A reação consistiu de 50  $\mu$ L de substrato (pNPG), 40  $\mu$ L de inibidor e 10  $\mu$ L de enzima. As reações foram interrompidas com 100  $\mu$ L de 0,5 M de carbonato de sódio.

#### 4.9. Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS)

Com a finalidade de estudar e conhecer a forma molecular e a estabilidade química adquiridas pela proteína *ThBgl1* em solução, foram realizados estudos de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS). Na técnica de SAXS é incidido um feixe monocromático de raios-X à amostra, o qual interage com os átomos que a compõem. Os elétrons pertencentes a esses átomos se comportam como se fossem livres, já que a energia dos fótons incidentes é bem maior que a de ligação deles nos átomos (SVERGUN, 2010).

As medidas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo foram realizadas para três concentrações diferentes para a proteína em estudo (*ThBgl1*), 1, 3 e 6 mg/mL, levando-se em consideração boa estatística de espalhamento, estabilidade da amostra para os ângulos mais baixos de espalhamento e análise de efeitos causados pela radiação sobre a amostra. Os dados de SAXS foram coletados na

linha SAXS2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, São Paulo), utilizando um comprimento de onda  $\lambda = 1,55 \text{ \AA}$ , em detector bidimensional (MarCCD) disposto a 1276,41 mm da amostra. Os dados foram coletados e processados em colaboração com outros alunos do Laboratório de Cristalografia do IFSC.

A coleta foi realizada em dois *frames* de 150 segundos, para evitar danos à amostra pela radiação. A análise sistemática e o processamento inicial dos dados foram realizados com a ajuda do programa *FIT2D* (HAMMERSLEY, 1997), fazendo a normalização das intensidades espalhadas levando-se em conta a intensidade do feixe e a absorção da amostra. Foi feita também a subtração do espalhamento do tampão e da amostra analisada, para se contabilizar apenas o efeito espalhador das moléculas da proteína. O  $R_g$  (raio de giro) foi conseguido por dois métodos diferentes: o primeiro utilizando a equação de Guinier (Equação 5) (GLATTER; KRATKY, 1982):

$$I(q) = I(0) \exp\left(\frac{-R_g^2}{3} q^2\right) \quad \text{(Equação 5)}$$

onde  $q$  é o módulo do vetor espalhamento ( $q = 4\pi \sin(\theta/\lambda)$ ),  $R_g$  é o raio de giro e  $I(0)$  é a intensidade no ângulo zero. O segundo pelo método da Transformada Inversa de Fourier implementado no programa *Gnom* (SVERGUN, 1992), onde também obtivemos a função de distribuição de distâncias  $p(r)$  e o  $D_{m\acute{a}x}$  do envelope protéico. Através da curva de espalhamento contida no arquivo de saída do programa *Gnom* (SVERGUN, 1992) e o valor de  $I(0)$  (extrapolado através de um algoritmo interno do programa) normalizado para a concentração de proteína na amostra, estimou-se sua massa molecular no programa *SAXS MoW* (FISCHER, 2010). A partir da estimativa da massa molecular da proteína (*ThBgl1*) em solução, pôde-se inferir de antemão seu estado oligomérico.

A obtenção de um modelo de baixa resolução a partir dos dados de SAXS foi possível utilizando procedimento *ab initio*, implementado no programa *Dammin* (SVERGUN, 1999). Para tornar o modelo mais condizente possível com os dados experimentais, buscou-se a minimização da discrepância, " $\chi$ ", que leva em

consideração a intensidade da luz espalhada. Para melhor estatística dos resultados e qualidade do modelo final gerado, foram gerados 10 modelos independentes, cuja média realizada através do programa *DAMAVAR* (VOLKOV; SVERGUN, 2003) foi sobreposta à estrutura de alta resolução da homóloga de maior identidade (pdb id. 3AHY –  $\beta$ -glicosidase 2 de *Trichoderma reesei*), no programa *SUPCOMB* (SVERGUN, 1999). O programa *Crysol* (SVERGUN; BARBERATO; KOCK, 1995) foi utilizado para geração de uma curva teórica de espalhamento de raios-X a baixo ângulo para a estrutura 3AHY, o que permitiu em um mesmo gráfico traçar as curvas de SAXS da amostra original (experimental), do modelo de átomos *dummy* obtido no programa *Dammin* (DAM) e da estrutura de alta resolução 3AHY. Com isso, pôde-se analisar a capacidade do modelo de baixa resolução em explicar/demonstrar o estado da proteína em estudo livre em solução.

Para a enzima *ThBgl2* os experimentos de SAXS não resultaram em bons resultados. Entretanto, não os repetimos pelo fato de que obtivemos a sua estrutura tridimensional por cristalografia de raio-X.

#### 4.10. Ensaio de Cristalização

Os processos da vida são regidos pelas funções precisas desempenhadas pelas proteínas, as quais adotam estruturas tridimensionais únicas. Uma quantidade significativa de pesquisa experimental e teórica tem sido realizada nas últimas décadas para elucidar os princípios envolvidos na estrutura, estabilidade e enovelamento proteico. A correlação entre estrutura-função em várias proteínas, bem como a disposição das cadeias laterais de aminoácidos específicos nos sítios ativos, vem sendo elucidada em termos globais (WHISSTOCK; LESK, 2003).

A principal técnica para resolução da estrutura tridimensional de macromoléculas biológicas, tal como proteína, tem sido a cristalografia por difração de raios-X. Para que uma proteína seja levada a formar cristais, é necessário que as moléculas da proteína em solução sejam trazidas a uma situação em que fiquem próximas umas das outras. Quando se atinge a supersaturação (estado termodinamicamente instável), as moléculas da proteína estarão próximas umas das outras, podendo resultar em uma fase cristalina ou amorfa.

O cristal apresenta ordem em sua estrutura interna e esse arranjo é periódico. Em condições de supersaturação, na qual a proteína se encontra entre uma fase sólida e uma solúvel, ligações químicas novas e estáveis são energeticamente favoráveis. Pode-se, então, dizer que a proteína cristaliza porque sua energia livre diminui com o aumento das interações favoráveis (McPHERSON, 2003).

A Figura 11 mostra um diagrama bidimensional que nos permite avaliar a importância de um dado parâmetro na solubilidade de uma macromolécula biológica. Tal diagrama compreende as seguintes zonas:

a) A curva de solubilidade (S) separa as zonas supersaturadas da zona hiposaturada;

b) Abaixo da curva de solubilidade (S) a solução está hiposaturada e a macromolécula biológica não irá cristalizar;

c) Acima da curva de solubilidade (S), a concentração da macromolécula biológica é maior que a concentração no equilíbrio, para uma dada concentração de agente precipitante, correspondendo, então, a uma zona de supersaturação.



Figura 11 - Representação esquemática do Diagrama de Fases para cristalização de proteínas (modificada de McPherson, 2003).

A supersaturação pode ser obtida pela evaporação lenta do solvente ou pela variação de alguns parâmetros, como pH, força iônica, tipo de íon, temperatura e concentração do solvente orgânico, que podem ser usados para diminuir a solubilidade da proteína, tornando a solução saturada ou supersaturada (BLUNDELL; JOHNSON, 1976). A solução supersaturada eventualmente dá origem aos núcleos, alguns dos quais crescerão. Assim, podemos dizer que a cristalização começa com a fase de nucleação que é seguida pela fase de crescimento e posterior cessação do crescimento do cristal (KOBE et al., 1999).

A nucleação é o processo inicial na obtenção de cristais, os quais representam a fase sólida de uma proteína. Quando o núcleo atinge um tamanho crítico, tem início a fase de crescimento. Um cristal pequeno pode crescer pela incorporação de átomos (moléculas) nas suas faces planas em duas dimensões ou em espiral, ou sobre defeitos na superfície do cristal, incorporando moléculas via interações tridimensionais. A morfologia do cristal corresponde diretamente à taxa de crescimento de cada face, ou seja, faces crescidas lentamente serão maiores e bem desenvolvidas e faces que crescem mais rapidamente tendem a ser menores. A taxa de crescimento é, geralmente, diretamente proporcional à supersaturação da solução e à solubilidade da molécula num dado solvente, além de ser influenciada pela presença de impurezas. O crescimento de um cristal cessa provavelmente quando há acúmulo de defeitos dentro da rede cristalina, o que impede a continuação do crescimento de suas faces (McPHERSON, 2003).

O método mais usual de Cristalização é o de difusão de vapor, que pode ser dividido na técnica da gota suspensa (do inglês: *hanging drop*) ou da gota sentada (do inglês: *sitting drop*) (MARTINI, 2007). Neste método, em um recipiente fechado, são colocadas duas soluções que podem realizar trocas apenas pela fase gasosa. Uma das soluções é formada por um agente precipitante com alta concentração e a outra, pelo mesmo agente e pela proteína (e o ligante, quando houver). Como o volume do agente precipitante depositado no poço é muito maior que o volume do mesmo na gota, após algum tempo, a concentração final da solução de dentro da gota (que contém a proteína) será igual à concentração da solução do poço (RUPP, 2000).

A resolução estrutural das proteínas em estudo é de extrema importância para entendermos alguns de seus mecanismos moleculares de funcionamento. Um

de nossos alvos (*ThBgl1*) tem 90% de identidade sequencial com proteínas homólogas que já possuem estruturas de alta resolução depositadas no PDB (<http://www.rcsb.org/pdb>), enquanto o outro alvo (*ThBgl2*) possui apenas 53% de identidade sequencial. Obtendo a estrutura de alta resolução para essas proteínas, poderíamos desenvolver novos conceitos a respeito do mecanismo de ação dessas enzimas e entender suas ações no organismo do fungo.

Vários ensaios de cristalização foram conduzidos na busca de condições que resultassem em cristais bem formados e com alto poder de difração. Inicialmente, as condições de cristalização foram testadas utilizando um robô micropipetador de precisão para o auxílio durante os experimentos de cristalização, o Honeybee (*Genomic Solutions*), utilizando-se conjuntos comerciais de soluções cristalizantes. O método de cristalização empregado foi o de difusão de vapor com gota assentada (do inglês: *sitting drop*), com três proporções diferentes entre solução cristalizante e proteína (1:2; 1:1 e 2:1). Todos os testes foram inicialmente realizados a 18 °C e as concentrações proteicas foram de 25 mg/mL e de 30 mg/mL para as proteínas *ThBgl1* e *ThBgl2*, respectivamente.

As condições mais promissoras que apresentaram cristais foram otimizadas para o alvo *ThBgl1*, com as placas montadas manualmente, variando-se a concentração do agente precipitante (PEG) e o pH do tampão (0,1 M HEPES). Para o alvo *ThBgl2* não foi necessária a otimização.

#### **4.10.1. Coleta e Processamento de Dados de Difração de Raios-X**

A coleta de dados de difração de raios-X é muito importante, pois constitui a única fonte de dados experimentais através da qual podemos obter a estrutura cristalográfica (BLUNDELL; JOHNSON, 1976).

Os dados são obtidos quando um feixe de raios-X, após incidir sobre um material cristalino, sofre difração. Estes dados podem ser obtidos através da utilização de uma fonte de raios-X convencional, como um ânodo rotatório, ou oriundo de fontes de luz síncrotron. Nestes equipamentos, o cristal de proteína pode ser colocado em um *loop* cujo diâmetro seja adequado para abrigar o cristal e é montado de modo que fique alinhado ao feixe de raios-X de tal maneira que, durante os movimentos rotacionais que o cristal sofrerá, o mesmo fique exposto à radiação



de maneira homogênea (McREE, 1993). No *loop* também é necessária a presença da solução-mãe (solução que proporcionou a nucleação e crescimento do cristal) e normalmente é necessária a adição de um agente crioprotetor (como, por exemplo, o etileno glicol) para impedir que haja a formação de cristais de gelo ao redor ou na solução em que se encontra o cristal em estudo, ou para que este não sofra danos irreversíveis com consequente perda da amostra. O cristal é, então, exposto ao feixe de raios-X e também a um fluxo de nitrogênio gasoso, a temperatura controlada (normalmente 100 K), o que permite um aumento no tempo de coleta (dos SANTOS, 2007).

Anteriormente às coletas de dados de difração de raios-X, os cristais das enzimas em estudo foram crioprotetidos com 15% de etileno glicol, quando necessário, e a coleta foi feita com o cristal resfriado instantaneamente num fluxo de nitrogênio gasoso a aproximadamente 100 K. As coletas de dados de difração de raios-X foram realizadas em nosso laboratório de Biotecnologia Molecular, utilizando o equipamento Bruker-APEX DUO e na linha de cristalografia MX2 de Laboratório de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, São Paulo). Os conjuntos de dados foram obtidos através do método de rotação, com o objetivo de coletar o máximo de reflexões possíveis.

Cada conjunto de imagens geradas da difração de raios-X pelo cristal dá origem a um conjunto de dados de difração a ser analisado. De posse da primeira imagem pode-se determinar, a partir deste conjunto de dados, o grupo espacial, parâmetros de rede do cristal, número de monômeros da proteína na unidade assimétrica, além de prever a porcentagem de solvente no cristal (RUPP, 2000).

A indexação das primeiras imagens e a estratégia de coleta foram realizadas pelo programa iMOSFLM (LESLIE, 1999), bem como a integração do conjunto de imagens de difração e o refinamento dos parâmetros cristalinos. No processo de integração cada imagem em um mesmo conjunto de dados tem sua intensidade gravada em diferentes escalas devido à variação na radiação incidente, absorção dos raios difratados ou destruição do cristal (BLUNDELL; JOHNSON, 1976). Logo, há a necessidade de escalonar todos os pontos. Para isso, foi utilizado o programa SCALA, que faz parte do pacote de programas CCP4 (COLLABORATIVE..., 1994). O número de moléculas presentes na unidade assimétrica e o conteúdo de solvente

foram estimados utilizando o programa Matthews\_coeff (COLLABORATIVE..., 1994), que faz uso da metodologia proposta por Matthews (MATTHEWS, 1968).

#### 4.10.2. Determinação da Estrutura

Após a coleta de dados de difração de raios-X, estes têm que ser processados para que possam ser utilizados para dar início à determinação do modelo estrutural. Após obtenção das fases é gerado um mapa de densidade eletrônica e inicia-se o refinamento da estrutura. Durante as etapas de refinamento, são feitos ajustes manuais do modelo à densidade eletrônica. A determinação de uma estrutura proteica pode ser feita através do método de Substituição Molecular, que se baseia no fato de proteínas com sequências semelhantes de aminoácidos possuírem enovelamentos similares (McREE, 1993; DRENTH, 1994).

O programa *phenix.xtriage* foi utilizado na identificação de patologias do cristal (ADAMS, 2010), ajudando a identificar *outliers*, presença de *twin*, e outros percalços a que um conjunto de dados possa estar sujeito.

Para resolver o problema das fases foi aplicada a técnica de substituição molecular utilizando o programa PHASER (McCOY, 2007). O modelo empregado para a substituição molecular foi a estrutura da  $\beta$ -glicosidase 2 de *Trichoderma reesei* (PDB 3AHY), que apresenta 90% de identidade com uma das proteínas em estudo (*ThBgl1*) e 53% de identidade com a outra proteína (*ThBgl2*) de acordo com o servidor BLAST (ALTSCHUL et al., 1990). O modelo gerado é, então, refinado até a máxima concordância entre os dados experimentais e a estereoquímica da molécula (BRUNGER, 1992; BRUNGER et al., 1998). Durante o processo de refinamento, houve uma remodelagem manual das posições dos resíduos com a utilização do programa COOT (EMSLEY et al., 2010).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Clonagem e Transformação

A amplificação dos genes a partir do DNA genômico de *Trichoderma harzianum* e dos respectivos oligonucleotídeos (na tabela 1, seção 4.1) gerou fragmentos em torno de 1398 pb para a proteína *ThBgl1* e de 1452 pb para a proteína *ThBgl2* (dados não mostrados por se tratar de uma plataforma de clonagem). Esses fragmentos foram clonados pelo “método de clonagem LIC” e as colônias positivas, contendo os genes de interesse, foram transformadas em células de *E. coli* competentes (Rosetta) para expressão das respectivas proteínas, selecionando-se, então, a colônia que mais expressava cada uma das proteínas estudadas.

As proteínas de interesse, com a presença da tioredoxina e da cauda de histidina, apresentam massa molecular de 67,2 kDa (*ThBgl1*) e 69,2 kDa (*ThBgl2*) (Figuras 12 e 13, respectivamente).

**ProtParam****User-provided sequence:**

```

10      20      30      40      50      60
MKHHHHHHPM SDKIIHLTDD SFDTDLVKAD GAILVDFWAE WCGPCKMIAP ILDEIADEYQ

70      80      90      100     110     120
GKLTVAKLNI DQNPGTAPKY GIRGIPTLLL FKNGEVAATK VGALSKGQLK EFLDANLAGS

130     140     150     160     170     180
GSGSENLYFQ GAMPLPKDFQW GFATAAYQIE GAIDKDGRGP SIWDTFCAIP GKIADGTSGV

190     200     210     220     230     240
TACDSYNRTA EDIALLKSLG AKSYRFSISW SRIIPKGGRD DPNVQLGIDH YAQFVDDLLE

250     260     270     280     290     300
AGITPFITLF HWDLPEELHQ RYGGLNRTI FPLDFENYAR VMFKALPKVR NWITFNEPLC

310     320     330     340     350     360
SAIPGYSGST FAPGRQSTTE PWIVGHNLLV AHGRAVKVYR DEFKDLNDGQ IGIVLNGDFT

370     380     390     400     410     420
YPWDSSDPLD REAAERRLEF FTAWYADPIY LGDYPASMRK QLGDRLEPFT PEEKAFVLGS

430     440     450     460     470     480
NDFYGMNHYT SNYIRHRTSP ATADDTVGNV DVLFYNKEGQ CIGPETESSW LRPCPAGFRD

490     500     510     520     530     540
FLVWISKRYN YPKIYVTENG TSLKGENDLP KEKILEDDFR VNYNEYIRA MFTAATLDGV

550     560     570     580     590
NVKGYFAWSL MDNFEWADGY VTRFGVTYVD YENGGQRFPK KSAKSLKPLF DELIAKE

```

Number of amino acids: 597

Molecular weight: 67288.7

Theoretical pI: 5.22

Amino acid composition:

[CSV format](#)

Ala (A)	47	7.9%
Arg (R)	27	4.5%
Asn (N)	27	4.5%
Asp (D)	48	8.0%
Cys (C)	7	1.2%
Gln (Q)	15	2.5%
Glu (E)	34	5.7%
Gly (G)	51	8.5%
His (H)	14	2.3%
Ile (I)	34	5.7%
Leu (L)	50	8.4%
Lys (K)	35	5.9%
Met (M)	9	1.5%
Phe (F)	34	5.7%
Pro (P)	33	5.5%
Ser (S)	30	5.0%
Thr (T)	32	5.4%
Trp (W)	14	2.3%
Tyr (Y)	29	4.9%
Val (V)	27	4.5%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

**Figura 12** - Número de aminoácidos e massa molecular da proteína *ThBgl1* (<http://web.expasy.org/protparam/>).

**ProtParam****User-provided sequence:**

```

10      20      30      40      50      60
MKHHHHHHPM SDKIIHLTDD SFDTDVLKAD GAILVDFWAE WCGPCKMIAP ILDEIADEYQ

70      80      90      100     110     120
GKLTVAKLNI DQNPGTAPKY GIRGIPTLLL FKNGEVAATK VGALSKGQLK EFLDANLAGS

130     140     150     160     170     180
GSGSENLYFQ GAMSESLSLP KDFEWGFATA AYQIEGAVKE GGRGPSIWDI YCHLEPSRTN

190     200     210     220     230     240
GANGDVACDH YHRYDEDFDL LTKYGAKAYR FSLSWSRIIP LGGRLDPINE EGIQFYNSLI

250     260     270     280     290     300
DALLKRGVTP WVTLYHWDLF QALHDRVGGW LNVKEVQLDF ERYARLCFER FGDRVKNWIT

310     320     330     340     350     360
INEPWIQSIY GYATGSNAPG RSSINKHSTE GDTTTEPWVA GKAQIMSHAR AVAVYSKDFR

370     380     390     400     410     420
ASQKQGIGIS LNGDYYPWD SSDPRDKEAA ERRMEFHIGW YANPILKKDY PASMRRQLGD

430     440     450     460     470     480
RLPALPADF AILNAGETDF YGMNYYTSQF ARHYEGVVPK TDFLGAIHEH QENKDGSPVG

490     500     510     520     530     540
EESGIFWLRS CPDMFRKHLA RVHGLYGKPI YITENGCPKP GEDKMTCEEA INDPFRIQYF

550     560     570     580     590     600
DSHLDSISKA ISQDGVVVKG YFAWALLDNL EWSDBGYGRPF GVITYDYITL KRTPKKSALV

610
LKDMFADRQR VKVAA

```

Number of amino acids: 615

Molecular weight: 69272.9

Theoretical pI: 5.85

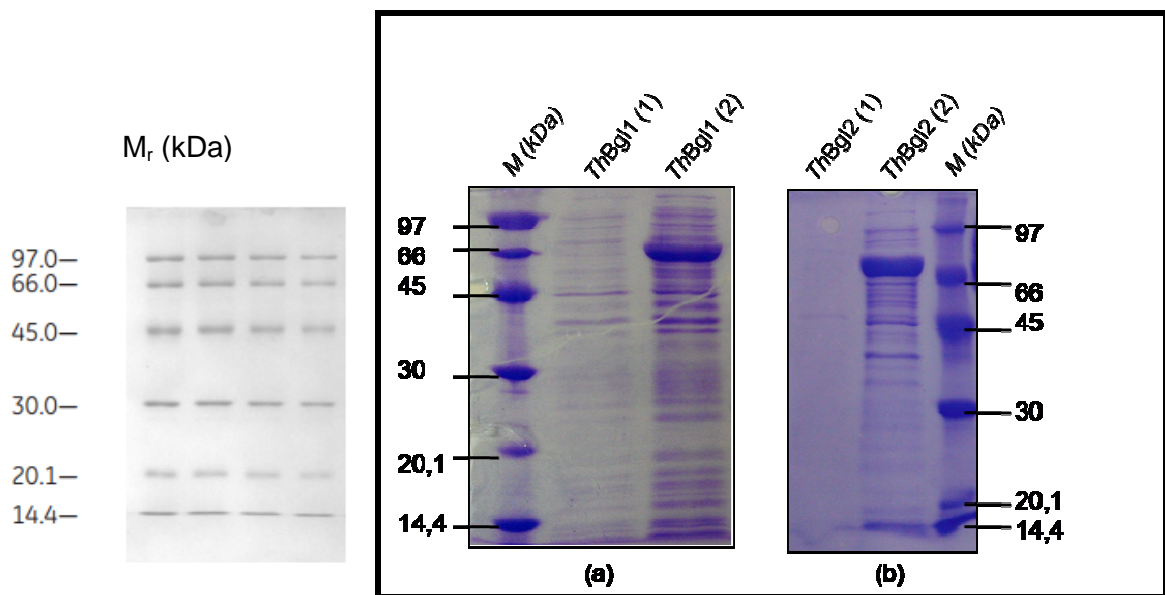
Amino acid composition:

Ala (A)	51	8.3%
Arg (R)	30	4.9%
Asn (N)	22	3.6%
Asp (D)	47	7.6%
Cys (C)	9	1.5%
Gln (Q)	18	2.9%
Glu (E)	35	5.7%
Gly (G)	54	8.8%
His (H)	21	3.4%
Ile (I)	35	5.7%
Leu (L)	48	7.8%
Lys (K)	38	6.2%
Met (M)	11	1.8%
Phe (F)	26	4.2%
Pro (P)	32	5.2%
Ser (S)	37	6.0%
Thr (T)	29	4.7%
Trp (W)	16	2.6%
Tyr (Y)	31	5.0%
Val (V)	25	4.1%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

**Figura 13** - Número de aminoácidos e massa molecular da proteína *ThBgl2*  
(<http://web.expasy.org/protparam/>).

## 5.2. Expressão Heteróloga de $\beta$ -glicosidases de *Trichoderma harzianum* por *Escherichia coli*

Foram coletadas alíquotas antes e após a expressão das proteínas *ThBgl1* e *ThBgl2* a fim de confirmar a presença das mesmas no meio de cultivo, e esses resultados podem ser visualizados a partir do *SDS-PAGE* (15% de poliácridamida) corado com *Comassie Brilliant Blue* (Figura 14).



**Figura 14** - SDS-PAGE com resultado da expressão das  $\beta$ -glicosidases (a) *ThBgl1* e (b) *ThBgl2*. M - marcador de peso molecular; (1) frações pré-indução; (2) frações pós-indução.

No gel desnaturante da Figura 14, pode-se verificar que há a expressão basal de proteínas bacterianas (colunas com marcação 1) antes da indução. Após indução, pode-se perceber que houve um significativo aumento da expressão das proteínas fúngicas de interesse nas bandas em torno de 67 kDa (*ThBgl1*) e 69 kDa (*ThBgl2*), corroborando com os valores apresentados pelo ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>), partindo-se, então, para os processos subsequentes de purificação.

### 5.3. Purificação das $\beta$ -glicosidases

Decorrido o tempo de expressão das  $\beta$ -glicosidases, as células bacterianas, contendo as proteínas de interesse, foram centrifugadas, ressuspensas em tampão de lise e lisadas, conforme metodologia descrita na seção 4.3. Após o processo de sonicação, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante recolhido, seguindo para os processos subsequentes de purificação.

#### 5.3.1. Cromatografia de afinidade 1

A primeira etapa de purificação, para ambas as proteínas em estudo, consistiu em uma cromatografia de afinidade, conforme descrita na seção 4.3.1. As Figuras 15 e 16 apresentam os géis desnaturantes contendo as alíquotas resultantes desse primeiro processo de purificação para as proteínas *ThBgl1* e *ThBgl2*, respectivamente.

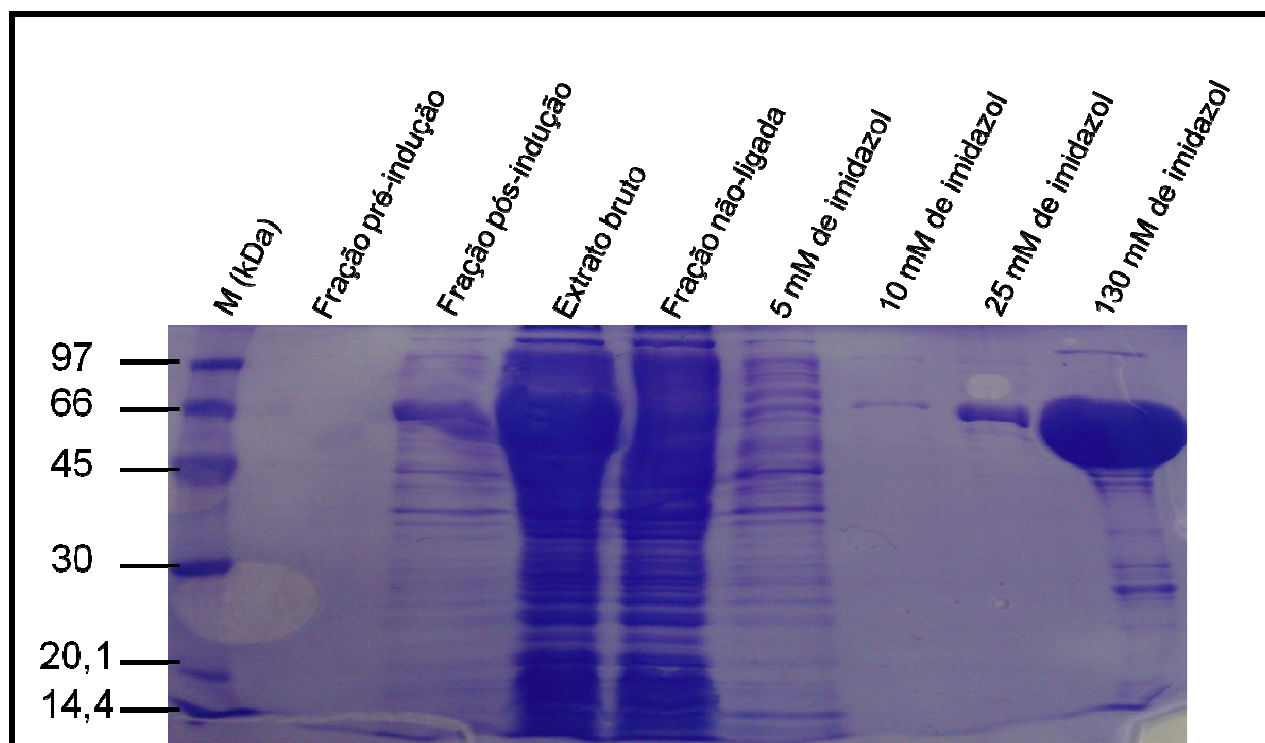
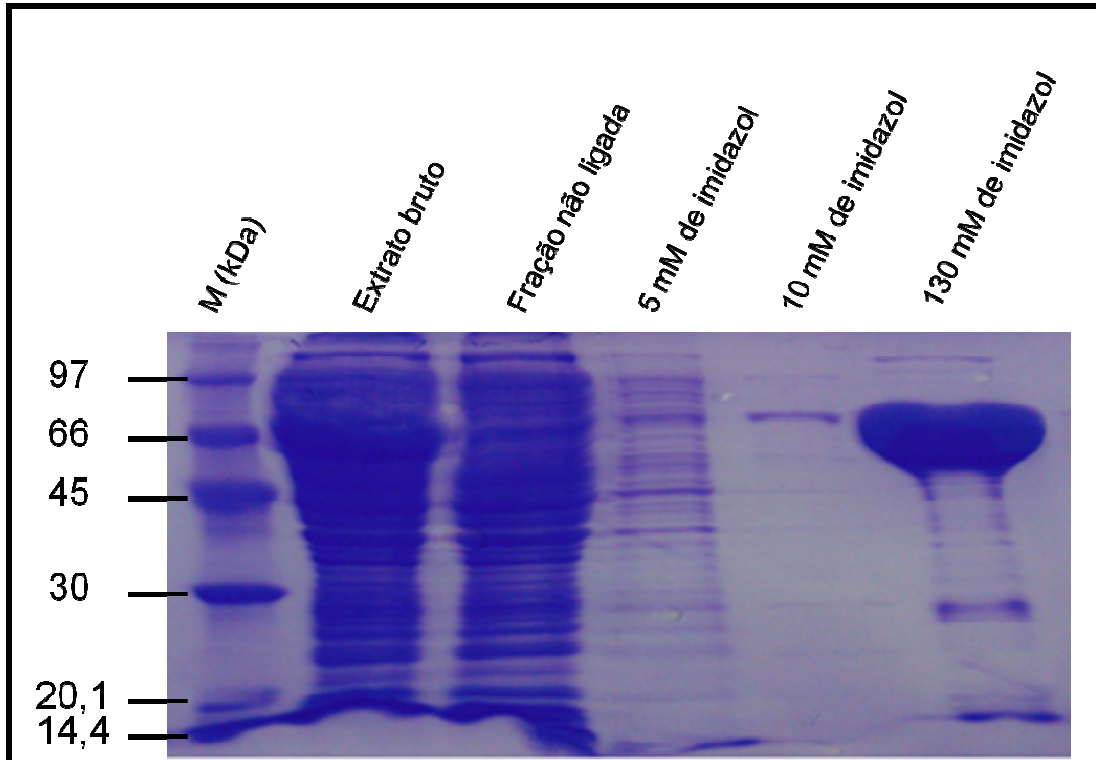


Figura 15 - SDS-PAGE - cromatografia de afinidade para a proteína *ThBgl1*, mostrando as lavagens (tampão com 5,10 e 25 mM de imidazol) e a correspondente eluição (tampão com 130 mM de imidazol). M – marcador de peso molecular.



**Figura 16** - SDS-PAGE - cromatografia de afinidade para a proteína *ThBgl2*, mostrando as lavagens (tampão com 5, 10 e 25 mM de imidazol) e a correspondente eluição (tampão com 130 mM de imidazol). M – marcador de peso molecular.

As frações eluídas (com 130 mM de imidazol), contendo cada uma das  $\beta$ -glicosidases de interesse, ainda apresentam alguns contaminantes característicos de cada expressão. Entretanto, a maior parte dos contaminantes, que antes pertencia ao extrato bruto, foi eliminada nessa técnica.

A partir dessas amostras eluídas partimos para os processos subsequentes de purificação.

### 5.3.2. Clivagem da Tioerodoxina e Cromatografia de Afinidade 2

As proteínas de interesse obtidas do primeiro processo de purificação foram tratadas com protease TEV para clivagem da cauda de histidina e da tioerodoxina. Após clivagem, a proteína *ThBgl1* apresentou massa molecular de 53 kDa e a proteína *ThBgl2* apresentou massa molecular de 55 kDa, conforme descrito pelo programa ProtParam (Figuras 17 e 18 respectivamente).



## ProtParam

### User-provided sequence:

```

10      20      30      40      50      60
MMLPKDFQWG FATAAYQIEG AIDKDGRGPS IWDTFCAIPG KIADGTSGVT ACDSYNRTAE

70      80      90      100     110     120
DIALLKSLGA KSYRFSISWS RIIPKGRDD PVNQLGIDHY AQFVDDLEA GITPFITLFH

130     140     150     160     170     180
WDLPEELHQR YGGLLNRTF PLDFENYARV MFKALPKVRN WITFNEPLCS AIPGYGSGTF

190     200     210     220     230     240
APGRQSTTEP WIVGHNLLVA HGRAVKVYRD EFKDLNDGQI GIVLNGDFTY PWDSSDPLDR

250     260     270     280     290     300
EAAERLEFF TAWYADPIYL GDYPASMRKQ LGDRLPEFTP EEKAFVLGSN DFYGMNHYTS

310     320     330     340     350     360
NYIRHRTSPA TADDTVGNVD VLFYNKEGQC IGPETESSWL RPCPAGFRDF LVWISKRYNY

370     380     390     400     410     420
PKIYVIENGT SLKGENDLPK EKILEDDFRV NYYNEYIRAM FTAATLDGVN VKGYFAWSLM

430     440     450     460
DNFEWADGYV TRFGVTYVDY ENGQQRFPKK SAKSLKPLFD ELIAKE

```

Number of amino acids: 466

Molecular weight: 53096.6

Theoretical pI: 5.06

Amino acid composition:

CSV format

Ala (A)	34	7.3%
Arg (R)	26	5.6%
Asn (N)	22	4.7%
Asp (D)	37	7.9%
Cys (C)	5	1.1%
Gln (Q)	11	2.4%
Glu (E)	28	6.0%
Gly (G)	38	8.2%
His (H)	7	1.5%
Ile (I)	25	5.4%
Leu (L)	36	7.7%
Lys (K)	24	5.2%
Met (M)	7	1.5%
Phe (F)	29	6.2%
Pro (P)	27	5.8%
Ser (S)	24	5.2%
Thr (T)	26	5.6%
Trp (W)	12	2.6%
Tyr (Y)	26	5.6%
Val (V)	22	4.7%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

**Figura 17** - Número de aminoácidos e Massa Molecular da proteína *ThBgl1* após clivagem (<http://web.expasy.org/protparam/>).

## ProtParam

### User-provided sequence:

```

      10      20      30      40      50      60
MMSESLSLPK DFEWGFATAA YQIEGAVKEG GRGPSIWDTY CHLEPSRTNG ANGDVACDHY

      70      80      90      100     110     120
HRYDEDFDLL TKYGAKAYRF SLSWSRIIPL GGRLDPINEE GIQFYSNLID ALLKRGVTPW

      130     140     150     160     170     180
VTLYHWDLPQ ALHDRYGGWL NVKEVQLDFE RYARLCFERF GDRVKNWITI NEPIQSIYG

      190     200     210     220     230     240
YATGSNAPGR SSINKHSTEG DTTTEPWVAG KAQIMSHARA VAVYSKDFRA SQKGQIGISL

      250     260     270     280     290     300
NGDYYPWDS SDPRDKAAE RRMEFHIGWY ANPILKDYD ASMRKQLGDR LPALTPADFA

      310     320     330     340     350     360
ILNAGETDFY GMNYTTSQFA RHYEGVVPKT DFLGAIHEHQ ENKDGSPVGE ESGIFWLRSC

      370     380     390     400     410     420
PDMFRKHLAR VHGLYGKPIY ITENGCPGPG EDKMTCEEAI NDPFRIQYFD SHLDSISKAI

      430     440     450     460     470     480
SQDGVVVVKG FAWALLDNLE WSDGYGPRFG VTYTDYTTLK RTPKKSALVL KDMFADRQRV

```

KVAA

Number of amino acids: 484

Molecular weight: 55080.8

Theoretical pI: 5.91

Amino acid composition:

CSV format

Ala (A)	38	7.9%
Arg (R)	29	6.0%
Asn (N)	17	3.5%
Asp (D)	36	7.4%
Cys (C)	7	1.4%
Gln (Q)	14	2.9%
Glu (E)	29	6.0%
Gly (G)	41	8.5%
His (H)	14	2.9%
Ile (I)	26	5.4%
Leu (L)	34	7.0%
Lys (K)	27	5.6%
Met (M)	9	1.9%
Phe (F)	21	4.3%
Pro (P)	26	5.4%
Ser (S)	31	6.4%
Thr (T)	23	4.8%
Trp (W)	14	2.9%
Tyr (Y)	28	5.8%
Val (V)	20	4.1%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

**Figura 18** - Número de aminoácidos e Massa Molecular da proteína *ThBg12* após clivagem (<http://web.expasy.org/protparam/>).

As frações clivadas (para cada uma das proteínas) foram submetidas a uma nova cromatografia de afinidade, coletando-se, dessa vez, as frações não aderidas à resina (sem a presença da cauda de histidina e da tioredoxina). As Figuras 17 e 18 trazem os resultados da clivagem e da segunda cromatografia de afinidade para as proteínas *ThBgl1* e *ThBgl2*, respectivamente, bem como o resultado das proteínas puras, após todas as etapas de purificação.

### 5.3.3. Cromatografia por Exclusão de Massa Molecular

As proteínas de interesse, após clivagem e passagem pela segunda cromatografia de afinidade, foram submetidas a uma cromatografia por exclusão de massa molecular, conforme descrito na seção 4.3.3. Nesta etapa foram obtidas frações com grau de pureza superior a 90%, com rendimento médio de 20 mg de *ThBgl1* e 15 mg de *ThBgl2*, por litro de cultura de expressão. As Figuras 19 e 20 trazem os géis (SDS-PAGE) com os resultados das purificações para as enzimas *ThBgl1* e *ThBgl2*, respectivamente.

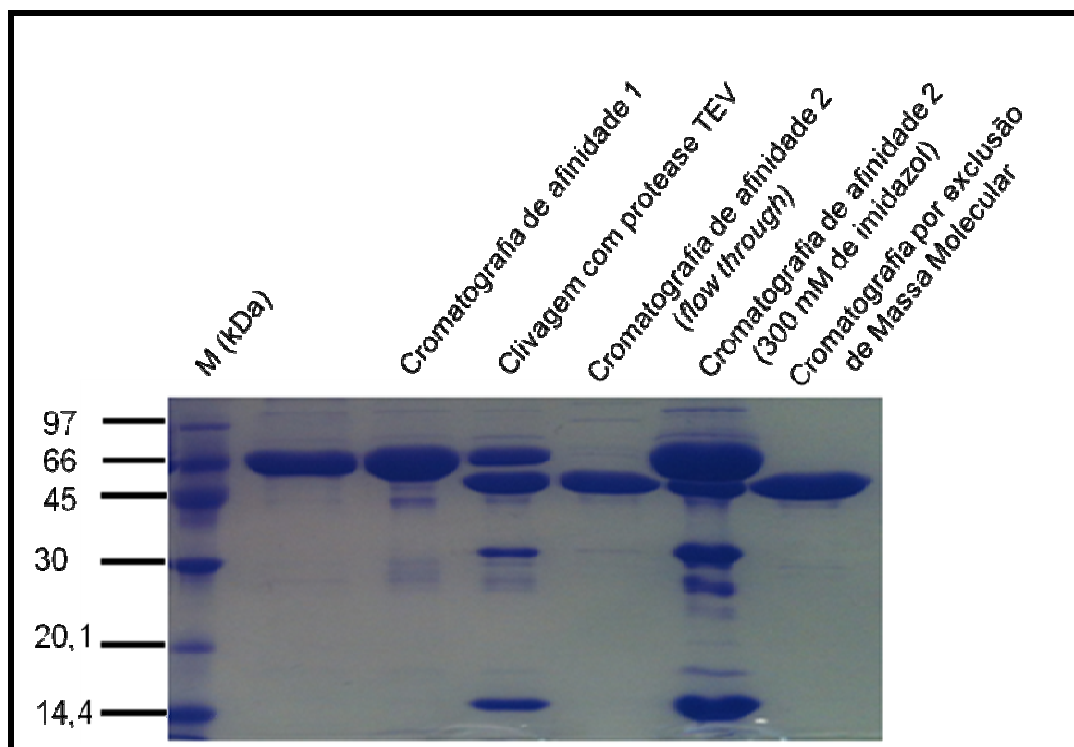


Figura 19 - SDS-PAGE. *ThBgl1* após todos os processos de purificação.

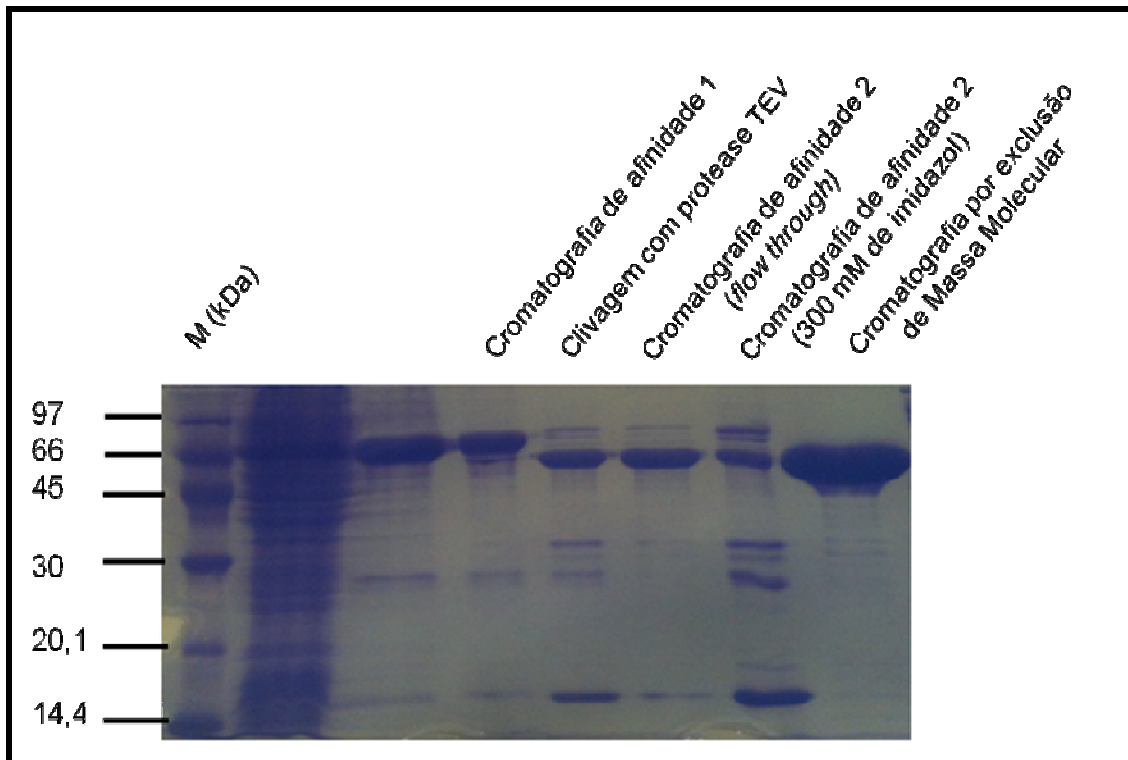


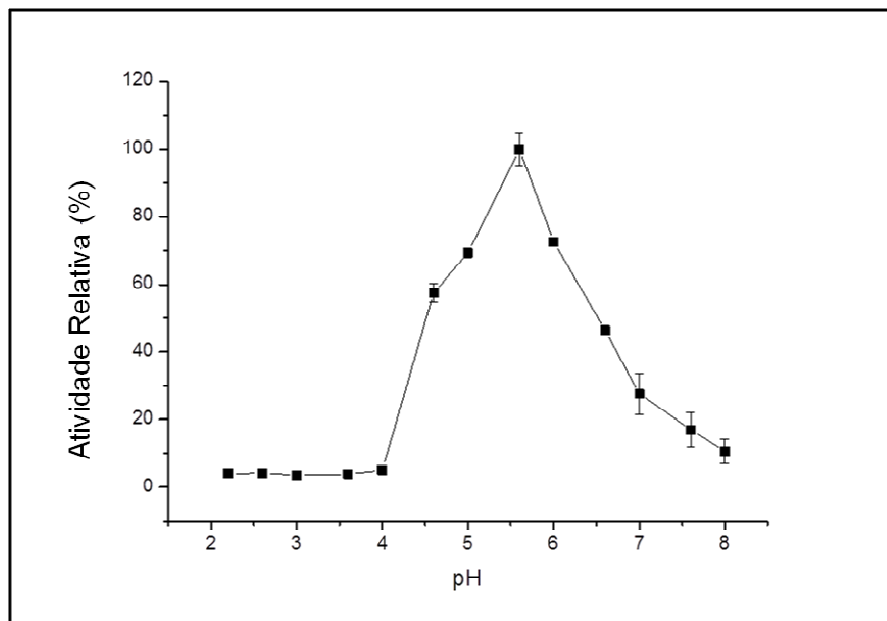
Figura 20 - SDS-PAGE. *ThBgl2* após todos os processos de purificação.

De posse das proteínas puras, partiu-se para os experimentos subsequentes, a fim de caracterizar as enzimas *ThBgl1* e *ThBgl2*.

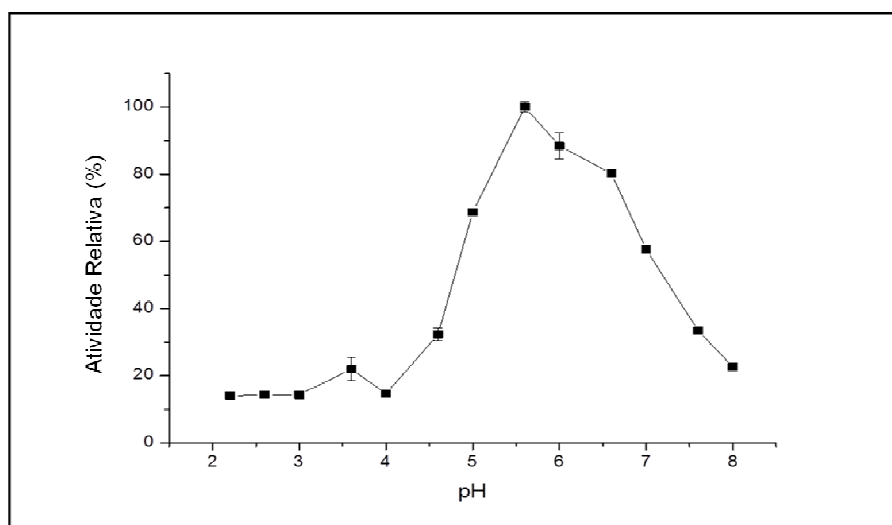
#### 5.4. Determinação do pH e Temperatura Ótimos

A estrutura e forma do sítio ativo de uma enzima são decorrência de sua estrutura tridimensional, e pode ser profundamente afetada por qualquer agente ou condição que seja capaz de ocasionar modificações conformacionais da proteína. Assim, a atividade enzimática é dependente de condições ambientais, notadamente pH e temperatura.

As Figuras 21 e 22 apresentam os perfis de atividade em função de diferentes pHs, para as enzimas *ThBgl1* e *ThBgl2*, respectivamente e as Figuras 23 e 24 apresentam os perfis de atividade em função de diferentes temperaturas, para as enzimas *ThBgl1* e *ThBgl2*, respectivamente.



**Figura 21** - Efeito do pH na atividade relativa da enzima *ThBgl1*.



**Figura 22** - Efeito do pH na atividade relativa da enzima *ThBgl2*.

Essas enzimas apresentam pH ótimo na faixa de 5,5, apresentando similaridade com os valores apresentados na literatura (a proteína homóloga ( $\beta$ -glicosidase do fungo *Trichoderma reesei*), cuja estrutura encontra-se depositada no PDB, apresenta pH ótimo de 6,0 (JENG et al., 2010)). Os resultados mostraram que a diminuição do pH (tendendo para o ácido) diminuem a atividade enzimática de ambas proteínas, bem como o aumento (tendendo para o básico). Dessa forma,

valores de pH próximos ao neutro são mais apropriados para o desempenho das  $\beta$ -glicosidases estudadas (Figuras 21 e 22).

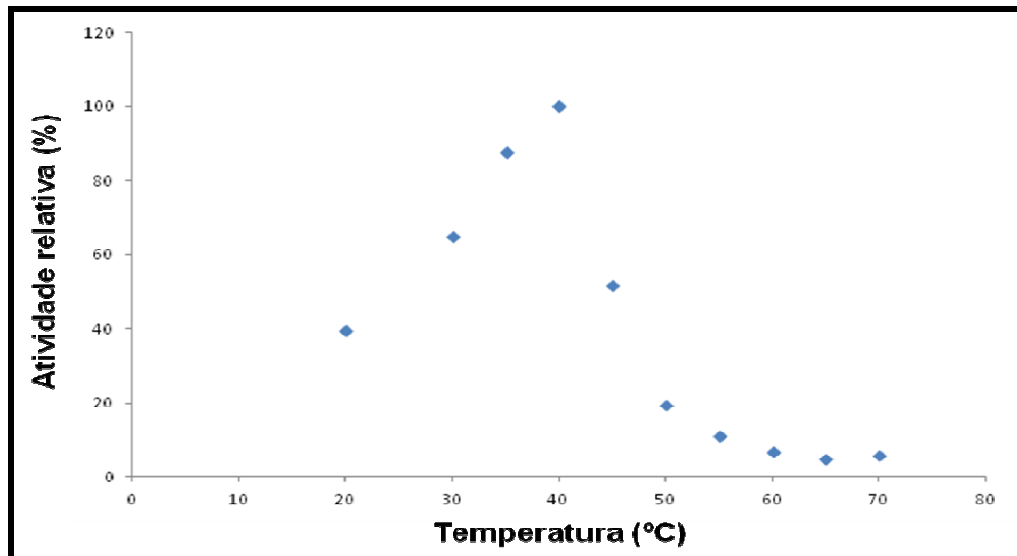


Figura 23 - Efeito da temperatura na atividade relativa da enzima *ThBgl1*.

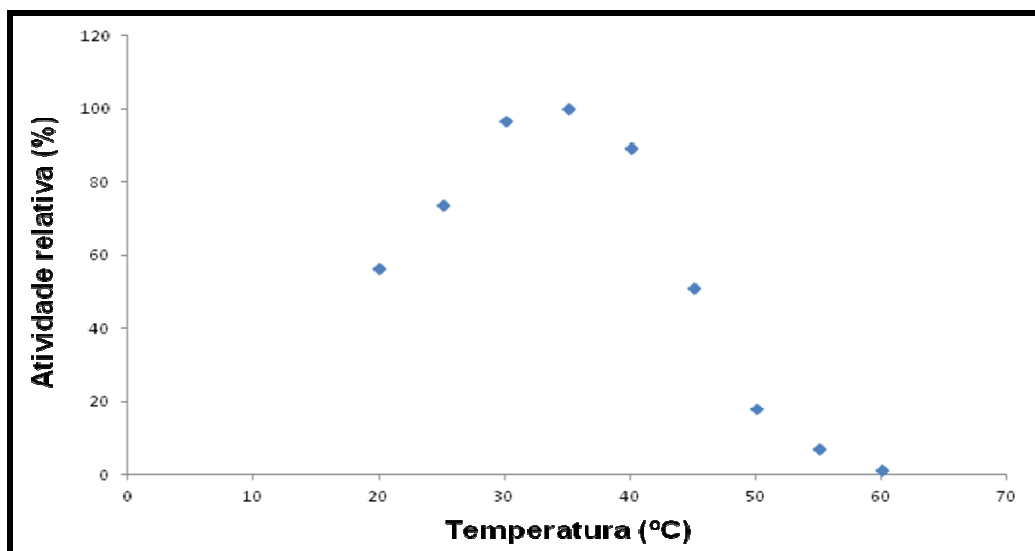


Figura 24 - Efeito da temperatura na atividade relativa da enzima *ThBgl2*.

A enzima *ThBgl1* apresentou temperatura ótima de 40 °C, enquanto a *ThBgl2* apresentou temperatura ótima de 35 °C. Esses valores também condizem com o esperado na literatura, uma vez que a proteína homóloga ( $\beta$ -glicosidase 2 de *Trichoderma reesei*) apresenta temperatura ótima na faixa de 40°C (JENG et al., 2010).

Em temperaturas abaixo de 30 °C a atividade dessas enzimas é praticamente insignificante e acima de 50 °C praticamente não há atividade das mesmas, indicando que ocorreu a desnaturação térmica das enzimas nos valores acima deste (Figuras 23 e 24).

### 5.5. Atividade específica em diferentes substratos

As beta-glicosidases catalisam principalmente a hidrólise das ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas em oligossacarídeos e dissacarídeos, e amino-, alquil- ou aril- $\beta$ -D-glicosídeos. Em bactérias e fungos, essas enzimas são um dos principais componentes do seu sistema celulolítico, sendo responsáveis pela quebra de oligossacarídeos curtos e celobiose em glicose (BHATIA et al., 2002). A fim de verificar a atividade da *ThBgl1* e *ThBgl2* contra diferentes substratos, foi feito um estudo global da sua especificidade contra os mesmos. As Figuras 25 e 26 trazem o resultado dessa análise para as enzimas *ThBgl1* e *ThBgl2*, respectivamente.

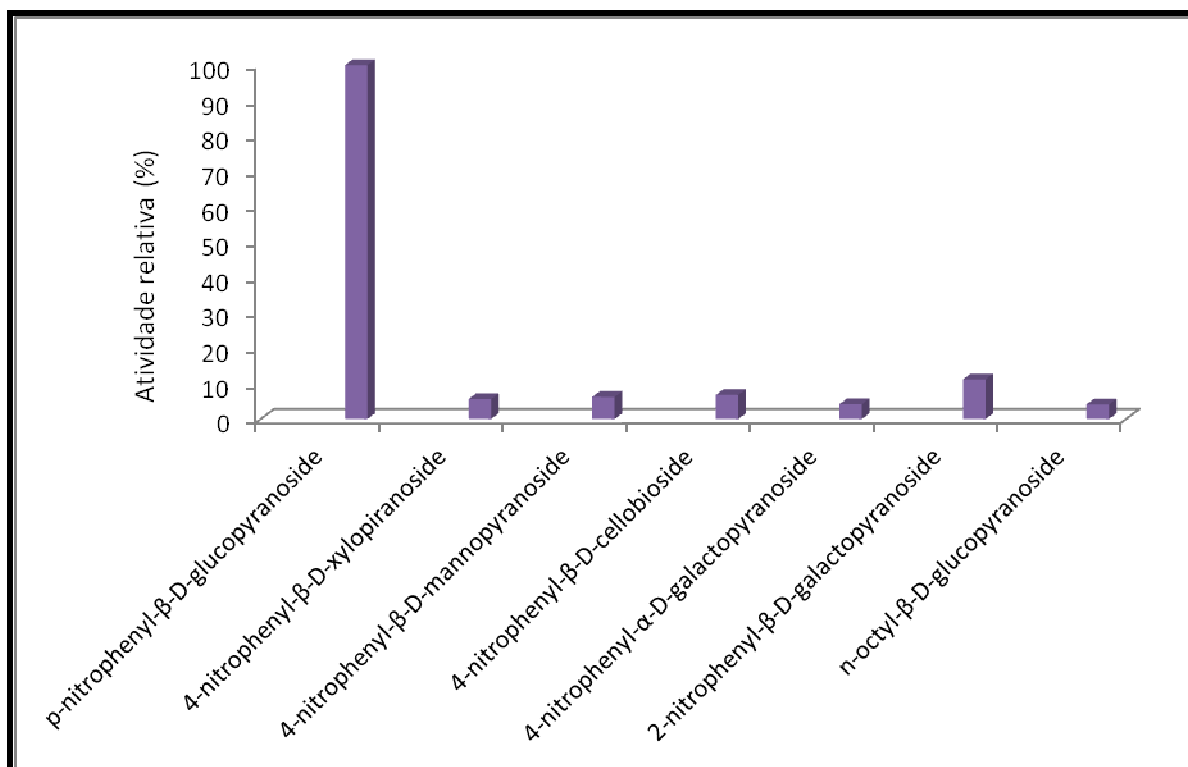
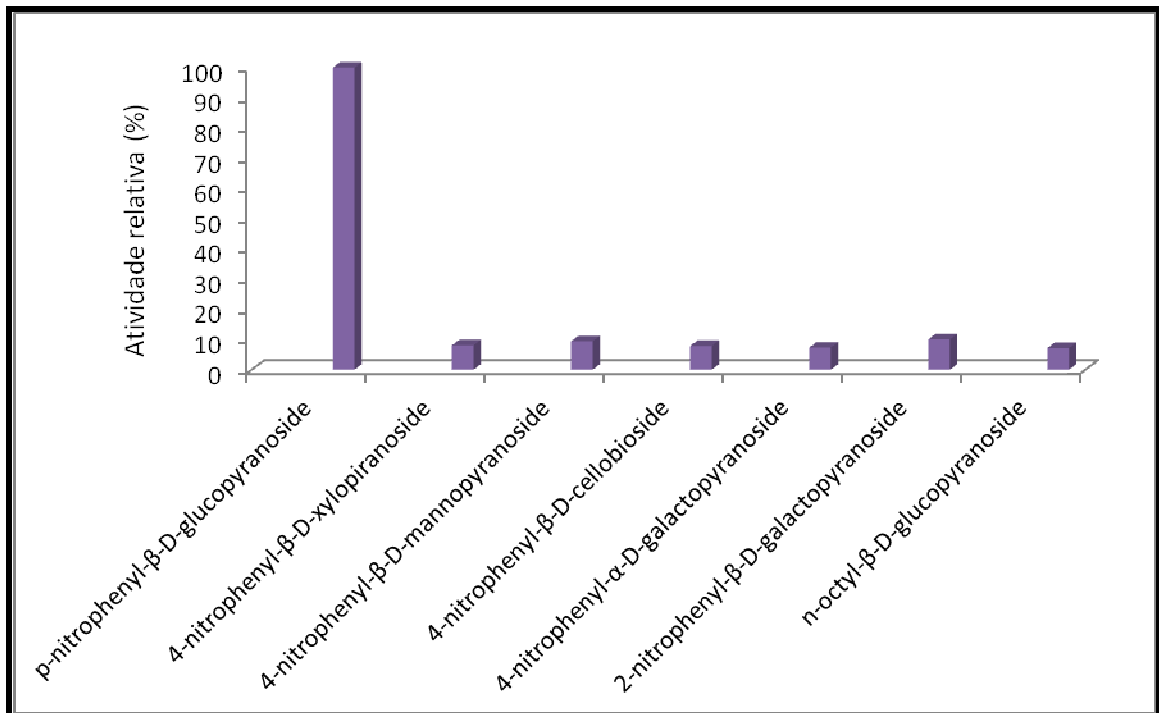


Figura 25 - Atividade da enzima *ThBgl1* contra diferentes substratos sintéticos.



**Figura 26** - Atividade da enzima *ThBgl2* contra diferentes substratos sintéticos.

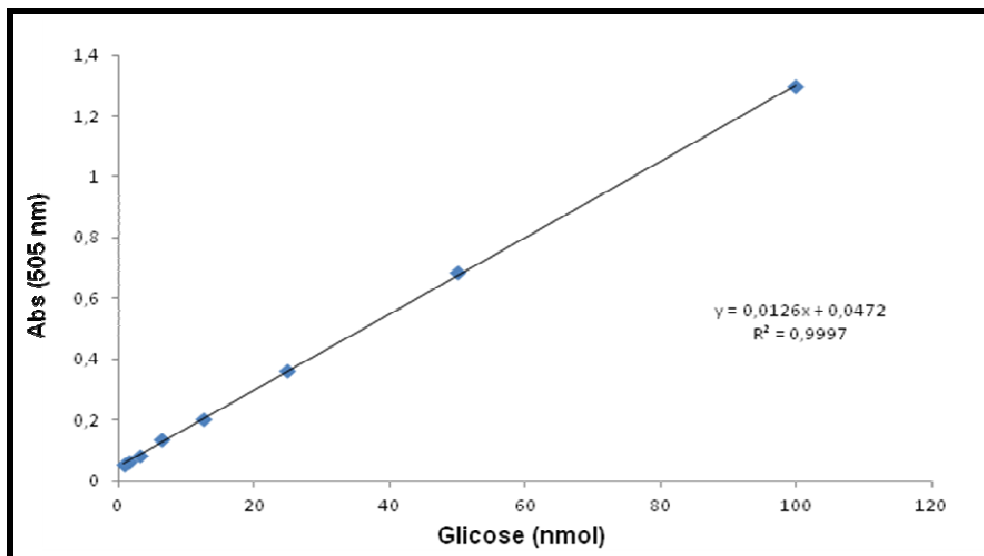
Podemos perceber que essas enzimas apresentam certa atividade em todos os substratos testados. Entretanto, essa atividade é muito baixa se comparada com a atividade contra o substrato pNPG.

Verificou-se também que as enzimas em estudo não têm nenhuma atividade contra substratos poliméricos e que apresentam elevada especificidade contra celobiose (dados não apresentados), o que justifica tratarem-se de  $\beta$ -glicosidases. Os ensaios enzimáticos para *ThBgl1* e *ThBgl2* confirmam que essas enzimas não hidrolisam eficientemente qualquer dos hidratos de carbono poliméricos testados quando comparadas a celobiose.

## 5.6. Atividade de $\beta$ -glicosidase

A curva padrão para glicose, utilizando-se o método da glicose oxidase-peroxidase, GOD, é mostrada na Figura 27. Nessa Figura temos um gráfico da absorbância *versus* a quantidade de glicose liberada (nmol).





**Figura 27-** Curva padrão para glicose (método da glicose oxidase-peroxidase, GOD)

Utilizando-se dessa curva padrão, percebemos que a enzima *ThBgl1* apresentou atividade específica de 39,94 U/mg, enquanto que a enzima *ThBgl2* apresentou atividade específica de 3,35 U/mg. Isso revela que a enzima *ThBgl1* possui maior eficiência de hidrólise se comparada com a enzima *ThBgl2*, ou seja, é capaz de liberar maior quantidade de glicose a partir do mesmo substrato.

### 5.7. Cinética Enzimática

No estudo com as enzimas *ThBgl1* e *ThBgl2*, utilizando-se pNPG como substrato, inicialmente foram feitos ensaios de atividade em diferentes pHs para garantir que os ensaios cinéticos fossem realizados no pH ótimo. Desta forma, optou-se por realizar os ensaios em tampão citrato-fosfato 50 mM pH 5,5.

As curvas obtidas para os experimentos de cinética, utilizando-se pNPG como substrato, para as enzimas *ThBgl1* e *ThBgl2* encontram-se nas Figuras 28 e 29, respectivamente. As curvas foram ajustadas de acordo com a cinética de inibição pelo substrato, de acordo com a equação 2, pois em altas concentrações de substrato há uma queda de velocidade que não pode ser descrita pela equação de Michaelis-Menten.

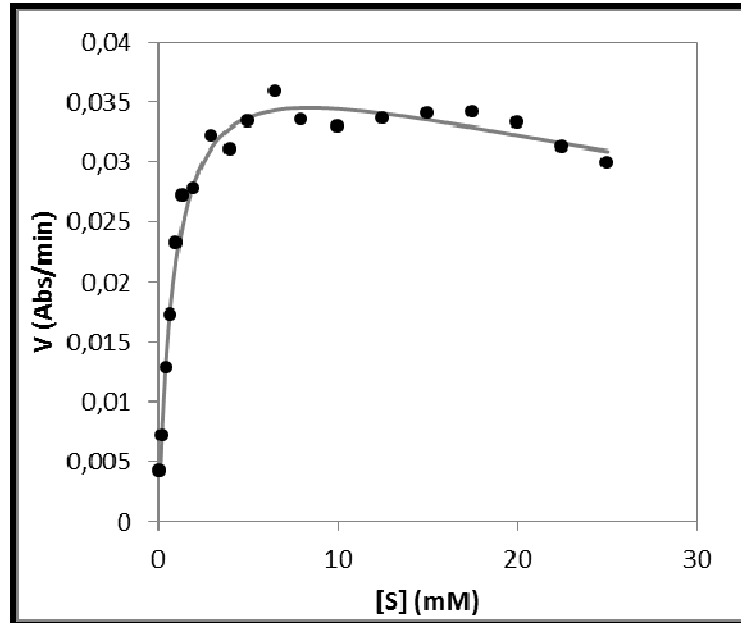


Figura 28 - Curva de cinética enzimática para a enzima *ThBgl1*, utilizando-se o substrato pNPG.

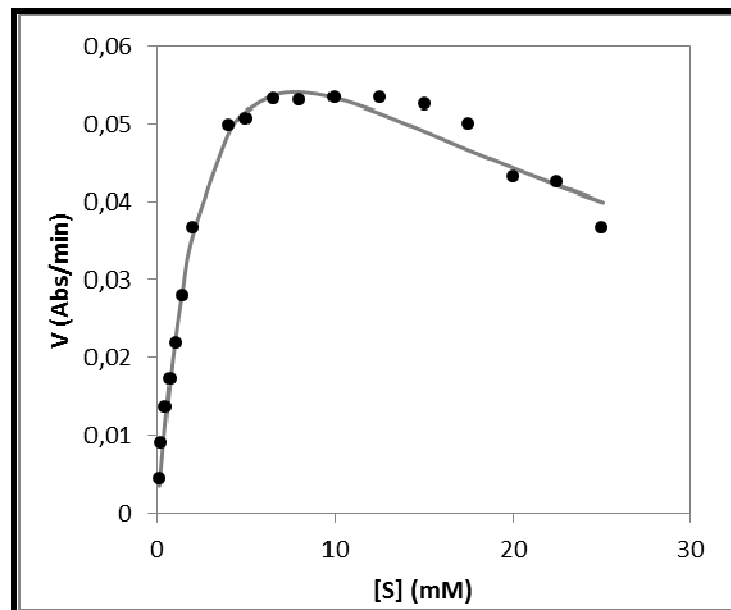


Figura 29 - Curva de cinética enzimática para a enzima *ThBgl2*, utilizando-se o substrato pNPG.

Utilizando-se p-nitrofenil- $\beta$ -fucopiranosídeo como substrato, foram obtidas as curvas de cinética enzimática para as enzimas *ThBgl1* e *ThBgl2*, que são apresentadas nas Figuras 30 e 31, respectivamente. A curva obtida para a *ThBgl2* foi ajustada de acordo com uma cinética de inibição pelo substrato, devido à queda de velocidade em altas concentrações de substrato.

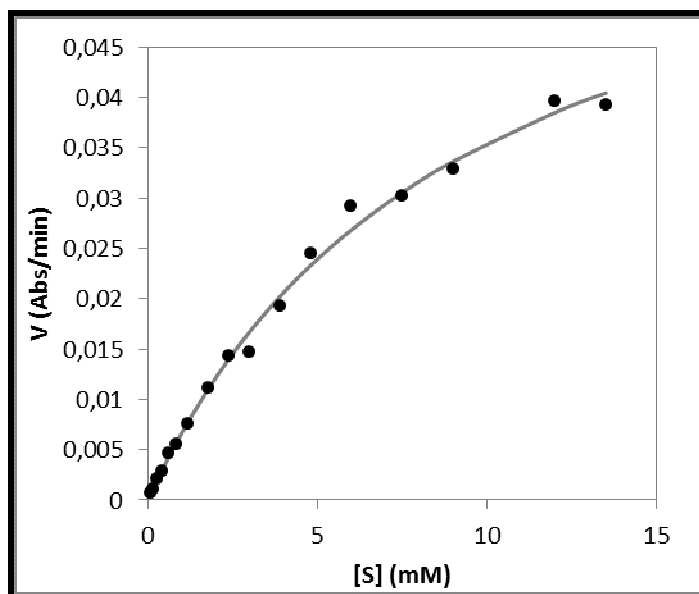


Figura 30 - Cinética enzimática para *ThBgl1*, utilizando-se o substrato p-nitrofenil- $\beta$ -fucopiranosídeo.

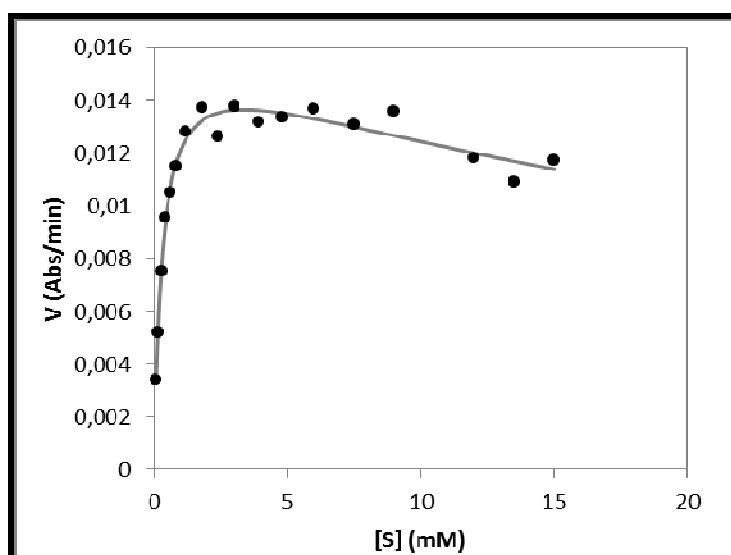


Figura 31 - Cinética enzimática para *ThBgl2*, utilizando-se o substrato p-nitrofenil- $\beta$ -fucopiranosídeo.

Utilizando-se p-nitrofenil- $\beta$ -galactopiranosídeo como substrato, foram obtidas as curvas de cinética enzimática para as enzimas *ThBgl1* e *ThBgl2*, que são apresentadas nas Figuras 32 e 33, respectivamente. Ambas as curvas foram ajustadas ao modelo de Michaelis-Menten (Equação 1).

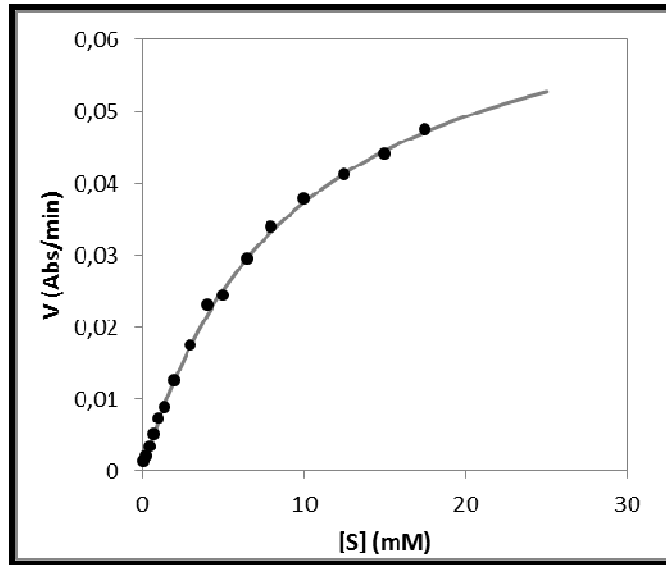


Figura 32 - Cinética enzimática para *ThBgl1*, utilizando-se o substrato p-nitrofenil- $\beta$ -galactopiranosídeo.

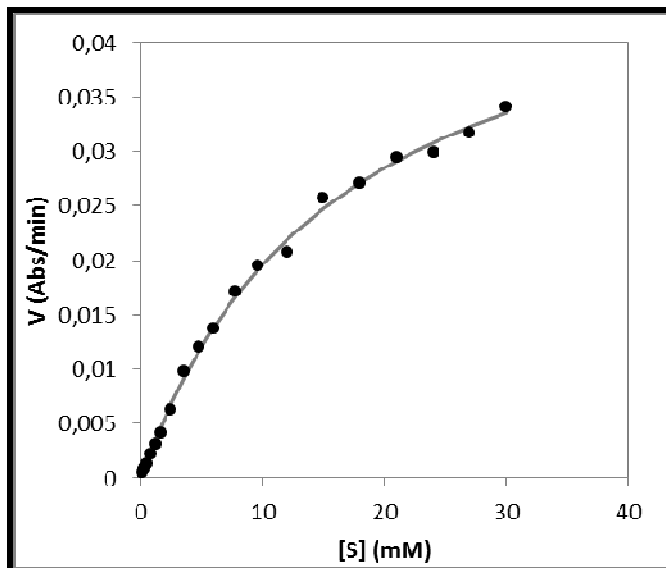


Figura 33 - Cinética enzimática para *ThBgl2*, utilizando-se o substrato p-nitrofenil- $\beta$ -galactopiranosídeo.

Utilizando-se celobiose como substrato, foram obtidas as curvas de cinética enzimática para as enzimas *ThBgl1* e *ThBgl2*, que são apresentadas nas Figuras 34 e 35, respectivamente. Ambas as curvas foram ajustadas ao modelo de Michaelis-Menten (Equação 1).

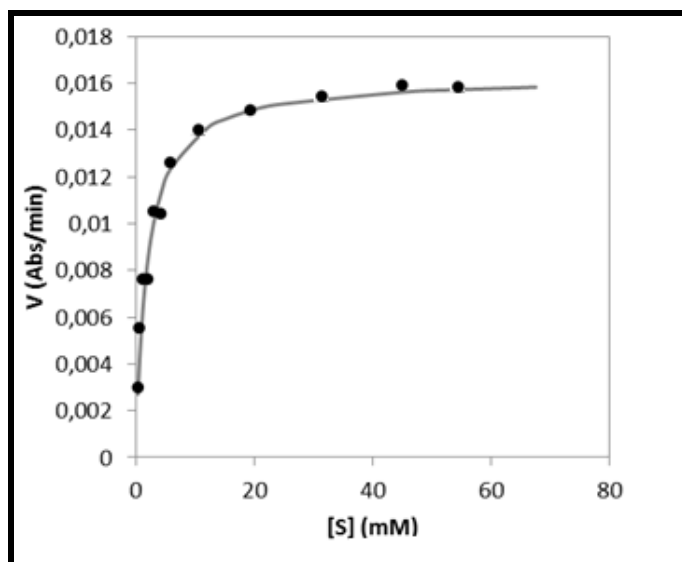


Figura 34 - Cinética enzimática para *ThBgl1*, utilizando-se o substrato celobiose.

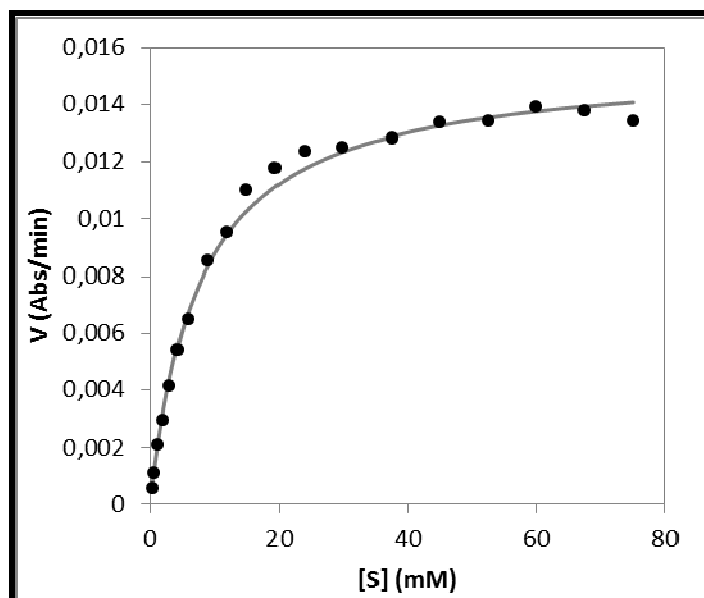


Figura 35 - Cinética enzimática para *ThBgl2*, utilizando-se o substrato celobiose.

A Tabela 3 traz os resultados dos parâmetros cinéticos para as enzimas *ThBgl1* e *ThBgl2* obtidos a partir dessas curvas.

**Tabela 3** – Parâmetros cinéticos para as enzimas *ThBgl1* e *ThBgl2*.

		<b>Celobiose</b>	<b>p-nitrofenil-<math>\beta</math>-fucopiranosídeo</b>	<b>p-nitrofenil-<math>\beta</math>-galactopiranosídeo</b>	<b>pNPG</b>
<b><i>ThBgl1</i></b>	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	50 $\pm$ 1	86 $\pm$ 4	3,19 $\pm$ 0,04	4,6 $\pm$ 0,2
	$K_M$ (mM)	1,8 $\pm$ 0,2	9,2 $\pm$ 0,8	9,4 $\pm$ 0,4	0,60 $\pm$ 0,07
	$k_{cat}/K_M$	28 $\pm$ 3	9,3 $\pm$ 0,9	0,34 $\pm$ 0,01	8 $\pm$ 1
	$k_{cat}/K_M$ (relativos)	100	33	1	29
	$K_i$ (mM)	----	----	----	75 $\pm$ 16
<b><i>ThBgl2</i></b>	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	1,71 $\pm$ 0,02	0,73 $\pm$ 0,02	0,355 $\pm$ 0,007	4,6 $\pm$ 0,4
	$K_M$ (mM)	7,6 $\pm$ 0,4	0,29 $\pm$ 0,03	16,5 $\pm$ 0,9	3,4 $\pm$ 0,4
	$k_{cat}/K_M$	0,22 $\pm$ 0,01	2,5 $\pm$ 0,2	0,022 $\pm$ 0,001	1,4 $\pm$ 0,2
	$k_{cat}/K_M$ (relativos)	9	100	0,9	56
	$K_i$ (mM)	----	39 $\pm$ 6	----	18 $\pm$ 3

Esses resultados mostram que *ThBgl1* tem maior preferência (especificidade) por celobiose, enquanto na *ThBgl2* a celobiose é um substrato com baixa especificidade. Na *ThBgl2* a especificidade é maior por fucosídeos.

Os dados descritos mostram que *ThBgl1* e *ThBgl2* são diferentes quanto a especificidade pelo substrato. Esses dados indicam que *ThBgl1* e *ThBgl2* são diferentes na região de ligação do glicone (subsítio -1) e do aglicone (subsítios +1, +2, etc). Essas diferenças no sítio ativo indicam que essas enzimas podem desempenhar funções diferentes no organismo de origem.

Podemos perceber que, em algumas curvas indicadas anteriormente (Figuras 28, 29 e 31), há uma queda na velocidade nas concentrações maiores de substrato. Como para algumas  $\beta$ -glicosidases existe a ocorrência de reações de transglicosilação em altas concentrações de substrato, foi feito um ensaio de atividade enzimática utilizando as enzimas *ThBgl1* e *ThBgl2* e altas concentrações

de pNPG (20 e 25 mM). Ao final este ensaio foi dividido em dois, no qual em uma metade foi detectada glicose e, na outra, p-nitrofenolato.

As Figuras 36 e 37 trazem os resultados obtidos para análise da ocorrência de transglicosilação (produto liberado *versus* tempo de reação), utilizando-se 20 e 25 mM de pNPG, respectivamente, para as enzimas *ThBgl1* (1) e *ThBgl2* (2).

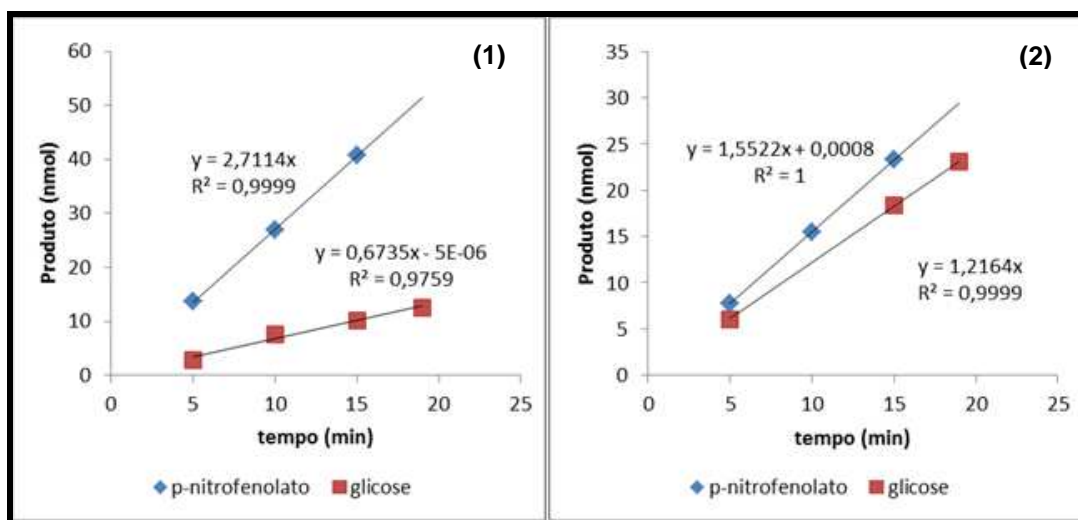


Figura 36 - Possível ocorrência de transglicosilação catalisada pelas  $\beta$ -glicosidases *ThBgl1* (1) e *ThBgl2* (2) utilizando-se 20 mM de pNPG.

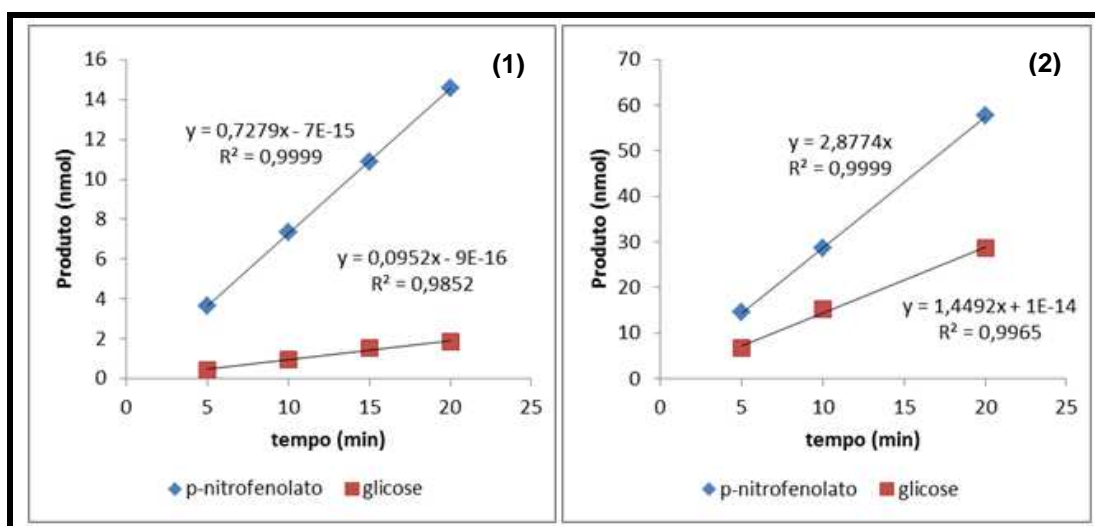
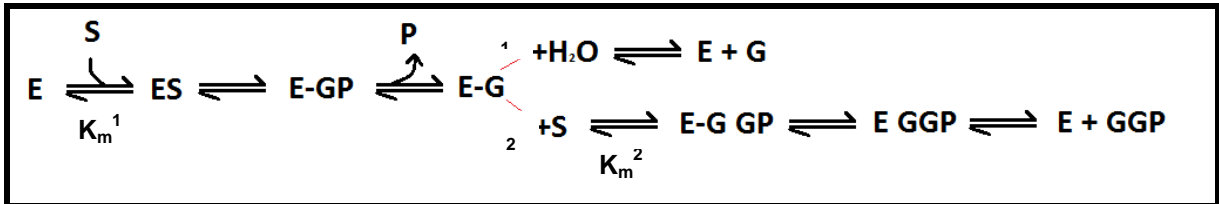


Figura 37 - Possível ocorrência de transglicosilação catalisada pelas  $\beta$ -glicosidases *ThBgl1* (1) e *ThBgl2* (2) utilizando-se 25 mM de pNPG.

A Figura 38 traz um esquema representativo das vias de hidrólise e transglicosilação catalisadas por uma  $\beta$ -glicosidase.



**Figura 38** - Via esquemática de reações de hidrólise e de transglicosilação catalisadas por  $\beta$ -glicosidases. 1 – hidrólise; 2 - transglicosilação (FRUTUOSO, MARANA, 2013).

Na Figura 38 a enzima livre (E) liga-se ao substrato pNPG (S) formando o complexo enzima-substrato (ES), o qual origina o covalente intermediário (E-G) com a concomitante saída do primeiro produto (P), representado pelo p-nitrofenol. O ataque de uma molécula de água em E-G (enzima covalentemente ligada à glicose) caracteriza a hidrólise (rota 1) enquanto que o ataque por um segundo substrato (também chamado aceptor) define a transglicosilação (rota 2). Por esse esquema, observa-se que se a enzima seguir hidrólise ou transglicosilação, em ambos, há a formação de uma molécula de p-nitrofenol. Portanto, a velocidade de formação desse composto é uma somatória das velocidades de hidrólise e de transglicosilação.

A partir dos resultados das Figuras 36 e 37, observa-se que a velocidade de formação de p-nitrofenolato é maior que a de glicose, em todos os casos, sendo que caso essas  $\beta$ -glicosidases só seguissem a rota de hidrólise, a cada molécula de substrato hidrolisada seria formada uma molécula de glicose e uma de p-nitrofenol, e, portanto, as velocidades de formação de ambos produtos deveriam ser iguais. Isso indica que além da rota de hidrólise, as  $\beta$ -glicosidases podem seguir a rota de transglicosilação. Além disso, ao aumentar a concentração de substrato (pNPG), a velocidade de formação de p-nitrofenolato e glicose ficam cada vez mais distintas, indicando que quanto maior a concentração de substrato, maior a tendência das enzimas de seguir a rota de transglicosilação.

Comparando-se as velocidades de formação de diferentes produtos para uma mesma enzima é possível estimar as velocidades da reação de hidrólise e de



transglicosilação. Assim, para a enzima *ThBgl1*, em presença de pNPG 20 mM, temos:

$$V_{\text{pNPG}} = V_{\text{H}} + V_{\text{T}}$$

$$2,7 = 0,67 + V_{\text{T}}$$

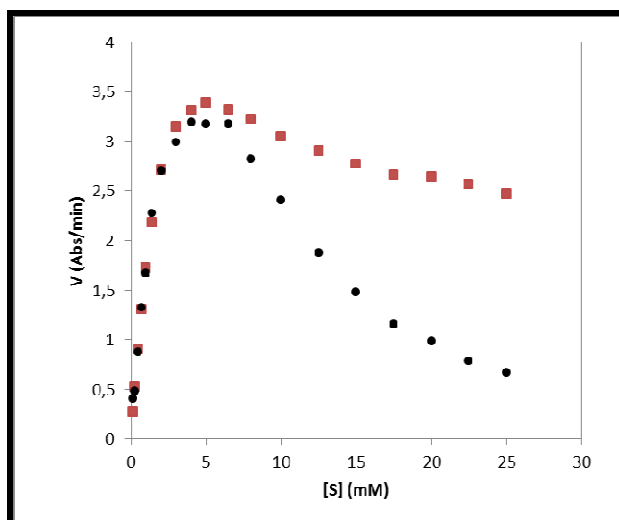
$$V_{\text{T}} = 2,03 \text{ nmol/min}$$

Logo, a velocidade de hidrólise ( $V_{\text{H}}$ ) é cerca de 3 vezes menor que a de transglicosilação ( $V_{\text{T}}$ ), considerando-se a mesma concentração de substrato.

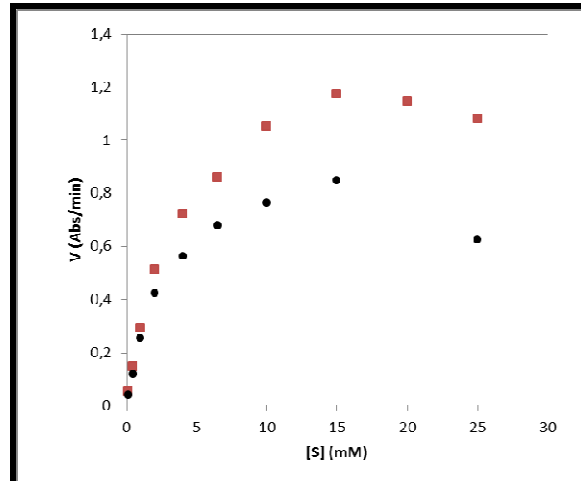
Realizando-se o mesmo cálculo para *ThBgl2*, na mesma concentração de substrato, temos que a velocidade de hidrólise é cerca de 4 vezes maior que a de transglicosilação.

Quando aumentamos a concentração de substrato para 25 mM, a diferença entre as enzimas *ThBgl1* e *ThBgl2* continua clara. Para *ThBgl1* temos  $V_{\text{T}} = 0,6$  nmol/min e  $V_{\text{H}} = 0,1$  nmol/min e para *ThBgl2* temos  $V_{\text{T}} = 1,4$  nmol/min e  $V_{\text{H}} = 1,4$  nmol/min. Logo, para *ThBgl1* a velocidade de hidrólise é 6 vezes menor que a transglicosilação, enquanto que para *ThBgl2* as velocidades são iguais.

Assim, após verificar a ocorrência de transglicosilação pelas enzimas *ThBgl1* e *ThBgl2*, foi realizada uma nova cinética utilizando-se o substrato pNPG em diversas concentrações e, dessa vez, foi acompanhada a formação de p-nitrofenolato e de glicose em cada uma das concentrações. As Figuras 39 e 40 trazem o resultado dessa análise.



**Figura 39** - Velocidade de formação de p-nitrofenolato (em vermelho) e de glicose (em preto) pela enzima *ThBgl1*.



**Figura 40** - Velocidade de formação de p-nitrofenolato (em vermelho) e de glicose (em preto) pela enzima *ThBgl2*.

Em ambos os casos podemos perceber que, em altas concentrações de substrato, há uma maior formação de p-nitrofenolato do que glicose, reforçando a ocorrência de reação de transglicosilação.

A fim de descobrir as funções %H e %T, foi determinada a variação de V (p-nitro) em relação a V (glicose) *versus* a concentração de substrato. Como a formação de glicose só ocorre se a enzima seguir a rota de hidrólise, enquanto que o p-nitrofenolato é formado tanto na hidrólise quanto na transglicosilação (esquema da Figura 38), temos que:

$$V(\text{p-nitro}) = V(\text{hidrólise}) + V(\text{transglicosilação})$$

$$V(\text{glicose}) = V(\text{hidrólise})$$

ou seja, a velocidade de formação de glicose é a velocidade de hidrólise. Portanto:

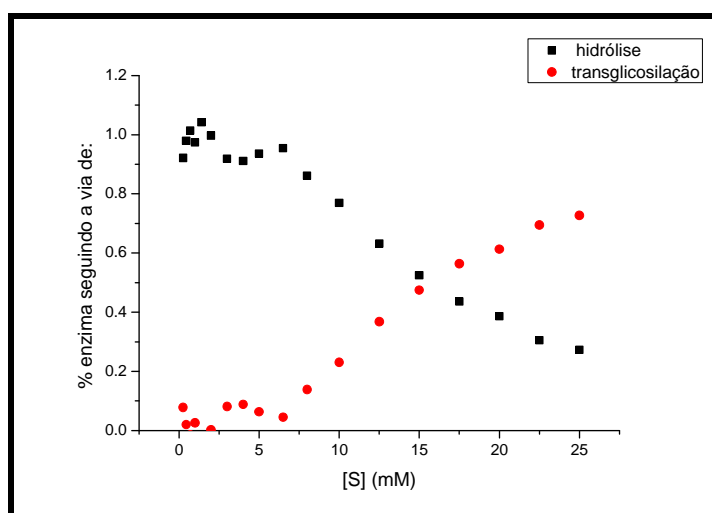
$$\frac{V(\text{p-nitro})}{V(\text{glicose})} = \frac{V(\text{hidrólise}) + V(\text{transg})}{V(\text{hidrólise})} = \frac{1}{\frac{V(\text{hidrólise})}{V(\text{transg}) + V(\text{hidrólise})}} = \frac{1}{\%H}$$

(Equação 6)

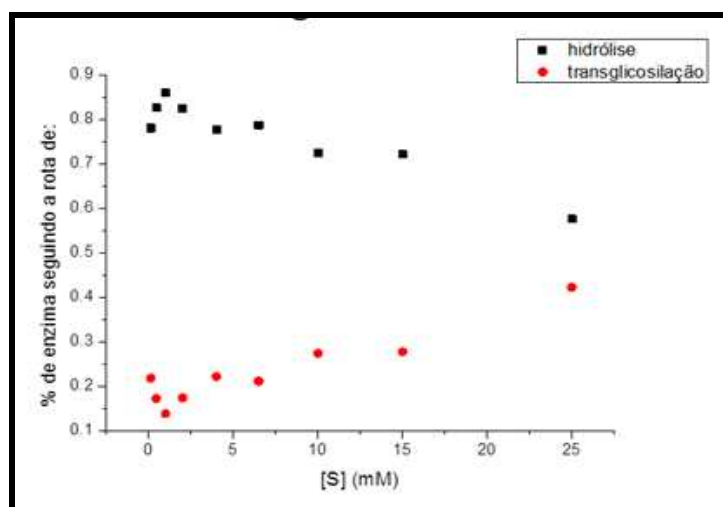
$$\%H + \%T = 1 \quad \text{(Equação 7)}$$

Desta forma, como os valores da velocidade de formação de p-nitrofenolato e de glicose são determinados, através da razão entre eles é possível determinar a porcentagem de  $\beta$ -glicosidase seguindo a rota de hidrólise (%H). Assumindo-se que a enzima que não está seguindo a rota de hidrólise segue a rota de transglicosilação, a porcentagem de  $\beta$ -glicosidase seguindo esta segunda via (%T) também foi determinado. Portanto, feitos esses cálculos para cada concentração de substrato tem-se as funções %H e %T mencionadas nas Equações 3 e 4 (FRUTUOSO, MARANA, 2013).

Os resultados obtidos para as enzimas *ThBgl1* e *ThBgl2* encontram-se nas Figuras 41 e 42, respectivamente.



**Figura 41** - % da enzima *ThBgl1* seguindo as rotas de hidrólise e transglicosilação.



**Figura 42** - % da enzima *ThBgl2* seguindo as rotas de hidrólise e transglicosilação.

Através das Figuras 41 e 42, podemos observar que em baixas concentrações de substrato, a via majoritária de catálise para as enzimas *ThBgl1* e *ThBgl2* é a hidrólise. Conforme a concentração de substrato aumenta, a porcentagem de enzimas seguindo a via de transglicosilação aumenta para ambas  $\beta$ -glicosidasas. No entanto, para a *ThBgl1* ocorre uma inversão, e a via preponderante de catálise passa a ser a de transglicosilação em concentrações maiores que 16 mM de substrato. Isso é indicativo de que a *ThBgl1* é uma  $\beta$ -glicosidase com função transglicosiladora.

Para ajustar as curvas de velocidade de formação de p-nitrofenolato e de glicose em função da concentração de substrato, foram utilizadas as Equações 8 e 9, que são uma junção entre as equações 3 e 4, e 6 e 7.

$$V(\text{glicose}) = \frac{V_m^H \cdot [S]}{K_m^1 + [S]} \cdot \frac{1}{\frac{V(p\text{-nitro})}{V(\text{glicose})}} \quad \text{(Equação 8)}$$

$$V(p\text{-nitro}) = \frac{V_m^H \cdot [S]}{K_m^1 + [S]} \cdot \frac{1}{\frac{V(p\text{-nitro})}{V(\text{glicose})}} + \frac{V_m^T \cdot [S]^2}{K_m^1 \cdot [S] + K_m^2 \cdot [S] + [S]^2} \cdot \left( 1 - \frac{1}{\frac{V(p\text{-nitro})}{V(\text{glicose})}} \right) \quad \text{(Equação 9)}$$

Nas Equações 8 e 9, observa-se que existe um termo  $V(p\text{-nitro})/V(\text{glicose})$ . Esse termo não é um valor constante, e sim uma função. Desta forma, para ajuste dos dados, gráficos de  $V(p\text{-nitro})/V(\text{glicose})$  versus  $[S]$  foram feitos para *ThBgl1* (Figura 43) e *ThBgl2* (Figura 44). A curva obtida para a *ThBgl1* se ajustou bem a uma equação polinomial de segundo grau e da *ThBgl2* a uma reta. Dessa forma, para descrever a variação de  $V(p\text{-nitro})/V(\text{glicose})$  versus  $[S]$  ambas as curvas foram ajustadas a uma equação do segundo grau, do tipo  $B_0 + B_1[S] + B_2[S]^2$ .

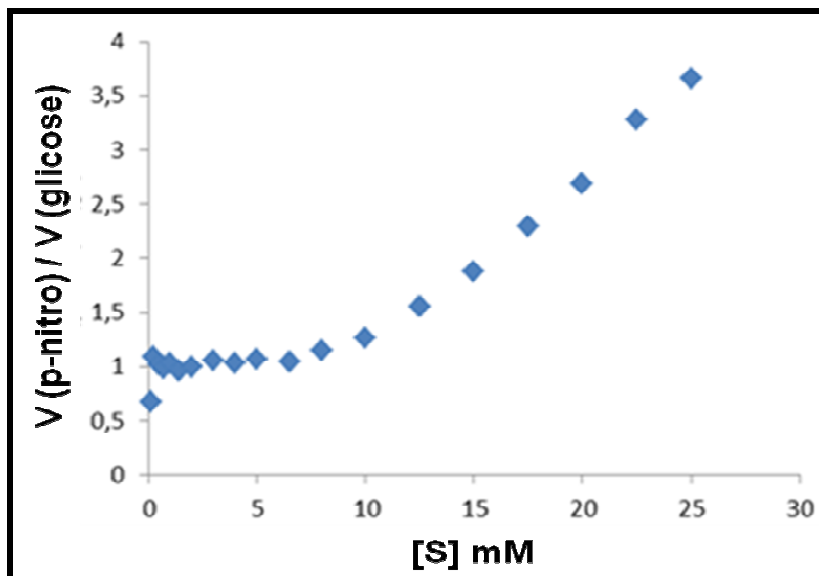


Figura 43 - Velocidade de formação de p-nitrofenolato em relação à velocidade de formação de glicose em função da concentração de substrato para a enzima *ThBgl1*.

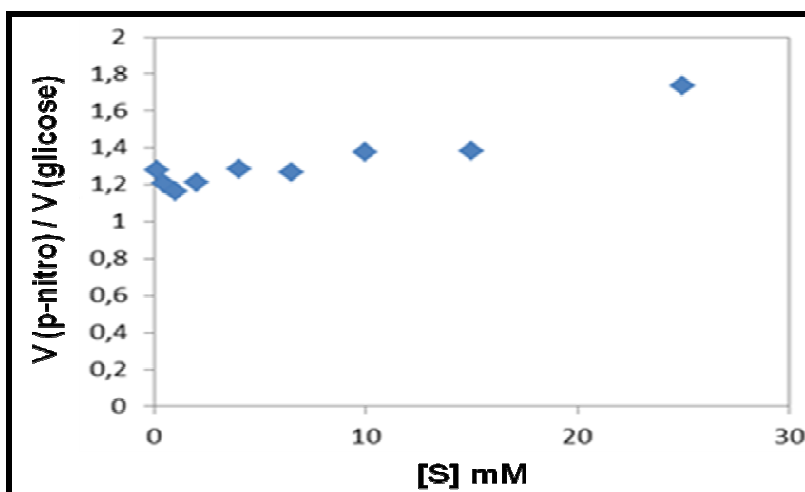


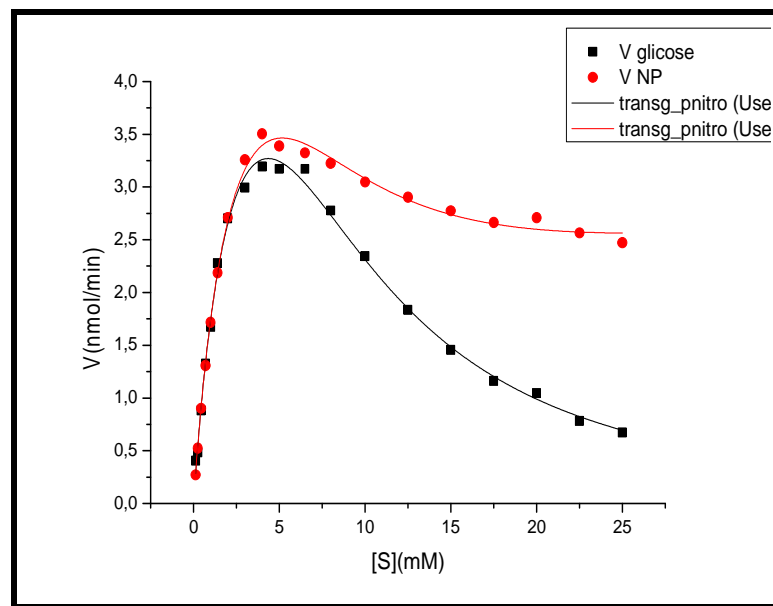
Figura 44 - Velocidade de formação de p-nitrofenolato em relação à velocidade de formação de glicose em função da concentração de substrato para a enzima *ThBgl2*.

Com isso, essa equação de segundo grau determinada anteriormente foi colocada dentro das Equações 8 e 9. Assim:

$$V(\text{glicose}) = \frac{V_m^H \cdot [S]}{K_m^1 + [S]} \cdot \frac{1}{B0 + B1 \cdot [S] + B2 \cdot [S]^2} \quad (\text{Equação 10})$$

$$V(p\text{-nitro}) = \frac{V_m^H \cdot [S]}{K_m^1 + [S]} \cdot \frac{1}{B0 + B1 \cdot [S] + B2 \cdot [S]^2} + \frac{V_m^T \cdot [S]^2}{K_m^1 \cdot [S] + K_m^2 \cdot [S] + [S]^2} \cdot \left( 1 - \frac{1}{B0 + B1 \cdot [S] + B2 \cdot [S]^2} \right) \quad (\text{Equação 11})$$

As curvas de formação de glicose e de p-nitrofenolato foram ajustadas no Origin 8.5.1 usando as Equações 10 e 11, sendo que a velocidade máxima de hidrólise, o  $K_M^1$  e os parâmetros  $B_0$ ,  $B_1$  e  $B_2$  foram ajustados para serem iguais em ambas as curvas (de glicose e de p-nitrofenolato). A partir desses ajustes, foram determinados os parâmetros cinéticos para as enzimas *ThBgl1* e *ThBgl2*, que são mostrados nas Figuras 45 e 46 e nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.



**Figura 45** - V (glicose) e V (p-nitrofenolato) para a enzima *ThBgl1*, utilizando-se pNPG como substrato.

**Tabela 4** - Parâmetros cinéticos para a enzima *ThBgl1*, utilizando-se pNPG como substrato.

	Diluição no ensaio	$V_mH$	$k_{catH}$	$V_mT$	$k_{catT}$	$K_m1$	$K_m2$
<i>ThBgl1</i>	250x	6,97 nmol/min	$8,8 \text{ s}^{-1}$	3,56 nmol/min	$4,5 \text{ s}^{-1}$	2,9 mM	12 mM

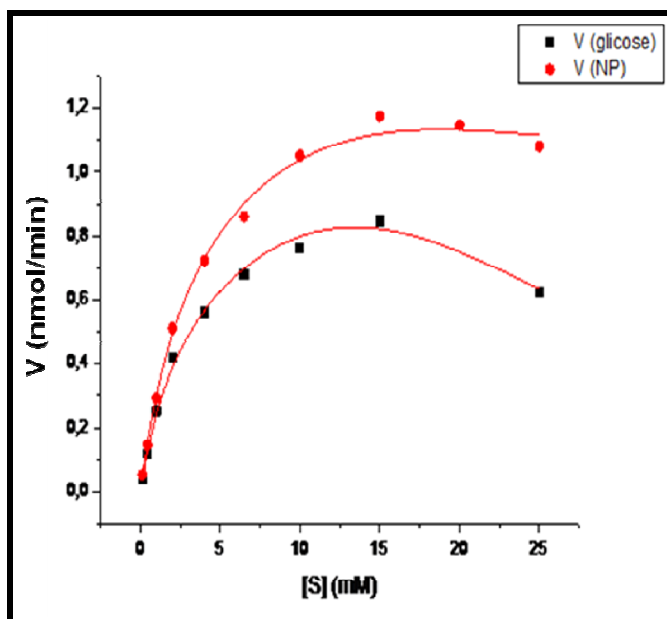


Figura 46 - V (glicose) e V (p-nitrofenolato) para a enzima *ThBgl2*, utilizando-se pNPG como substrato.

Tabela 5 - Parâmetros cinéticos para a enzima *ThBgl2*, utilizando-se pNPG como substrato.

	Diluição no ensaio	$V_mH$	$k_{cat}H$	$V_mT$	$k_{cat}T$	$K_m1$	$K_m2$
<i>ThBgl2</i>	250x	1,62 nmol/min	7,4 s <sup>-1</sup>	1,11 nmol/min	5,1 s <sup>-1</sup>	2,45 mM	5,3 mM

A partir desses novos resultados obtidos utilizando-se pNPG como substrato, podemos perceber que as medidas de velocidade mostram que à medida que cresce a concentração de substrato, aumenta a população de enzimas que seguem a rota de transglicosilação (para as enzimas *ThBgl1* e *ThBgl2*).

Comparando as rotas de transglicosilação e hidrólise para uma mesma enzima, nota-se que no caso da enzima *ThBgl1* como  $k_{cat}T$  é menor que  $k_{cat}H$  (1,9x) e a população de enzimas transglicosilando aumenta, ocorre uma queda na velocidade de produção de p-nitrofenolato. Em suma, a maior parte destas enzimas está seguindo por uma rota “mais lenta”. No caso das enzimas *ThBgl2*, esse efeito é muito menos evidente, pois  $k_{cat}T$  não é tão menor que  $k_{cat}H$  e a população de enzimas seguindo a rota de transglicosilação não é muito maior que aquela seguindo a rota de hidrólise. Deste modo, não há efeito tão grande de redução na produção de p-nitrofenolato.

É interessante notar que  $K_m^2$  da enzima *ThBgl1* é maior que o  $K_m^2$  da enzima *ThBgl2*. Porém, a população de *ThBgl1* que segue a rota de transglicosilação é maior que a população de *ThBgl2* (Figuras 45 e 46). Isso sugere que a probabilidade de seguir pela rota de transglicosilação não depende exclusivamente do preenchimento do sítio de ligação do segundo substrato, pois caso fosse este o fator limitante o preenchimento seria sempre maior em qualquer concentração de substrato para *ThBgl2* e assim essa enzima teria maior tendência de seguir para transglicosilação. Naturalmente a ligação do segundo substrato é essencial para ocorrência da transglicosilação, mas não basta apenas este evento.

É provável que o fator que determina a população de enzimas que segue pela rota de transglicosilação seja a entrada/ligação da molécula de água “catalítica” no sítio ativo (molécula de água que participa na hidrólise do intermediário covalente).

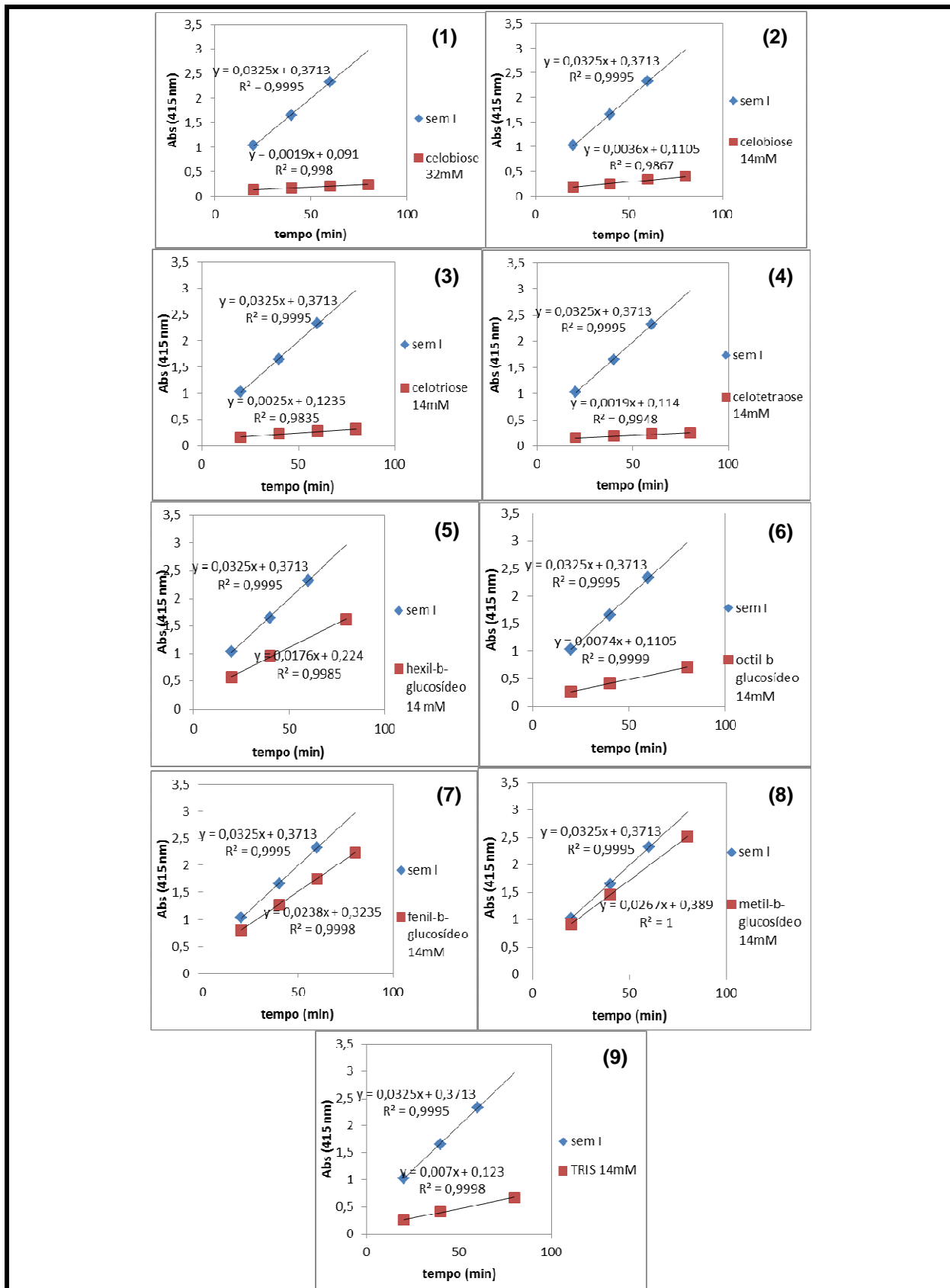
Resíduos hidrofóbicos e volumosos, quando presentes no canal pelo qual a água entra no sítio ativo, reduzem a probabilidade de sua ligação e passagem (FRUTUOSO, MARANA, 2013). Desta forma, em altas concentrações de substrato, a enzima que em geral utilizaria uma molécula de água para hidrolisar a glicose covalentemente ligada no sítio ativo (intermediário covalente), tem uma maior probabilidade de substituí-la por um novo substrato, fazendo a reação de transglicosilação.

A enzima *ThBgl1* tem uma fenilalanina no canal da água catalítica, enquanto a enzima *ThBgl2* tem uma asparagina. Como a fenilalanina é volumosa e hidrofóbica, *ThBgl1* pode ter maior tendência de transglicosilar. Essa hipótese parece ser corroborada pelos resultados obtidos pela produção de glicose em velocidade muito menor por esta enzima (resultado que indica maior atividade de transglicosilação).

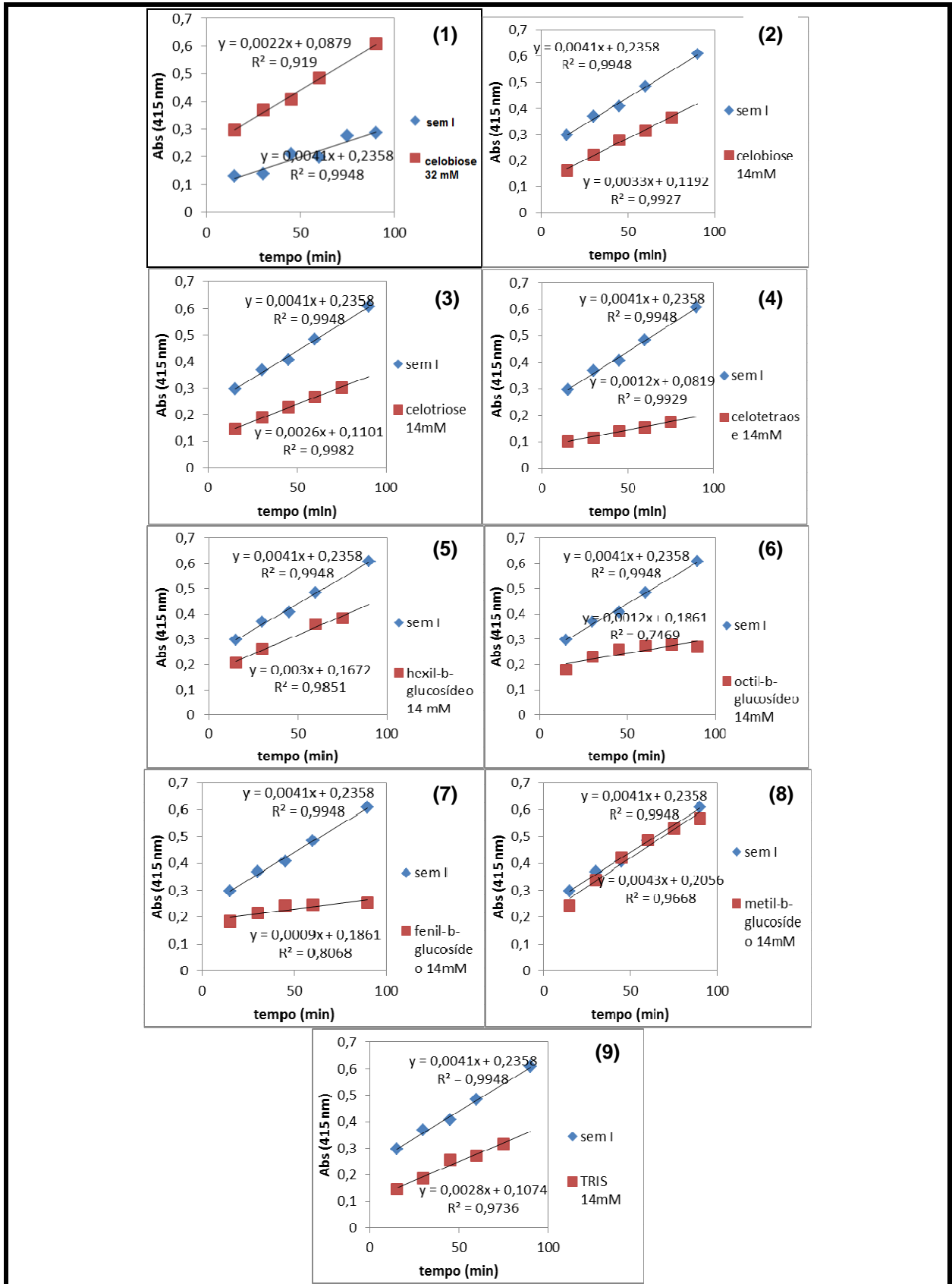
## 5.8. Ensaios com diversos inibidores

Os resultados das inibições são mostradas nas Figuras 47 e 48, para as enzimas *ThBgl1* e *ThBgl2*, respectivamente.





**Figura 47** - Efeito de inibidores na atividade enzimática de *ThBgl1*. (1) celobiose (32 mM); (2) celobiose (14 mM); (3) celotriose (14 mM); (4) celotetraose (14 mM); (5) hexil- $\beta$ -glucopiranosídeo (14 mM); (6) octil- $\beta$ -glucopiranosídeo (14 mM); (7) fenil- $\beta$ -glucopiranosídeo (14 mM); (8) metil- $\beta$ -glucopiranosídeo (14 mM); (9) Tris (14 mM).



**Figura 48** - Efeito de inibidores na atividade enzimática de *ThBgl2*. (1) celobiose (32 mM); (2) celobiose (14 mM); (3) celotriose (14 mM); (4) celotetraose (14 mM); (5) hexil- $\beta$ -glucopiranosídeo (14 mM); (6) octil- $\beta$ -glucopiranosídeo (14 mM); (7) fenil- $\beta$ -glucopiranosídeo (14 mM); (8) metil- $\beta$ -glucopiranosídeo (14 mM); (9) Tris (14 mM).

As diferenças de velocidade na presença e ausência de um mesmo inibidor, sugerem que celodextrinas sejam inibidores mais efetivos da enzima *ThBgl1*. Por outro lado, fenil- $\beta$ -glucopiranosídeo talvez seja um inibidor mais efetivo da enzima *ThBgl2*. Estas diferenças, se confirmadas através de medidas de  $K_i$ , podem sugerir diferenças na região de ligação do aglicone (subsítios +1, +2, +3, etc...). Estas diferenças podem ser em forma, abertura, extensão e composição de resíduos. Esses dados estão de acordo com os resultados de cinética apresentados na Tabela 3, em que observa-se que *ThBgl1* se liga bem a substratos do tipo celodextrinas, enquanto que *ThBgl2* não se liga tão bem a esse substrato. Isso indica que essas  $\beta$ -glicosidases podem ter diferentes papéis biológicos.

Embora alinhamentos de sequência primária possam revelar algumas dessas diferenças, um alinhamento estrutural será muito mais efetivo e informativo. Nesta linha de comparação, a determinação da estrutura destas duas  $\beta$ -glicosidases em complexo com celobiose ou outra celodextrina seria interessante, algo que será realizado nos estudos futuros.

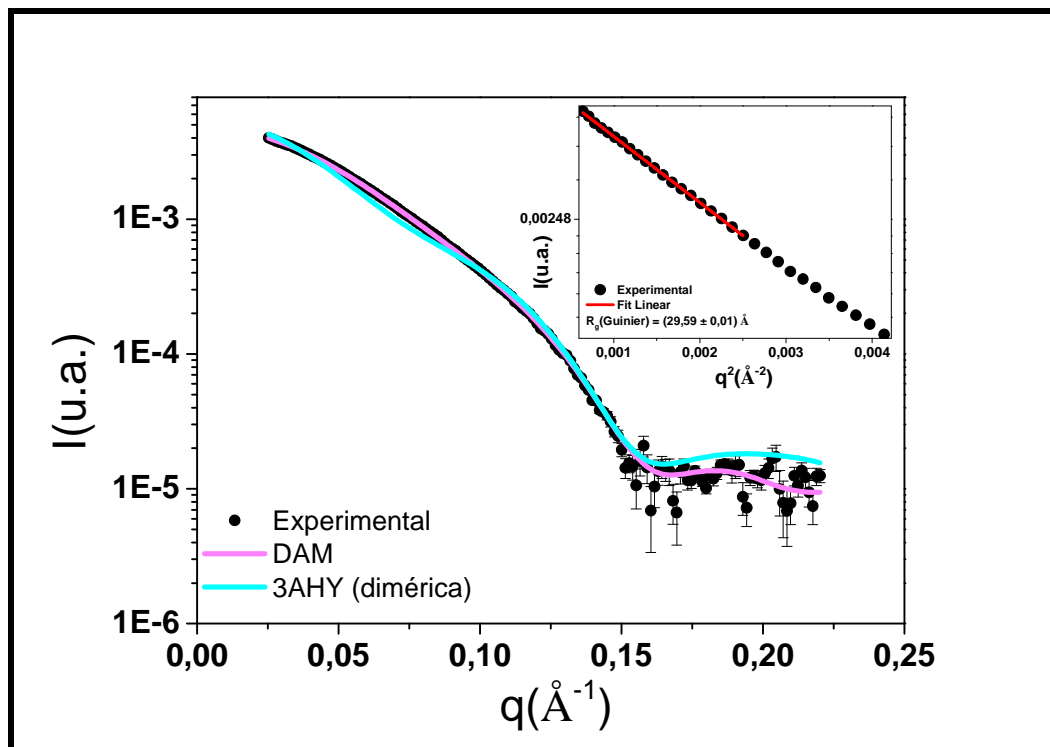
### **5.9. Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS)**

A interpretação dos dados de SAXS permite uma análise detalhada da estrutura global de proteínas. Com o SAXS é possível inúmeras determinações, tais como informações sobre o raio de giro ( $R_g$ ), que corresponde à distância quadrática média dos elétrons relativa a posição do centro de massa da molécula, sendo uma medida global do tamanho e formato do complexo molecular; podemos obter também a função de distribuição de distâncias  $p(r)$  que nos permite inferir sobre o formato do envelope da enzima em solução; o diâmetro máximo ( $D_{m\acute{a}x}$ ), que corresponde à maior distância interna que tem na proteína em solução; fazer uma predição de estruturas quaternárias em oligômeros, e, também, a visualização de processos de enovelamento e desenovelamento protéico (SVERGUN; KOCH, 2003).

Com relação à enzima *ThBgl1*, as curvas de espalhamento dessa enzima (subtraído o espalhamento do tampão), nas três concentrações do experimento, foram sobrepostas, demonstrando que não havia efeito de concentração nas amostras, ou seja, qualquer uma das amostras poderia ser usada para gerar

modelos. Foi utilizada a curva 6 mg/mL. A amostra não demonstrou sofrer efeito pela radiação, considerando o tempo de 300 segundos total de exposição.

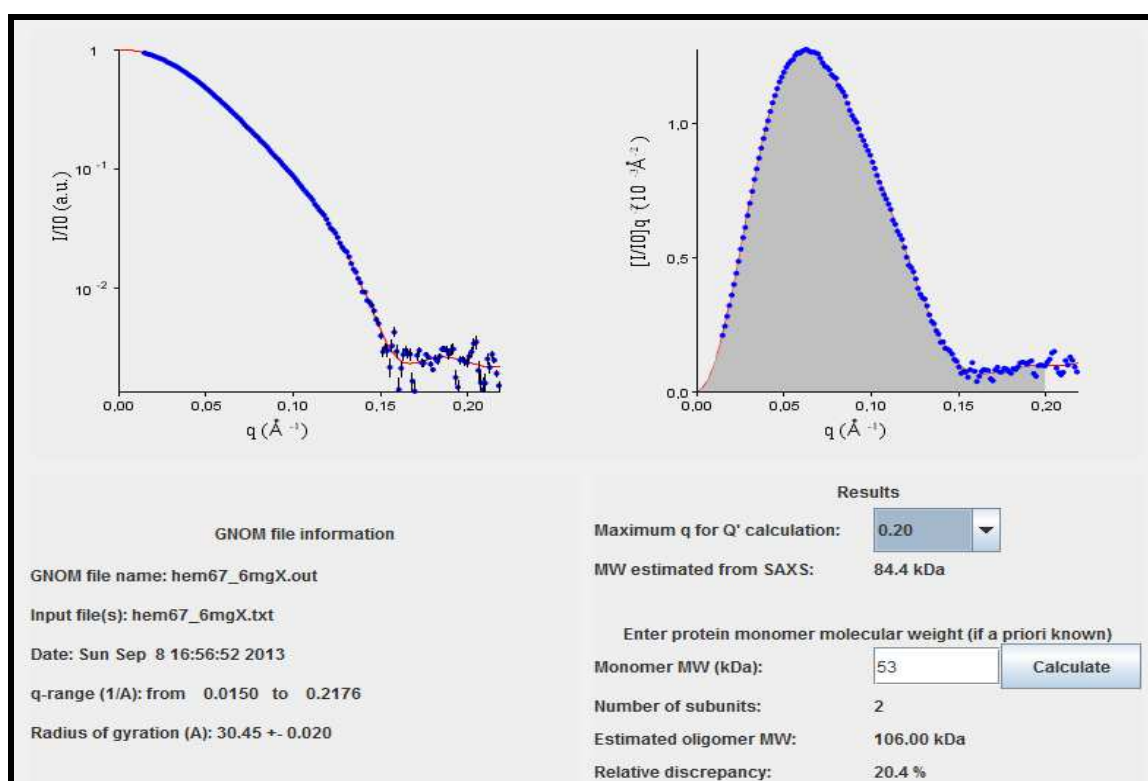
Na Figura 49 encontra-se a curva de espalhamento experimental da proteína *ThBgl1* (a 6mg/mL, em tampão 50 mM Tris pH 8,0 e 150 mM NaCl), a curva do modelo gerado no programa *Dammin* (SVERGUN, 2010) e a curva de espalhamento a baixo ângulo simulado para a estrutura de alta resolução da homóloga de maior identidade sequencial (pdb id. 3AHY).



**Figura 49** - Curvas de espalhamento para a enzima *ThBgl1*.

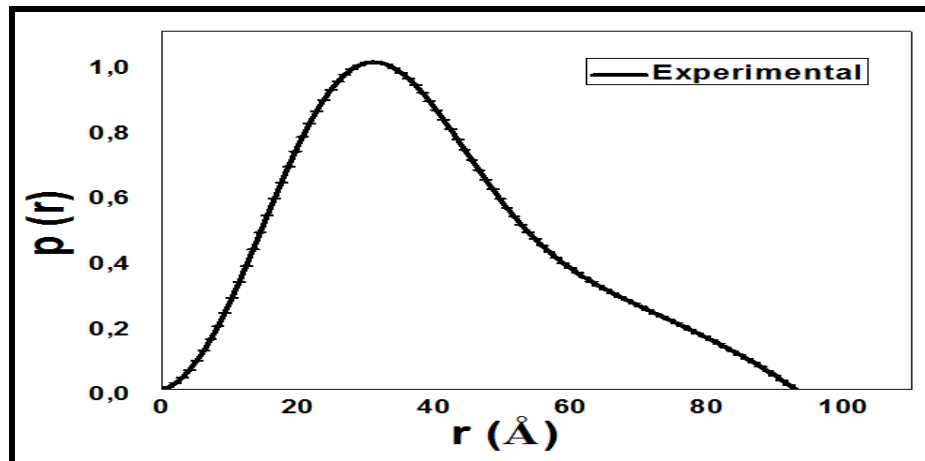
No gráfico principal encontram-se as curvas do espalhamento experimental (círculos com barras de erro), do modelo gerado no programa *Dammin* (SVERGUN, 1999) (linha rosa) e da estrutura de alta resolução da homóloga de maior identidade sequencial (pdb 3AHY) (linha em ciano). O quadro do canto superior direito apresenta um anexo com a região inicial da curva experimental, a região de Guinier, de onde pode ser extraído o  $R_g$  (raio de giro) experimental da molécula pela aproximação de Guinier (Equação 5).

Através da curva experimental extrapolada para valor de  $q$  nulo no programa *Gnom* (SVERGUN, 1992), e considerando um valor de  $q_{max}$  de  $0,2 \text{ \AA}^{-1}$  (valor desprovido do efeito da flexibilidade da molécula) (GLATTER; KRATKY, 1982), foi possível estimar uma massa molecular de 84,4 kDa para a proteína *ThBgl1* de *Trichoderma harzianum* (Figura 50). Considerando a massa do monômero sendo aproximadamente 53kDa, a proteína em estudo se apresenta em solução como um dímero, segundo calculado pelo programa *SAXS MoW* (SVERGUN, 1992).



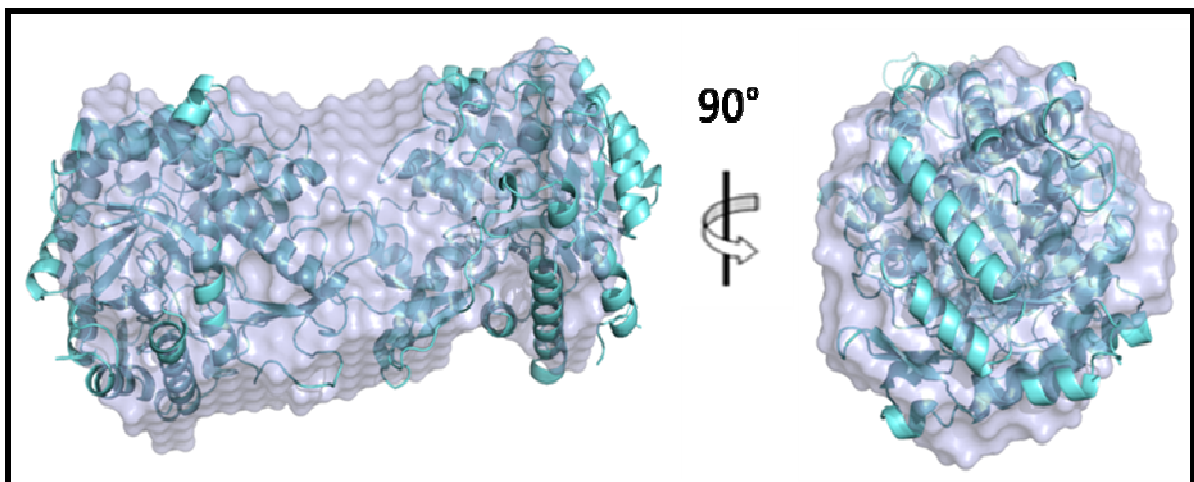
**Figura 50** - Interface do programa *SAXS MoW* mostrando as curvas de saída (.out) do programa *Gnom*, e seus resultados para a estimativa da massa molecular da enzima *ThBgl1*.

No programa *Gnom* (SVERGUN, 1992), e pelo método da Transformada Inversa de Fourier, foi gerada a curva de distribuição de distâncias  $p(r)$  (Figura 51). Através dela, podemos prever o formato alongado do envelope molecular, que se confirma com a geração do modelo *ab initio* ao final do processo.



**Figura 51** - Curva de distribuição de distâncias, para os dados experimentais da enzima *ThBgl1*.

A partir da curva de espalhamento foram gerados modelos *ab initio* do envelope da proteína pelo programa *Dammin* (SVERGUN, 1999). O resultado obtido após a média de 10 modelos é mostrado na Figura 52, alinhado pelo programa *SUPCOMB* (SVERGUN, 1999) com a estrutura tridimensional de alta resolução da homóloga de mais alta identidade sequencial.



**Figura 52** - Modelo *ab initio* para o envelope molecular da proteína *ThBgl1* alinhado com a estrutura de alta resolução de sua homóloga de mais alta identidade sequencial (pdb 3AHY).

Apesar de em algumas regiões na sobreposição mostrada na Figura 50, o dímero cristalográfico ultrapassar os limites do envelope gerado por SAXS, deve ficar claro que os monômeros utilizados na sobreposição estavam presos às coordenadas de uma rede cristalográfica, ou seja, na realidade (em solução), os

monômeros reais da proteína *ThBgl1* podem se arranjar mais próximos um do outro, já que essa interface dimérica apresenta várias regiões de *loops* e alças.

Pelo *Gnom* (SVERGUN, 1992) foram obtidos os valores de *R<sub>g</sub>* e *D<sub>max</sub>*. A Tabela 6 traz os parâmetros estruturais derivados das curvas de ajustes.

**Tabela 6** - Parâmetros estruturais da enzima *ThBgl1*, obtidos por SAXS.

	<b>Experimental</b>	<b>DAM<sup>#</sup></b>	<b>3AHY<sup>\$</sup></b>
<b>R<sub>g</sub>(Å)</b>	(29,69 ± 0,01) ( <i>Guinier</i> ) (30,5 ± 0,2) ( <i>Gnom</i> )	30,40	35,62
<b>D<sub>máx</sub>(Å)</b>	93 ± 1	93	105,0
<b>MM(KDa)</b>	53	-	-
<b>χ</b>	-	1,510	6,067
<b>Resolução<sup>€</sup>(Å)</b>	28,55	-	-

<sup>#</sup> DAM , parâmetros do modelo de átomos *Dummy* calculado no programa *Dammin*

<sup>\$</sup> Estrutura de alta resolução obtida por difração de raios-x em monocristal

<sup>€</sup> Resolução:  $2\pi/q_{\text{máx}}$

Podemos concluir então que a proteína *ThBgl1* se apresenta como dímero em solução, como pode ser comprovado pela geração de um modelo de baixa resolução condizente com os dados experimentais, além da sobreposição desse modelo com a estrutura dimérica de sua homóloga de mais alta identidade sequencial (90%). O valor da resolução obtido por essa técnica é relativamente alto, mesmo para esse tipo de experimento, devido à necessidade de exclusão de alguns pontos finais da curva experimental bruta (pontos ruidosos no alto ângulo), porém isso não prejudicou as análises realizadas e as conclusões obtidas.

## 5.10. Ensaio de Cristalização

A análise da triagem de condições de cristalização, 48 horas após a montagem das placas, para a proteína *ThBgl1*, indicou o aparecimento de cristais na seguinte condição: *Kit* Comercial: Index (condição G12): 0,2 M de cloreto de magnésio hexahidratado, 0,1 M HEPES pH 7,5 e 25% de PEG 3350. A Figura 53 traz a imagem do cristal obtido e coletado para a proteína *ThBgl1*.



**Figura 53** - Cristal obtido para a proteína *ThBgl1*.

O cristal era visivelmente bem formado e se mostrou em tamanho adequado para experimentos de difração de raios-X. Mesmo assim, a condição foi otimizada para tentativa de uma melhor resolução.

Para a proteína *ThBgl2*, foi obtido cristal na seguinte condição: *Kit Comercial PEG I* (condição C10): 0,1 M MES pH 6,5 e 25% de PEG 8000. A Figura 54 traz a imagem do cristal obtido e coletado em nosso laboratório.



**Figura 54** - Cristal obtido para a proteína *ThBgl2*

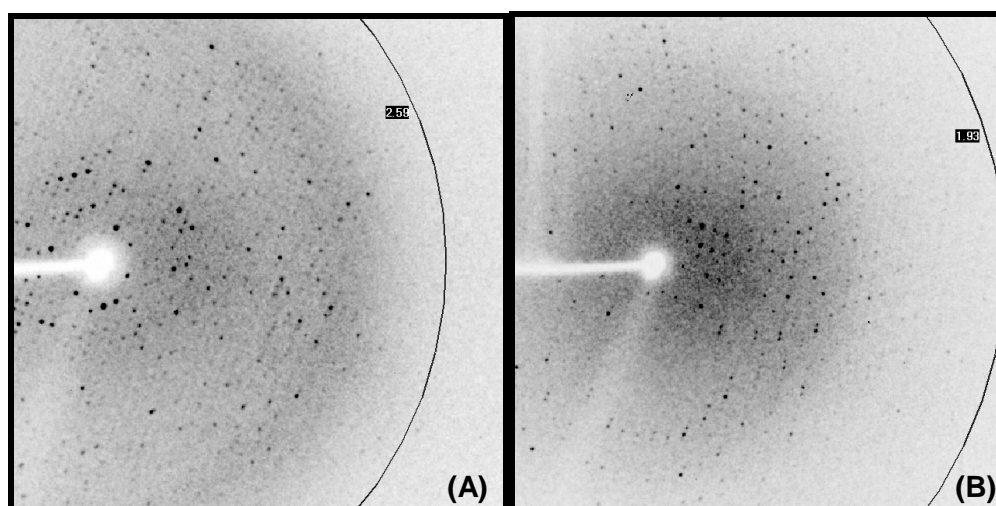
#### **5.10.1. Coleta e Processamento de Dados de Difração de Raios-X**

Os experimentos de coleta e processamento de dados foram feitos em colaboração com o Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. João Renato C. Muniz e de sua aluna de mestrado Mariana Z. T. de Lima, pertencentes ao mesmo grupo de pesquisa no qual este



projeto teve andamento. Vários cristais da proteína *ThBgl1* e apenas um cristal da proteína *ThBgl2* foram testados, sempre em temperatura criogênica (100 K), crioprotetidos com a adição de etileno glicol 15% (v/v) à solução de cristalização quando necessária a adição de agentes crioprotetores.

Os conjuntos de dados de difração de raios-X para a proteína *ThBgl1*, utilizados posteriormente para obtenção dos modelos estruturais, foram coletados na linha de cristalografia de proteínas MX-2, no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil) e também em nosso laboratório (melhor resolução). Já a proteína *ThBgl2* teve seu cristal coletado em nosso laboratório, no Bruker-APEX DUO. Os cristais apresentaram padrões de difração bem definidos, aparentemente com ausência de sobreposição de pontos ou *overlaps* (Figura 55). O padrão de difração mostrado na Figura 55 pertence ao cristal mostrado nas Figuras 53 e 54, para as proteínas *ThBgl1* (A) e *ThBgl2* (B).



**Figura 55** - Padrões de difração para os cristais das  $\beta$ -glicosidases (A) *ThBgl1* e (B) *ThBgl2*.

A autoindexação das primeiras imagens e as estratégias de coleta foram realizadas no programa iMOSFLM (LESLIE, 1999), no qual o ângulo de rotação estimado que não gerava *overlaps* foi de  $0,5^\circ$ . Além disso, a estratégia realizada apresentava o número de imagens a ser coletado que renderia completude suficiente de acordo com os grupos espaciais apresentados pelos cristais (especificados na Tabela 7). Valores aproximados dos parâmetros de célula ( $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) e a orientação para o cristal também foram determinados (Tabela 7). Além disso, foi feita a integração das imagens de difração e o refinamento desses

parâmetros. O escalonamento dos dados foi realizado com o programa Scala (CCP4) (COLLABORATIVE..., 1994). Os parâmetros e estatísticas dos conjuntos de dados encontram-se na Tabela 7.

**Tabela 7** – Parâmetros e estatísticas da coleta, processamento e refinamento dos dados cristalográficos das proteínas *ThBgl1* e *ThBgl2*.

<b>Parâmetros</b>	<i>ThBgl1</i>	<i>ThBgl2</i>
Grupo espacial	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Moléculas na unidade assimétrica	2	1
Parâmetros da célula unitária (Å)		
a	94,9	57,5
b	97,7	78,1
c	106,2	100,3
Intervalo de resolução (Å)	71,92 – 2,59 (2,69 – 2,59)	61,64 – 1,97 (2,04 – 1,97)
Número de imagens	623	1176
$\Delta\phi$ (°)	0,5	0,5
Número de reflexões	31201 (3016)	32663 (3212)
Multiplicidade	2,2	4,5
Completeza (%)	99,7 (97,5)	100,0 (100,00)
$R_{\text{merge}}$	0,54	0,50
$\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle$	8,3 (2,2)	8,7 (3,1)

O número de moléculas presentes na unidade assimétrica foi estimado utilizando-se o programa Matthews\_coeff (CCP4) (COLLABORATIVE..., 1994), que faz uso da metodologia proposta por Matthews (MATTHEWS, 1968), considerando a massa molecular de cada monômero sendo aproximadamente 50 kDa. Essa análise resultou na presença de duas moléculas da proteína *ThBgl1* na unidade assimétrica do cristal e de apenas uma molécula da proteína *ThBgl2* na unidade assimétrica.

### 5.10.2. Determinação das estruturas cristalográficas

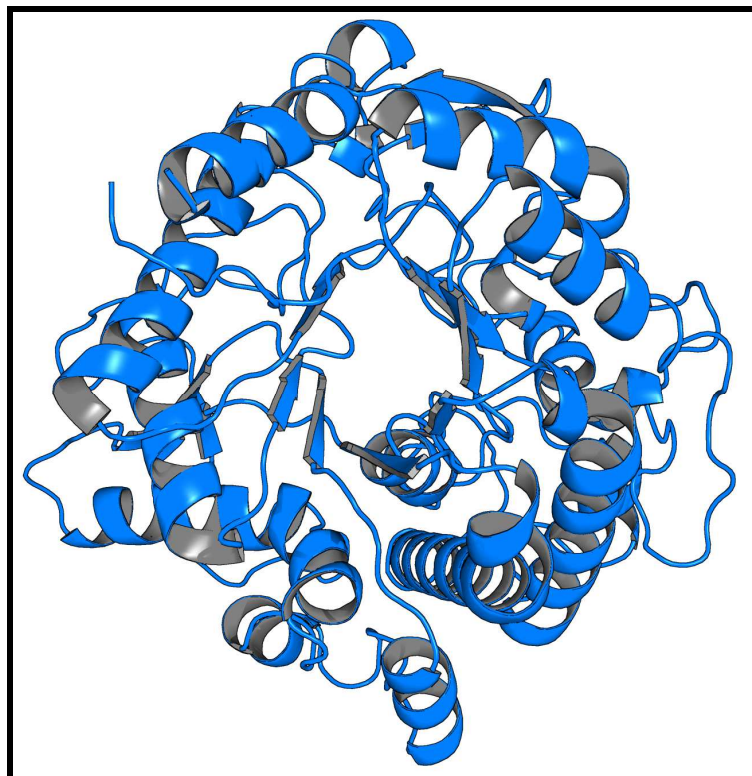
Para a recuperação das fases aplicou-se a técnica de substituição molecular através do programa Phaser (MCCOY, 2007), disponível no pacote de programas cristalográficos CCP4 (COLLABORATIVE..., 1994). Os modelos empregados para resolução das estruturas foram as estruturas homólogas de maior identidade da  $\beta$ -glicosidase 2 de *Trichoderma reesei* depositadas no banco de dados PDB (3AHY). Após escolha da solução correta (melhor estatística e ajuste), o empacotamento cristalino das moléculas foi manualmente inspecionado.

Após esse passo, iniciou-se o processo de refinamento utilizando o programa Phenix (ADAMS, 2010). Vários ciclos de refinamento no espaço real (modificações manuais do modelo, através da inspeção dos mapas de densidade eletrônica utilizando o programa gráfico Coot (EMSLEY et al., 2010)), alternados com cálculos intermediários entre os espaços real e recíproco para refinamento de posições atômicas, restrições geométricas e de contato, refinamento de fator de temperatura individual para todos os átomos, foram realizados com os conjuntos de dados. O monitoramento da concordância do modelo com os dados experimentais foi conduzido através da análise da variação do fator  $R_{factor}$ , juntamente com o fator  $R_{free}$ .

Foi utilizado na análise a visualização e sobreposição das imagens de alta resolução geradas pelo programa PYMOL (Delano Scientific LLC). As Figuras 56 e 57 apresentam os modelos de alta resolução gerados para as proteínas *ThBgl1* e *ThBgl2*, respectivamente. Nestas figuras podemos perceber a presença do barril tim ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>.



**Figura 56** - Estrutura de alta resolução da  $\beta$ -glicosidase de *Trichoderma harzianum* (ThBgl1).

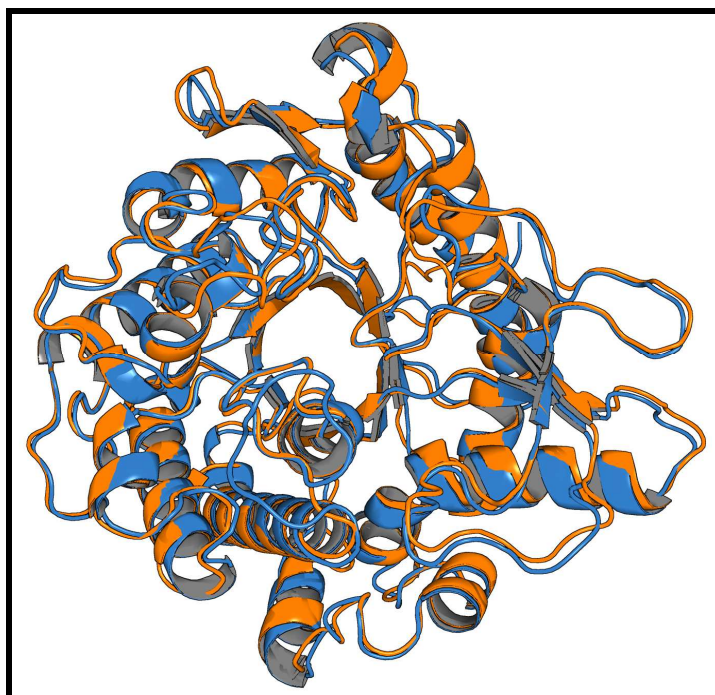


**Figura 57** - Estrutura de alta resolução da  $\beta$ -glicosidase de *Trichoderma harzianum* (ThBgl2).

Na Figura 56, a forma dimérica globular corrobora o modelo *ab initio* de baixa resolução obtido por SAXS (Figura 52). Além disso, os modelos de alta resolução para as proteínas *ThBgl1* e *ThBgl2* condizem com as predições de barril tim característico das hidrolases de glicosídeos da família 1.

Sabe-se que na rede cristalina a estrutura da molécula pode não obedecer ao formato adquirido em solução, pois a flexibilidade, mobilidade e temperatura são parâmetros que podem influenciar para uma possível alteração (SVERGUN; KOCH, 2003).

A Figura 58 traz a sobreposição das imagens geradas para as enzimas *ThBgl1* e *ThBgl2*.



**Figura 58** – Sobreposição das estruturas dos monômeros de alta resolução das enzimas *ThBgl1* e *ThBgl2*.

A sobreposição das estruturas revela pequenas diferenças no enovelamento, com o RMSD da sobreposição sendo de 0,731 Å, o qual é utilizado para estimar os desvios médios da estrutura da proteína em relação à estrutura referência (no caso a estrutura de referência utilizada foi a da homóloga de mais alta identidade sequencial). Portanto, pode-se afirmar que há resíduos de aminoácidos que são alterados entre as duas proteínas por pressão evolutiva. Entretanto, os resíduos que

se conservam entre elas permitem que se mantenha o enovelamento geral da molécula. Análises mais detalhadas do posicionamento de cadeias laterais de aminoácidos estão sendo realizadas para verificar a influência desses resíduos não conservados e, assim, gerar um conhecimento maior de características e peculiaridades dessas proteínas presentes no mesmo organismo.

## 6. Conclusões

Foi realizada a caracterização bioquímica e estrutural de duas  $\beta$ -glicosidases do fungo *Trichoderma harzianum*. As enzimas foram caracterizadas quanto ao seu peso molecular, ponto isoelétrico, estado oligomérico e suas características cinéticas. Além disso, foi possível identificar a ocorrência de transglicosilação catalisada por essas enzimas e que sua arquitetura modular é composta por um barril tim  $(\alpha/\beta)_8$  típico das hidrolases de glicosídeos da família 1. Entretanto, ainda não foi possível entender o motivo pelo qual um mesmo fungo possui duas enzimas com características tão similares entre si. Claramente, mais estudos bioquímicos são necessários para entender essa questão e o mecanismo de ação dessas enzimas, coordenação de cofatores, mapeamento do sítio ativo, entre outros.

## 7. Perspectivas

A partir dos resultados obtidos e concernente às discussões feitas neste trabalho, são geradas perspectivas de novos experimentos e pesquisas futuras como, por exemplo:

- o motivo pelo qual um mesmo fungo possui duas  $\beta$ -glicosidases e qual a atuação das mesmas no organismo do *Trichoderma harzianum*;
- Mutagênese;
- Sacarificação simultânea;
- Ensaio de desnaturação térmica por CD;
- Analisar e comparar efeitos na atividade enzimática específica para diferentes concentrações de íons;
- Cristalização das proteínas na presença de substratos.

## 8. Referências

- ADAMS, P. D. et al. **PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution**. Acta Crystallographica section D: biological crystallography v. 66, n. Pt 2, p. 491-7, 1968
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M.. **Introductory Micology**. 4<sup>th</sup> Edition. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1996.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D.J.. **Basic local alignment search tool**. Journal of Molecular Biology, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTILLA, M. (2005). **Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi**. Microbiology Reviews 29: 719-739.
- ASLANIDIS, C.; JONG, P. J. (1990). **Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR)**. Nucleic Acids Res 18(20): 6069-6074.
- BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. **Progress in bioethanol processing. Progress in Energy and Combustion Science**. Amsterdam. v. 34, n. 5, p. 551-573, 2008.
- BALAT, M. **Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review**. Energy conversion and management. Barking. v. 52, n. 2, p. 858-875, 2011.
- BASTOS, V.D. **Etanol, alcoolquímica e biorrefinarias**. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 25, p. 5-38, mar. 2007.
- BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S.. **Microbial  $\beta$ -glucosidases: cloning, properties, and applications**. Critical Reviews in Biotechnology, v. 22, n. 4, p. 375-407, 2002.
- BLUNDELL, T. L.; JOHNSON, L. N. **Protein Crystallography**. London: Academic Press, 1976. 565p.
- BETANCUR, G. J. V.; PEREIRA JUNIOR., N. **Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. part I: diluted acid pretreatment optimization**. Electronic Journal of Biotechnology, v. 13, n.3, p.1-9, 2010.
- BOCCHINI, D.A.; OLIVEIRA, O.M.M.F.; GOMES, E.; SILVA, R.D. **Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon sources for xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation**. Process Biochemistry, v.40, p.3653-3659, 2005.
- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008, 506p.
- BRUNGER, A. T. **Nature**, v.355, p. 472-474, 1992.

BRUNGER, A. T.; ADAMS, P. D.; Clore, G. M.; DELANO, W. L.; GROS, P.; GROSSE-KUNSTLEVE, R. W.; JIANG, J. S.; KUSZEWSKI, J.; NILGES, M.; PANNU, N. S.; READ, R. J.; RICE, L. M.; SIMONSON, T.; WARREN, G. L. **Crystallography & NMR System: A New Software Suíte for Macromolecular Structure Determination**. Acta Crystallogr., v.54D, p.905-921, 1998.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D. dos; SOUZA, A. P. **As rotas para o etanol celulósico no Brasil**. In: CORTEZ, L. A. B. (Coord.). Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade. São Paulo: Editora Blucher, 2010. p. 365-380.

CAIRNS, J. R. K.; ESEN, A.  **$\beta$ -glycosidases**. Cell Mol Life Sci. 2010 (67) 3389-3405.

CANTAREL, B. L.; COUTINHO, P. M.; RANCUREL, C.; BERNARD, T.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B. **The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics**. Nucleic Acids Research, Oxford, v. 37, p. D233–D238, 2009.

CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I.C. **Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives**. Bioresource Technology. London. v. 101, n. 13 p. 4754-4766, 2010.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR., N.. **Produção, Propriedades e Aplicação de Celulases na Hidrólise de Resíduos Agroindustriais**. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v33n1/31.pdf>>. Acesso em: 27 set 2013.

CHUNDAWAT, S. P. S. et al. **Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals**. Annual review of chemical and biomolecular engineering, v. 2, p. 121–45, doi:10.1146/annurev-chembioeng-061010-114205, 2011.

COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, N. M. **The CCP4 suite: programs for protein crystallography**. Acta Crystallographica section D: biological crystallography, v. 50, n. Pt 5, p. 760-3, 1994.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. **Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases**. FEMS Microbiol Rev 29: 3-23, 2005.

DAN, S. et al. **Cloning, expression, characterization, and nucleophile identification of family 3, *Aspergillus niger* beta-glicosidase**. Journal of Biological Chemistry, v. 275, n. 7, p. 4973-4980, 2000.

DAS M., ROYER T.V., LEV L.G. **Diversity of fungi, bacteria, an actinomycetes on leaves decomposing in a stream**. Appl Environ Microbiol 73:756–767. 2007.

DAVIES, G.J.; HENRISSAT, B. (1995). **Structure and mechanisms of glycosyl hydrolases**. Structure 3: 853-859.



DEMIRBAS, A. **Progress and recent trends in biofuels**. Progress in Energy and Combustion Science, v. 33, n. 1, p. 1–18, doi:10.1016/j.pecs.2006.06.001, 2007.

DODD, D.; CANN, I. K. O. **Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production**. GCB Bioenergy, [S. l.], v. 1, p. 2–17, 2009.

dos SANTOS, J. I. **Estudos Estruturais com Fosfolipases A<sub>2</sub> Homólogas do Veneno de Serpentes do Gênero *Bothrops*: Proposição de um Novo Sítio Miotóxico**. Botucatu, 2007.

DRENTH, J. (1994). **Principles of protein X-ray Crystallography**, Springer-Verlag, New York.

EMSLEY, P.; LOHKAMP, B.; SCOTT, W. G.; COWTAN, K. **Features and Development of Coot**. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 66 (4), 486-501, 2010.

ENERGY INFORMATION ADMINISTRATION. **With Projection to 2030**. Annual Energy Outlook. U.S. Department of Energy, Washington, DC. 2005.

EZIASHI, E.I.; OMAMOR, I. B.; ODIGIE, E. E.. **Antagonismo f *Trichoderma viride* and effects of extracted water soluble compounds from *Trichoderma* species and benlate solution on *Ceratocystis paradoxa***. African Journal of Biotechnology, v. 6, n. 4, p. 388-392, 2007.

FARINAS, C. S. **A Parede Celular Vegetal e as Enzimas Envolvidas na sua Degradação**. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/61175/1/DOC54-2011.pdf>>. Acesso em: 09 jan. 2014.

FARINAS, C. S.; MARTIN-NETO, L.; GIORDANO, R. C. **Instrumentação e Automação na Agroindústria da Cadeia Cana-Etanol**. In: CORTEZ, L. A. B. (Coord.). Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade. São Paulo: Editora Blucher, 2010. p. 601-617.

FINGUERUT, J.; BAUDEL, H.M.; ROSSEL, C.E.V. **III Workshop Tecnológico sobre Hidrólise de Material Lignocelulósico. Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas – Etanol**, 2006.

FRUTUOSO, M. A.; MARANA, S. R.. **A Single Amino Acid Residue Determines the Ratio of Hydrolysis to Transglycolylation Catalyzed by  $\beta$ -Glucosidases**. Protein & Peptide Letters, 2013, 20, 102-106.

GÁRCIA-PAJÓN, C. M.; COLLADO, I. G. **Secondary metabolites isolated from *Colletotrichum***. Natural Products Reports, v. 20, n. 4, p. 426-431, 2003.

GLATTER, O.; KRATKY, O. **Small angle x-ray scattering**. London: Academic Press, 1982. p. 53-83.

GOLDEMBERG, J.. **Ethanol for a sustainable energy future.** Science, 2007.

GRONDONA, J.; KAUTTO, L.; TRAINI, M.; WILLOWS, R. D.; TE´O, J.; GERGQUIST, P.; NEVALAINEN, H.. **Proteome Mapping of the *Trichoderma reesei* 20S Proteasome.** Current Genetics. 51: 79-88, 2007.

HALL, M. et al. **Cellulose crystallinity – a key predictor of the enzymatic hydrolysis rate.** FEBS Journal, v. 277, n. 6, p. 1571-1582, 2010.

HAMES BR. **Biomass compositional analysis for energy applications.** Methods Mol Biol 581: 145-167,2009.

HAMMERSLEY, A. P. **FIT2D: an introduction and overview.** Grenoble: ERSF internal report 1997.

HARMAN, G. E.; LORITO, M.; LYNCH, J. M.. ***Trichoderma* spp. To alleviate or remediate soil and water pollution.** Advances in Applied Microbiology, v. 56, p. 313-330, 2004.

HENRISSAT, B. e BAIROCH, A. **New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities.** *The Biochemical journal*, v. 293 ( Pt 3, p. 781–8, 1993.

HENRISSAT, B.; DAVIES, G. J.. **Structural and sequence based classification of glycosyl hidrolases.** Current Opinion in Structural Biology. Vol. 7. 637-644, 1997.

HENRISSAT, B.; GLOSTER, T. M.; DAVIES, G. J.. **Recent structural insights into the expanding world of carbohydrate active enzymes.** Current Opinion in Structural Biology. Vol. 15, 637-645, 2005.

JENG, W.-Y. et al. **Structural and functional analysis of three [beta]-glucosidases from bacterium *Clostridium cellulovorans*, fungus *Trichoderma reesei* and termite *Neotermes koshunensis*.** Journal of Structural Biology, v. 173, n. 1, p. 46-56, 2010.

JENKINS, J.; LEGGIO, L. L.; HARRIS, G.; PICKERSGILL, R. (1995).  **$\beta$ -Glucosidase,  $\beta$ -galactosidase, 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.

JORGENSEN, H.; KRISTENSEN, J.; FELBY, C. **Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities.** Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr, v. 1, n. 2, p. 119-134, OCT 2007 2007. ISSN 1932-104X.

KAUR, J.; CHADHA, B. S.; KUMAR, B. A.; KAUR, G. S.; SAINI, H. S. (2007). **Purification and characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Melanocarpus* sp.** Eletronic Journal of Biotechnology 10: 260-270.

- KOBE, B.; GLEICHMANN, T.; TEH, T.; HEIERHORST, J.; KEMP, B. E. **Crystallization of protein kinases and phosphatases.** In: HARDIE D. G. (Ed.). Protein phosphorylation: a practical approach. 2<sup>nd</sup> Ed. Oxford: Oxford University Press. 1999. p.127-151.
- KOROTKOVA, O. G. et al. **Isolation and properties of fungal beta-glicosidases.** Biochemistry, v. 74, n. 5, p. 569-77, 2009.
- KUNST, A.; DRAEGER, B.; ZIEGENHORN, J. **Colorimetric methods with glucose oxidase and peroxidase.** In: BERGMAYER, H. U. et al (Ed.). Methods of enzymatic analysis. Deerfield Beach, Fla: Verlag Chemie, 1984. p.178-185.
- LAGAERT, S.; BELIEN, T.; VOLCKAERT, G. 2009. **Plant cell walls: Protecting the barrier from degradation by microbial enzymes.** Semin Cell Dev Biol 20: 1064-1073.
- LEE, R.L.; PAUL, J.W.; WILLEM, H.; VAN ZYL; ISAK, S.P. **Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology.** Microbiology and Molecular Biology Reviews, v.66., p.506-577, 2002.
- LESLIE, A. **Integration of macromolecular diffraction data.** Acta Crystallographica section D: biological crystallography, v. 55, n. Pt 10, p. 1696-702, 1999.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.. **Biotechnologia: Tecnologia das Fermentações.** São Paulo: Edgard Blucher, 1975, p. 1-18.
- LIMA, M. C. I.. **Produtos Naturais obtidos de Fungos: Atividade Biológica, Isolamento e Determinação Estrutural,** 2003. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. Exame de Qualificação de Doutorado.
- LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL W. H.; PRETORIUS, I. S. **Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology.** Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.
- MARANA, S. R. **Molecular basis of substrate specificity in family 1 glycoside hydrolases.** IUBMB Life – Critical Reviews. 2006 (58) 67-73.
- MARTINI, V. P. **Determinação e Estudos de Estruturas de Complexos Enzima-ligantes Relevantes à Biologia das Pteridinas em Parasitas: Base para o Desenvolvimento Racional de Drogas Terapêuticas contra Doenças do Sono.** Ponta Grossa, 2007.
- MARTINS, L.F.; KOLLING, D.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A.J.P.; RAMOS, L.P. **Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates.** Bioresource Technology, v.99, p.1417-1424, 2008.
- MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

- MATTHEWS, B. **Solvent content of protein crystals.** Journal of Molecular Biology, v. 33, n. 2, p. 491-7, 1968.
- McCOY, A. et al. **Phaser crystallographic software.** Journal of Applied Crystallography, v. 40, n. Pt 4, p. 658-674, 2007.
- McILVAINE, T. C. **A Buffer Solution for Colorimetric Comparison.** J. Biol. Chem. 1921, 49:183-186. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/49/1/183.citation>>. Acesso em: 17 out. 2013.
- McPHERSON, A. **Introduction to Macromolecular Crystallography.** New Jersey: Wiley-Liss, 2003. 237p.
- McREE, D. E. (1993). **Practical Protein Crystallography.** San Diego: Academic Press, 477p.
- MENEZES, M.; SILVA-HANLIN, D. M. W.. **Guia Prático para Fungos Fitopatogênicos.** Recife: Imprensa Universitária, 1993.
- MOHANRAM, S. et al. **Novel perspectives for evolving enzyme cocktails for lignocellulose hydrolysis in biorefineries.** Sustainable Chemical Processes, v. 1, n. 1, p. 15, doi:10.1186/2043-7129-1-15, 2013.
- MORAIS, S. A. L. D.; NASCIMENTO, E. A. D.; MELO, D. C. D. **Análise da madeira de *Pinus oocarpa* parte I: estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis.** Revista Árvore, v. 29, p. 461-470, 2005.
- MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. **Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass.** Bioresource Technology, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. **Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: Sugarcane bagasse.** Bioresource Technology, v.74, p.69-80, 2000.
- PEREIRA Jr., N.; BON, E. P. da S.; FERRARA, M. A. **Tecnologia de bioprocessos.** Série em Biotecnologia, 1ª. ed., vol. 1, Rio de Janeiro: UFRJ, 2008, 63p.
- RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para produção do etanol de segunda geração.** 2010. 447p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 2010.
- RAMOS, L. P. **Aproveitamento integral de resíduos agrícolas e agroindustriais.** Centro de Pesquisa em Química Aplicada UFPR 2001.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHCHORN, S. E. **Biologia vegetal.** 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- RESENDE, M. L.; OLIVEIRA, J. A.; GUIMARÃES, R. M.. **Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento.** Ciência Agronômica, v. 28 p. 793-798, 2004.

ROCHA, T. B. **Isolamento, identificação e caracterização enzimática de uma bactéria de fonte termal do Cerrado**. Disponível em: <[http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/7055/1/2010\\_Tiago%20BenolielRocha.pdf](http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/7055/1/2010_Tiago%20BenolielRocha.pdf)>. Acesso em: 28 set 2013.

RUBIN, E. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, v. 454, n. 7206, p. 841-845, 2008.

RUPP, B. **Physical Chemistry of Protein Crystallization**. Lectures notes of EMBL Practical Course on Protein Expression, Purification and Crystallization, 2000.

SÁNCHEZ, Ó. J.; CARDONA, C. A. **Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks**. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 13, p. 5270-5295, 2008.

SÁNCHEZ, C. **Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi**. *Biotechnology Advances*, v.27, p.185-194, 2009.

SCHLITTLER, L.A.F.S.; PEREIRA JR., N. **Produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósicos: pré-tratamento e estratégias de processamento**. *Diálogos e Ciência – Revista da Rede de Ensino FTC*. Ano II, n. 6, set, 2008.

SEABRA, J. E. A.; MACEDO, I. C. **Comparative analysis for power generation and ethanol production from sugarcane residual biomass in Brazil**. *Energy Policy*, v. 39, n. 1, p. 421-428, 2011.

STUDIER, F. W. **Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures**. *Prot. Exp. Pur.* 41, 207-234, 2005.

SVERGUN, D. I. **Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria**. *Malden: Journal of applied Crystallography*. 25: 495-503 p. 1992.

SVERGUN, D. I.; KOCH, M. H. J. **Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution**. *Reports Progress Physics*, v. 66, p. 1735 – 1782, 2003.

SVERGUN, D. I. **Small-angle X-ray and scattering as a tool for structural systems biology**. *Biological Chemistry*, v. 391, n. 7, p. 737-43, July 2010. ISSN 1437-4315.

TESTONI, F. M.. **Expressão, Purificação e Caracterização de Endo-arabinanase de *thermotoga petrophila***. Centro nacional de pesquisa em energia em materiais – CNPEM. Laboratório nacional ciência e tecnologia do bioetanol – CTBE. Disponível em:<<http://bolsasdeverao.cnpem.org.br/wpcontent/uploads/2010/08/RBV0132010.pdf>>. Acesso em: 10 março 2012.

TILBURG, A.; THOMAS, M.. **Production of Extracellular Proteins by the Fungus *Gliocladium virens***. Applied and Environmental Microbiology. 236-242, 1993.

TURNER, W. B.. **Commercially Important Secondary Metabolites**. In: SMITH, J. E.; BERRY, D. K. The Filamentous Fungi: Industrial Mycology, EUA: Hardcover, 1975. p. 122-142.

WANG, Q. et al. **Identification of the acid/base catalyst in *Agrobacterium faecalis* beta-glicosidase by kinetic analysis of mutants**. Biochemistry, v. 34, n. 44, p. 14554-62, 1995.

WHISSTOCK, J. C.; LESK, A. M. **Prediction of protein function from protein**. Quarterly Reviews of Biophysics, 2003. 36. (3) 307-340.

WYMAN, C. E. et al. **Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies**. Bioresource Technology, v. 96, n. 18, p. 1959-1966, 2005.

YOUNGCHANG K.; IRINA D.; MIN Z.; RUIYING W.; LOUR L.; PEARL Q.; GRAZYNA J.; OLGA K.; HUI L.; ANDRZEJ J.. **Automation of protein purification for structural genomics**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15263850>>. Acesso em 16 out. 2013.

YU H., ZENG G., HUANG H., XI X., WANG R., HUANG D., HUANG G., LI J. **Microbial community succession and lignocellulose degradation during agricultural waste composting**. Biodegradation 18:793–802. 2007.

ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. **Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies**. Biotechnology Advances, New York, v. 24, p. 452-481, 2006.

ZHUANG, J.; MARCHANT, M. A.; NOKES, S. E.; STROBEL, H. J. **Economic analysis of cellulase production methods for bio-ethanol**. Applied Engineering in Agriculture, v. 23, p. 679-687, 2007.

ZHOU S., INGRAM L.O. **Synergistic hydrolysis of carboxymethyl cellulose and acid-swollen cellulose by two endoglucanases (CelZ and CelY) from *Erwinia chrysanthemi***. J Bacteriol 182:5676–5682. 2000.

ZÚÑIGA, U. F. R. **Desenvolvimento de um bioprocesso para produção de celulasas específicas na cadeia produtiva do etanol de segunda geração**. 2010. (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.