

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

RENATA NOBREGA FLORINDO

**BETA-GLICOSIDASES DAS FAMÍLIAS GH 1 E GH 3:  
CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL, BIOQUÍMICA E  
MECANISMOS ESTRUTURAIS DE TRANSGLICOSILAÇÃO**

São Carlos

2015



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

RENATA NOBREGA FLORINDO

**BETA-GLICOSIDASES DAS FAMÍLIAS GH 1 E GH 3:  
CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL, BIOQUÍMICA E  
MECANISMOS ESTRUTURAIS DE TRANSGLICOSILAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia da  
Universidade Federal de São Carlos  
para obtenção do título de Doutor em  
Biotecnologia

Orientadores: Igor Polikarpov e Mirna H. R. Seleglim

São Carlos

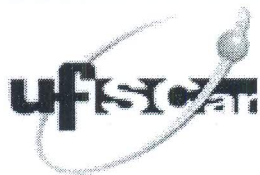
2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F637b Florindo, Renata Nobrega  
Beta-glicosidases das famílias GH 1 e GH 3 :  
caracterização estrutural, bioquímica e mecanismos  
estruturais de transglicosilação / Renata Nobrega  
Florindo. -- São Carlos : UFSCar, 2016.  
150 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São  
Carlos, 2016.

1. Biomassa lignocelulósica. 2. Beta-glicosidase.  
3. Atividade enzimática. 4. Hidrólise. 5.  
Transglicosilação. I. Título.



---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Renata Nobrega Florindo, realizada em 15/01/2016:

---

Profa. Dra. Mirna Helena Regali Seleglim  
UFSCar

---

Prof. Dr. Alessandro Silva Nascimento  
USP

---

Prof. Dr. Cesar Moises Camilo  
CTC

---

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa  
UFSCar

---

Prof. Dr. Francisco Eduardo Gontijo Guimarães  
USP



*à memória de minha filha Verônica... porque  
é por você, e será sempre por você, meu amor*





## *Agradecimentos*

*Ao meu orientador Prof. Dr. Igor Polikarpov pela orientação, apoio e compreensão.*

*À Prof. Dr. Mirna H. R. Selegim por ter aceitado ser minha orientadora.*

*Ao Prof. Dr. Alessandro S. Nascimento por ter me orientado, por ter aceitado o desafio de me ensinar cristalografia, por tirar todas as minhas dúvidas, mas acima de tudo por ter se tornado meu amigo. Obrigada por todos os cafés e todas as risadas.*

*Ao Prof. Dr. João Muniz por todo ensinamento em cristalografia.*

*Aos meus pais, Jorge e Maria Rosa por todo amor que dedicam a mim. Obrigada pelo apoio no momento em que mais precisei de colo.*

*Aos meus irmãos, Mônica e Felipe, meus grandes amores. Mônica, obrigada por toda sua admiração e por me mimar tanto. Felipe, meu anjinho, obrigada por conseguir arrancar sorrisos nos meus piores momentos.*

*Ao meu cunhado Junião pelas longas conversas pela madrugada e por todo carinho que tem por mim.*

*Ao meu gordinho Bernardo por sempre me fazer a tia mais feliz do mundo.*

*À minha sogra Ivelize e meu sogro Lourival por todo amor e carinho.*

*Ao meu marido Rafael Rothganger por toda a admiração, respeito e amor. Por ter passado comigo o dia mais difícil de nossa vida. Por me tornar a pessoa mais mimada. Por todas as risadas de todos os dias. Por fazer a minha vida tão leve e divertida. Por achar que sempre vou conseguir, não importando o que.*

*À minha filha Verônica que em seus 54 minutos de vida conseguiu me tornar uma pessoa melhor. Por ter me feito sentir todo o amor do mundo e ter me aproximado de pessoas tão maravilhosas.*

*À minha tia Ivone, que sem querer se tornou meu exemplo de força e determinação.*

*Aos meus tios Graça e Tiury que dedicaram todo amor e carinho a mim durante toda a vida.*

*À minha irmã Camila (Bond) por todo orgulho e amor que sente por mim.*

*Às minhas primas-irmãs Tais, Paula, Isabela, Luana e Carol por todas as risadas e conversas que melhoram meu dia.*

*À tia Lena, por me ensinar a levar a vida sempre rindo. Milena e Bruno por toda a diversão e amor quando estamos juntos.*

*Aos meus amigos Magda e Marcão por todas as risadas, noites de sexta-feira e por serem minha família em São Carlos. Amo vocês. Às agregadas Simoni, Danielle e Marilau porque só eu de mulher no grupo estava difícil.*

*Aos amigos da época de graduação Kelly, Roseane, Vanessa, Diogo e Bruno por todas as risadas e churrascos.*

*Ao Marcelo (Tavin), por ter aceitado o desafio de ensinar biologia para uma física e por todas as risadas e churrascos.*

*À Marisa Lima, por ter me ensinado sobre betas e purificação, a base desse trabalho.*

*Aos amigos Evandro Ares pelas risadas e cafés nos dias de medidas de Saxe e por toda a amizade, Marco Kadowaki por toda ajuda no começo do doutorado, Atilio Tomazini, Caio Reis e Bruno Mello por todos os momentos divertidos e troca de conhecimentos.*

*Aos amigos César Camilo por toda ajuda no laboratório, André Godoy, por tirar minhas dúvidas sobre refinamento e Danilo Evangelista por sempre me trazer informações realmente “relevantes”.*

*Aos técnicos Maria, Livia e Josimar por toda ajuda no laboratório.*

*Às grandes amigas que fizeram essa jornada valer a pena: Lis Miotto, Aline Nakamura, Melissa Espirito Santo e Grazielle Manin. Lis, com toda a sua ternura. Aline, que despertou tanto carinho em tão pouco tempo. Grazi, com seu jeito sarcástico mas fofo. Mel e todo seu jeitinho elétrico. Obrigada por fazerem meu dia melhor.*

*À Marina Ramia por ter sido a mais grata surpresa nesse tempo de doutorado. Obrigada por me mostrar a simplicidade das coisas (alguém tinha que me fazer ver energia de outra forma).*

*À Amanda Bernardes pela ajuda com a tese em tão pouco tempo, pela ajuda nos experimentos e em seus conceitos. Mas, o mais importante por ter se tornado uma grande amiga. Por ter me mostrado que chorar não é fraqueza, só é fofo demais.*

*À Vanessa Arnoldi porque...sabe Deus? Pois é, ele lembrou que eu precisava de você e te colocou no meu caminho. Obrigada por todas as broncas. Obrigada por se preocupar tanto comigo. Obrigada por todo amor que teve pela minha filha. Obrigada por absolutamente tudo.*

*À todos os colegas do grupo de Biotecnologia Molecular.*

*À PPGBIOTEC.*

*Ao IFSC pela infraestrutura.*

*À Capes pelo apoio financeiro.*

*Muito Obrigada!*

“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido.  
Agora é hora de compreender mais para temer menos.”

-Marie Curie (1867-1934)



## RESUMO

FLORINDO, R. N.  **$\beta$ -glicosidases das famílias GH 1 e GH 3: caracterização estrutural, bioquímica e mecanismos estruturais de transglicosilação.** 2015. Tese (Doutorado em Biotecnologia)-Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

A preocupação ambiental e com a qualidade de vida da população aliados com o esgotamento dos combustíveis fósseis, tem aumentado a busca por energias alternativas e sustentáveis. Neste contexto, a hidrólise da biomassa lignocelulósica é uma opção interessante para obtenção de bioetanol. A utilização de enzimas para conversão da biomassa lignocelulósica a açúcares fermentescíveis ainda é um processo de custo elevado, o que torna imprescindível os estudos de caracterização dos mecanismos dessas enzimas afim de torná-las economicamente mais viáveis. A reação catalisada por  $\beta$ -glicosidases é a última etapa da sacarificação da celulose, sendo de grande relevância na conversão da biomassa lignocelulósica.  $\beta$ -glicosidases hidrolisam terminais não reduzidos  $\beta$ -D-glicosil liberando  $\beta$ -D-glicose e GH 1 e GH 3 são as famílias dessas enzimas mais estudadas. Entretanto dados estruturais e funcionais das enzimas da família GH 3, ainda são escassos. O presente trabalho apresenta a caracterização bioquímica e estrutural de uma  $\beta$ -glicosidase de *Bifidobacterium adolescentis* (BaBgl). Essa enzima possui um domínio catalítico (CCD) e um domínio do tipo fibronectina III (FnIII) cuja função ainda é desconhecida. Os dados bioquímicos revelaram condições ótimas para atividade da enzima em pH entre 6,0 e 6,5, temperatura de 45 °C e especificidade pelo substrato sintético 4-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (pNPG). Os parâmetros cinéticos  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  apresentaram valores de  $0,32\pm 0,03$  mM e  $0,37\pm 0,01$  nmol/min respectivamente. A enzima não apresentou mecanismos de transglicosilação, indicando apenas atividade hidrolítica. Ensaio com monossacarídeos como xilose e galactose aumentaram significativamente a atividade enzimática enquanto que glicose e arabinose inibiram sua atividade. O modelo da estrutura cristalográfica da BaBgl revelou um domínio N-terminal enovelado como um barril TIM, um domínio intermediário na forma de sanduíche  $\alpha/\beta$  e um terceiro domínio C-terminal do tipo FnIII. Neste trabalho também foram estudados os mecanismos de transglicosilação de duas  $\beta$ -glicosidases de *Trichoderma harzianum* (ThBgl1 e ThBgl2), sendo que ambas realizam reação de transglicosilação, porém a ThBgl1 possui relação hidrólise/transglicosilação menor que a ThBgl2. As estruturas cristalográficas demonstram um enovelamento típico para as  $\beta$ -glicosidases da família GH 1, com o enovelamento na forma de um barril TIM ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>. Contudo, a ThBgl2 apresenta sítio ativo mais polar e portanto propício à interação com moléculas de água, favorecendo a reação de hidrólise quando comparada à ThBgl1.

Palavras chave: Biomassa lignocelulósica,  $\beta$ -glicosidase, atividade enzimática, hidrólise e transglicosilação.



## ABSTRACT

FLORINDO, R. N.  **$\beta$ -glucosidases of GH 1 and GH 3 families: Structural, biochemistry characterization and transglycosylation structural mechanisms.** 2015. Tese (Doutorado em Biotecnologia)-Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

The search for new sustainable alternative energy sources has followed the increasing concerns with common welfare and fossil fuel shortage. In this context, Bioethanol is a good option and lignocellulosic biomass is an interesting way of obtaining it. The enzymatic conversion of lignocellulosic biomass in fermentable sugars still is a costly process, which makes characterization mechanisms indispensable to make it economically viable. Being of great importance in the lignocellulosic biomass conversion,  $\beta$ -glucosidases catalyzed reaction is the last step in the saccharification processes. Beta glucosidase hydrolyze non-reduced  $\beta$ -D-glycoside terminals, releasing  $\beta$ -D-glucose. GH 1 and GH 3 are the families of those most studied enzymes. However, structural and functional data from this GH 3 family of enzymes are still scarce. This work aimed at the biochemical and structural characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Bifidobacterium adolescentis* (BaBgl). This enzyme has a catalytic domain (CCD) and a fibronectin III-like domain (FnIII) whose function is still unknown. Biochemical data showed optimal conditions for enzyme activity at pH from 6.0 to 6.5, temperature at 45 ° C and synthetic substrate specificity of 4-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (pNPG). The values of kinetic parameters,  $K_M$  and  $V_{max}$ , were  $0.32 \pm 0.03$  mM e  $0.37 \pm 0.01$  nmol/min, respectively. The enzyme doesn't have transglycosylation mechanisms, indicating only hydrolytic activity. Some monosaccharides such as xylose and galactose increased the enzyme activity significantly, while glucose and arabinose inhibited it. The crystal structural model of the BaBgl revealed an N-terminal domain with fold like a TIM barrel, an intermediate sandwich  $\alpha / \beta$  domain and a third C-terminal like FnIII domain. In this work we also studied the transglycosylation mechanisms of two  $\beta$ -glucosidases from *Trichoderma harzianum* (ThBgl1 and ThBgl2). Both enzymes exhibit transglycosylation reaction but the ThBgl1 showed a hydrolysis/transglycosylation ratio lower than the one for ThBgl2. Crystallographic structures shows a typical folding for GH family 1  $\beta$ -glucosidases, folding in the form of a TIM barrel ( $\alpha / \beta$ )<sub>8</sub>. However, ThBgl2 has a more polar active site and therefore, favors the interaction with water molecules, promoting better the hydrolysis reaction when compared to ThBgl1.

Keywords: Lignocellulosic biomass,  $\beta$ -glucosidase, enzymatic activity, hydrolysis and transglycosylation.





## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1-</b>	Representação estrutural da parede celular vegetal (Raven, 2001).....	<b>35</b>
<b>FIGURA 2-</b>	Estrutura da biomassa lignocelulósica. Representação dos principais componentes da parede celular vegetal: celulose cristalina, hemicelulose e lignina (Rubin, 2008).....	<b>36</b>
<b>FIGURA 3-</b>	Fórmula estrutural da celobiose e do polímero de celulose ( $C_6H_{10}O_5$ ) <sub>n</sub> . As setas indicam as ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares. Adaptado de (Morais, Nascimento, & Melo, 2005).....	<b>38</b>
<b>FIGURA 4-</b>	Distribuição da celulose amorfa e cristalina na microfibrila. A) Celulose com núcleo de estrutura cristalina envolvido pela parte amorfa. B) Celulose semi cristalina com regiões cristalinas e amorfas no mesmo sentido (Rabelo, 2010).....	<b>39</b>
<b>FIGURA 5-</b>	Estrutura dos monossacarídeos constituintes das hemiceluloses (Rabelo, 2010).....	<b>40</b>
<b>FIGURA 6-</b>	Estrutura da lignina (Vanholme et al., 2010).....	<b>41</b>
<b>FIGURA 7-</b>	Esquema do objetivo do pré-tratamento na biomassa lignocelulósica. Adaptado de (Mosier, 2005).....	<b>43</b>
<b>FIGURA 8-</b>	Imagem de MEV na superfície das fibras do bagaço da cana-de-açúcar antes e depois do tratamento. A) amostra não tratada, mostrando as fibras mais unidas. B) amostra tratada com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a 1% e NaOH 0,5% com fibras individuais mais aparentes. C) amostra tratada com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a 1% e NaOH 2% com as fibras mais independentes e não comprometidas estruturalmente. D) visão geral da degradação do bagaço com perda das fibras. Imagem de (Tsuchida et al., 2014).....	<b>44</b>
<b>FIGURA 9-</b>	Estrutura tridimensional das celulasas. CBM aderido à fibra de celulose. Um polímero formando o conector entre o CBM e o CCD. Adaptado de (Rabelo, 2010).....	<b>46</b>
<b>FIGURA 10-</b>	Esquema de hidrólise completa da celulose. A EGs clivam as regiões amorfas da celulose liberando extremidades redutoras e não redutoras. As CBHs hidrolizam essas extremidades	<b>47</b>

	liberando celobiose. As BGs clivam as celobioses liberando glicose. Adaptada de (Phitsuwan, Laohakunjit, Kerdchoechuen, Kyu, & Ratanakhanokchai, 2013).....	
<b>FIGURA 11-</b>	Mecanismos de catálise das Glicosil Hidrolases incluindo as BGs. Adaptado de (McCarter & Withers, 1994).....	<b>50</b>
<b>FIGURA 12-</b>	Estrutura de uma enzima da família GH 1. $\beta$ -glicosidase de <i>Zea mays</i> (código PDB: 1E1E). As cores seguem do azul para o vermelho, do domínio N para o C-terminal (Czjzek et al., 2001).....	<b>51</b>
<b>FIGURA 13-</b>	Estrutura de uma enzima da família GH 3. $\beta$ -glicosidase de <i>Kluyveromyces marxianus</i> (código PDB: 3ABZ). O domínio em amarelo é o domínio FnIII e em laranja o domínio PA14. Domínio N-terminal está em azul. $(\alpha/\beta)_6$ -sanduiche em verde (Yoshida et al., 2010).....	<b>53</b>
<b>FIGURA 14-</b>	Esquema de reações de catálise por $\beta$ -glicosidases. Rotas de hidrólise e rotas de transglicosilação. (E) = enzima. (Glc-NP) = para-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo. (Glc) = glicose. (NP) = para-nitrofenolato. (S1) = primeiro substrato. (S2) = segundo substrato. (P1) = primeiro produto formado. (P2) = segundo produto formado. Adaptado de (Frutuoso & Marana, 2013).....	<b>55</b>
<b>FIGURA 15-</b>	Eletoforese em gel SDS-PAGE. A) Primeira etapa de purificação. Coluna 1: marcador molecular de baixo peso (97 kDa a 14 kDa). Coluna 2: antes da indução. Coluna 3: após a indução. Coluna 4: <i>flow through</i> . Colunas 5 a 10: gradiente de concentrações de imidazol para lavagem e eluição da proteína (5, 10, 25, 50, 130 e 200 mM). B) Clivagem do domínio de TRX e cauda de histidina com TEV. Coluna1: marcador molecular de baixo peso (97 kDa a 14 kDa). Coluna 2: proteína antes da clivagem. Coluna 3 e 4: proteína sem TRX e sem cauda de histidina. C) Terceira etapa de purificação por cromatografia de exclusão molecular. Colunas 1 a 10: frações de proteína eluída.....	<b>85</b>

<b>FIGURA 16-</b>	Fluorimetria de Diferencial de Varredura. A) Variação do T <sub>m</sub> em função do pH. B) Variação do T <sub>m</sub> em função da concentração de NaCl.....	<b>86</b>
<b>FIGURA 17-</b>	Gráfico obtido pela análise de ThermoFluor que apresenta a variação da temperatura de Melting (T <sub>m</sub> ) da enzima BaBgl dependente das diferentes condições tamponantes. Marcados em vermelho estão os tampões que apresentaram as melhores condições.....	<b>87</b>
<b>FIGURA 18-</b>	Gráfico de thermofluor de variação do T <sub>m</sub> da enzima BaBgl com adição de aditivos. Marcados em vermelho, os metais que resultaram em aumento e perda mais significativas da T <sub>m</sub> .....	<b>88</b>
<b>FIGURA 19-</b>	Gráfico de <i>thermofluor</i> de variação do T <sub>m</sub> da enzima Babgl com adição de monossacarídeos.....	<b>88</b>
<b>FIGURA 20-</b>	Espectro de dicroísmo circular (CD) da Babgl a 20 °C e a 90 °C.....	<b>89</b>
<b>FIGURA 21-</b>	Perfil de desnaturação térmica da Babgl em comprimentos de onda de 208 e 222 nm, indicando sinal de alfa-hélice.....	<b>90</b>
<b>FIGURA 22-</b>	Perfil de desnaturação térmica da Babgl em comprimento de onda de 245 nm, indicando sinal de folhas betas.....	<b>90</b>
<b>FIGURA 23-</b>	Cromatograma, com absorbância de 280 nm, das purificações das misturas das proteínas padrão. Mistura A: ferritina + conalbumina + anidrase carbônica + ribonuclease. Mistura B: aldose e ovoalbumina. Bluedextran. Os volumes de eluição de cada uma estão marcados acima dos picos.....	<b>92</b>
<b>FIGURA 24-</b>	A) curva de calibração da coluna <i>Superdex 200 16/60</i> utilizando proteínas padrão. B) cromatograma de purificação da Babgl com seu respectivo volume de eluição.....	<b>93</b>
<b>FIGURA 25-</b>	Curva padrão de glicose para calcular quantidade de produto liberado em ensaios enzimático que utilizam celobiose como substrato.....	<b>94</b>
<b>FIGURA 26-</b>	Curva padrão de pNP utilizada para calcular quantidade de produto liberado em reações que utilizam substratos sintéticos	<b>95</b>

como p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo, 4-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo, 4-nitrofenil- $\beta$ -D-celobiosídeo, 4-nitrofenil- $\beta$ -D-fucopiranosídeo, 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo, 2-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo, 4-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo e 4-nitrofenil- $\alpha$ -L-rhamnopiranosídeo.....

- FIGURA 27-** Perfil de dependência da atividade relativa da enzima com a variação de pH..... **96**
- FIGURA 28-** Perfil de dependência da atividade relativa da enzima com a variação de temperatura..... **96**
- FIGURA 29-** Atividade residual da enzima Babgl. Valores apresentados em termos de atividade relativa por tempo de incubação da enzima em minutos. Tampões utilizados para incubação foram os apresentados na tabela 3..... **97**
- FIGURA 30-** Atividade relativa da Babgl em pNPG com a presença de 5 mM de íons metálicos e 2% de EDTA..... **99**
- FIGURA 31-** A) Substratos sintéticos utilizados para testar a especificidade da Babgl: : 4-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo, 4-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo, 4-nitrofenil- $\beta$ -D-celobiosídeo, 4-nitrofenil- $\beta$ -D-fucopiranosídeo, 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo, 2-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo, 4-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo e 4-nitrofenil- $\alpha$ -L-rhamnopiranosídeo B) Atividade relativa da Babgl em substratos sintéticos..... **100**
- FIGURA 32-** Curva de Michelis-Menten para a Babgl. Velocidade de formação de produto, pNP, por variação de concentração do substrato, pNPG..... **102**
- FIGURA 33-** Curva de Michaelis-Menten com variação da velocidade de formação do produto, pNP, por variação da concentração de substrato, pNPG, para diferentes incubações da reação com glicose (variando de 0 a 28 mM). Quadrado preto: curva de cinética sem glicose. Círculo vermelho: curva de cinética com 3,5 mM de glicose. Triângulo azul: curva de cinética com 7 mM de glicose. Triângulo invertido magenta: curva de cinética com 14 mM de glicose. Losango verde: curva de cinética com 21 **103**

	mM de glicose. Triângulo azul marinho: curva de cinética com 28 mM de glicose.....	
<b>FIGURA 34-</b>	Plotes inversos da velocidade de reação da enzima por concentração de pNPG, para cada concentração de glicose. Em azul escuro, dados sem glicose. Em vermelho, dados com 3,5 mM de glicose. Em verde, dados com 7 mM de glicose. Em roxo, dados com 14 mM de glicose. Em azul claro, dados com 21 mM de glicose. Em laranja, dados com 28 mM de glicose....	<b>104</b>
<b>FIGURA 35-</b>	Representação gráfica dos valores de $K_M/V_{máx}$ variando em função da concentração de glicose. O dado em vermelho foi obtido através da extrapolação da reta.....	<b>105</b>
<b>FIGURA 36-</b>	Cinética enzimática. Gráfico de velocidade de formação de produto, pNP e glicose, por concentração de substrato. Em preto, a formação de pNP. Em vermelho, a formação de glicose.....	<b>106</b>
<b>FIGURA 37-</b>	Efeito de inibição/ativação de monossacarídeos, em diferentes concentrações (0 a 1M), sobre a atividade da BaBgl em pNPG. Círculo preto: glicose. Quadrado vermelho: galactose. Triângulo azul: arabinose. Triângulo invertido verde: manose. Triângulo magenta: frutose. Triângulo amarelo: xilose. Losango azul marino: glicanolactona.....	<b>108</b>
<b>FIGURA 38-</b>	Atividade da BaBgl sobre pNPG variando com o tempo de reação para cada tempo de incubação da enzima pura e com ligante. Losango azul: Babgl pura. Quadrado vermelho: Babgl com 1 M de glicose. Triângulo verde: Babgl com 1 M de galactose.....	<b>109</b>
<b>FIGURA 39-</b>	Atividade residual com enzima incubada a 45 °C e temperatura de reação a 30 °C. A enzima foi incubada pura (azul), com galactose (amarelo), glicose (azul), xilose (cinza), ácido glucônico (verde) e glicerol (vermelho).....	<b>110</b>
<b>FIGURA 40-</b>	Cristal obtido para a proteína BaBgl.....	<b>113</b>
<b>FIGURA 41-</b>	Estrutura cristalográfica da enzima Babgl. Os três domínios estão representados nas cores azul (N-terminal), amarelo	<b>115</b>

	(domínio $\alpha/\beta$ ) e laranja (FNIII). Uma molécula de glicerol co-cristalizada no sítio ativo está mostrada em verde.....	
<b>FIGURA 42-</b>	Superposição das estruturas cristalográficas das $\beta$ -glicosidases de <i>B. adolescentis</i> (Babgl), <i>K. marxianus</i> (3ABZ), <i>S. venezuelae</i> (4I3G), <i>T. neapolitana</i> (2X42), e <i>T. reesei</i> (3ZZ1). O domínio catalítico é mostrado na porção esquerda da figura com a molécula de glicerol (co-cristalizada com Bablg) mostrada em sticks amarelo. O domínio $\alpha/\beta$ está na porção direita ao fundo. O domínio FN3 está mostrado na porção superior e o domínio adicional PA14, presente em algumas estruturas está mostrado na porção direita à frente. As estruturas estão coloridas por elemento de estrutura secundária. As estruturas dos loops foram suavizadas para facilitar a visualização.....	<b>117</b>
<b>FIGURA 43-</b>	Comparação da BaBgl com enzimas de funções diversas, como $\beta$ -D-glucano glicohidrolase (PDB 1IEW), <i>Hordeum vulgare</i> , NagZ de <i>Bacillus subtilis</i> (PDB 4GYJ) e $\beta$ -N-acetil-hexosaminidase de <i>Beuternergia cavernae</i> (PDB 5BU9).....	<b>118</b>
<b>FIGURA 44-</b>	Comparação estrutural da enzima Babgl com a a enzima exoP de <i>Pseudoalteromonas</i> sp.....	<b>119</b>
<b>FIGURA 45-</b>	Configurações de uma molécula de glicose no sítio ativo.....	<b>120</b>
<b>FIGURA 46-</b>	Aminoácidos responsáveis pelo mecanismo de catálise da BaBgl.....	<b>121</b>
<b>FIGURA 47-</b>	Análise de uma molécula de glicerol na estrutura da BaBgl.....	<b>122</b>
<b>FIGURA 48-</b>	Gel SDS-PAGE da purificação do domínio catalítico (CCD) da Babgl. Coluna 1: marcador de baixo peso molecular de 97 a 14 kDa. Coluna 2: <i>flow through</i> . Coluna 3, 4, 5 e 6: lavagem com 5, 10, 25 e 50 mM de imidazol. Coluna 7, 8 e 9: eluição com: 100, 130 e 200 mM de imidazol.....	<b>125</b>
<b>FIGURA 49-</b>	Gel SDS-PAGE da purificação do domínio de fibronectina tipo III (FnIII) da Babgl. Coluna 1: <i>flow through</i> . Coluna 2, 3, 4 e 5: lavagem com 5, 10, 25 e 50 mM de imidazol. Coluna 6:	<b>125</b>

- marcador de baixo peso molecular de 97 a 14 kDa. Coluna 7, 8 e 9: eluição com: 100, 130 e 200 mM de imidazol.....
- FIGURA 50-** Gel SDS-PAGE dos testes de pull down da Babgl inteira. **A) reação com lignina:** Coluna1) marcador de baixo peso molecular (97 a 14 kDa). Coluna 2: Babgl antes da reação com os três substratos. Coluna3: sobrenadante da reação. Colunas 4 e 5: sobrenadante das lavagens da lignina. **B) reação com Avicel.** Coluna1) marcador de baixo peso molecular (97 a 14 kDa). Coluna 2: sobrenadante da reação. Colunas 3, 4 e 5: sobrenadante das lavagens do Avicel. **C) reação com papel filtro.** Coluna1) marcador de baixo peso molecular (97 a 14 kDa). Coluna 2: sobrenadante da reação. Colunas 3, 4 e 5: sobrenadante das lavagens do papel filtro..... **126**
- FIGURA 51-** Gel SDS-PAGE dos testes de pull down do domínio catalítico (CCD) da Babgl. **A) reação com lignina:** Coluna1) marcador de baixo peso molecular (97 a 14 kDa). Coluna 2: CCD antes da reação com os tres substratos. Coluna3: sobrenadante da reação. Colunas 4 e 5: sobrenadante das lavagens da lignina. **B) reação com Avicel.** Coluna1) marcador de baixo peso molecular (97 a 14 kDa). Coluna 2: sobrenadante da reação. Colunas 3, 4 e 5: sobrenadante das lavagens do Avicel. **C) reação com papel filtro.** Coluna1) marcador de baixo peso molecular (97 a 14 kDa). Coluna 2: sobrenadante da reação. Colunas 3 e 4: sobrenadante das lavagens do papel filtro..... **127**
- FIGURA 52-** Gel SDS-PAGE dos testes de pull down do domínio de fibronectina III (FnIII) da Babgl na reação com lignina. Coluna1) marcador de baixo peso molecular (97 a 14 kDa). Coluna 2: FnIII antes da reação com lignina. Coluna3: sobrenadante da reação. Colunas 4 e 5: sobrenadante das lavagens da lignina..... **128**
- FIGURA 53-** Atividade relativa da Babgl inteira e do CCD contra pNPG e celobiose..... **129**

- FIGURA 54-** Estrutura cristalográfica da enzima ThBgl1 (azul) e ThBgl2 (laranja) superpostas pelos seus C $\alpha$ . A seta na figura à esquerda indica a inserção do loop envolvendo os aminoácidos 198-202 na enzima ThBgl2. A seta na figura à direita indica a região do sítio ativo..... **133**
- FIGURA 55-** Interações do sítio glicona com a estrutura das enzimas ThBgl1 e ThBgl2..... **133**
- FIGURA 56-** Potencial eletrostático (no vácuo) para a superfície das enzimas ThBgl1 (esquerda) e ThBgl2 (direita). As cores variam de azul a vermelho indicando um potencial com maior densidade de cargas positivas e negativas, respectivamente.... **134**



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b>	Tabela 1: Descrição do meio auto-indutor: componentes das soluções expressas em quantidades ou concentrações (Studier, 2005).....	<b>63</b>
<b>Tabela 2-</b>	Componentes do tampão de lise.....	<b>64</b>
<b>Tabela 3-</b>	Relação dos tampões de incubação da enzima. pH dos tampões e temperatura de incubação da enzima nos tampões.....	<b>72</b>
<b>Tabela 4-</b>	Quantidade de resíduos de aminoácidos que compõem a sequência da proteína. Dados tirados do programa online ExPASy/ProtParam.....	<b>82</b>
<b>Tabela 5-</b>	Valores de massa molecular (MW), volumes de eluição ( $V_e$ ) obtidos a partir dos cromatogramas da figura 23 e valores de $K_{av}$ calculados pela equação 1 das proteínas padrão.....	<b>93</b>
<b>Tabela 6-</b>	Valores de $K_M$ e $V_{m\acute{a}x}$ obtidos através das curvas de Michaeli-Menten da figura 33 para cada concentração de glicose.....	<b>103</b>
<b>Tabela 7-</b>	Estatísticas do processamento e refinamento da estrutura da BaBgl.....	<b>114</b>
<b>Tabela 8-</b>	Estatísticas do processamento e refinamento da estrutura da enzima BaBgl com glicose.....	<b>123</b>
<b>Tabela 9-</b>	Estatísticas do processamento e refinamento das estruturas das enzimas ThBgl1 e ThBgl2.....	<b>131</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>BGL</b>	$\beta$ -glicosidase
<b>BaBgl</b>	$\beta$ -glicosidase de <i>Bifidobacterium adolescentis</i>
<b>CCD</b>	Domínio catalítico
<b>CD</b>	Dicroísmo circular
<b>DSF</b>	Fluorimetria Diferencial de Varredura
<b>FnIII</b>	Fibronectina tipo III
<b>GH</b>	Glicosil Hidrolase
<b>Glc</b>	Glicose
<b>HPLC</b>	<i>High-performance liquid chromatography</i>
<b>IMAC</b>	<i>Immobilized Metal ion Affinity Chromatography</i>
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>LIC</b>	Clonagem independente da ligação
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>PEG</b>	Polietilenoglicol
<b>pNP</b>	4-nitrofenol
<b>pNPG</b>	4-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo
<b>SDS-PAGE</b>	<i>Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide Gel Eletrophoresis</i>
<b>TEV</b>	Vírus <i>Tobacco Etch</i>
<b>ThBgl1</b>	$\beta$ -glicosidase de <i>Trichoderma harzianum</i> 1
<b>ThBgl2</b>	$\beta$ -glicosidase de <i>Trichoderma harzianum</i> 2
<b>TRX</b>	Tiorredoxina
<b>mL</b>	mililitros
<b>mg</b>	miligramas
<b>°C</b>	graus Celcius
<b>rpm</b>	rotações por minuto
<b>L</b>	litro
<b>nm</b>	nanômetros
<b>pH</b>	potencial hidrogeniônico
<b>M</b>	molar
<b>mM</b>	milimolar
<b><math>\mu</math>g</b>	micrograma

<b>kDa</b>	quilodalton ( $10^3 \text{ g mol}^{-1}$ )
<b>T<sub>M</sub></b>	temperature de melting
<b>min</b>	minutos
<b>cm</b>	centímetros
<b>V<sub>e</sub></b>	volume de eluição
<b>V<sub>0</sub></b>	volume morto
<b>K<sub>av</sub></b>	coeficiente de partição
<b>V<sub>t</sub></b>	volume total da coluna
<b>μL</b>	microlitros
<b>nmol</b>	nanomol
<b>μmol</b>	micromol
<b>V<sub>máx</sub></b>	velocidade máxima
<b>K<sub>M</sub></b>	constante de Michaelis-Menten
<b>K<sub>cat</sub></b>	constante catalítica
<b>λ</b>	comprimento de onda
<b>Å</b>	angstrom
<b>kV</b>	quilovolts
<b>mA</b>	miliampére
<b>°</b>	grau
<b>K</b>	kelvin
<b>mm</b>	milimetro

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO</b>	<b>31</b>
1.1. BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	35
1.2. COMPONENTES DA PAREDE CELULAR VEGETAL: CELULOSE, HEMICELULOSE E LIGNINA	37
1.3. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	41
1.4. CELULASES	44
1.5. $\beta$ -GLICOSIDASE	48
1.5.1. MECANISMOS DE CATÁLISE DAS $\beta$ -GLICOSIDASES	49
1.5.2. GLICOSIL HIDROLASES (GH)	50
1.5.2.1. GH 1	50
1.5.2.2. GH 3	51
1.5.2.2. OUTRAS FAMÍLIAS DE GHS COM ATIVIDADE $\beta$ -GLICOSIDASE	53
1.5.3. TRANSGLICOSILAÇÃO	54
<b>CAPÍTULO 2: OBJETIVOS</b>	<b>57</b>
2.1. OBJETIVO GERAL	58
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	58
<b>CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>61</b>
3.1. CLONAGEM E TRANSFORMAÇÃO DA BaBgl	62
3.2. EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM <u>ESCHERICHIA COLI</u>	62
3.3. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA	64
3.3.1. EXTRAÇÃO DA PROTEÍNA	64
3.3.2. PRIMEIRO PASSO DE PURIFICAÇÃO: CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE	64
3.3.3. CLIVAGEM DA TIORREDOXINA E SEGUNDO PASSO DE PURIFICAÇÃO: CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE	65
3.3.4. TERCEIRO PASSO DE PURIFICAÇÃO: CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR MASSA MOLECULAR	66
3.4. FLUORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSF)	67
3.5. EXPERIMENTO DE DICROÍSMO CIRCULAR	68
3.6. GEL FILTRAÇÃO ANALÍTICA	69
3.7. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA BaBgl	70
3.7.1. CURVA PADRÃO DE pNP E GLICOSE	70

3.7.2. DETERMINAÇÃO DE PH E TEMPERATURA ÓTIMAS DE ATIVIDADE DA BaBgl	70
3.7.3. ATIVIDADE RESIDUAL	72
3.7.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA EM CELOBIOSE E pNPG	73
3.7.5. INFLUÊNCIA DE ÍONS METÁLICOS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	73
3.7.6. ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM DIFERENTES SUBSTRATOS	74
3.7.7. CINÉTICA ENZIMÁTICA	74
3.7.8. CINÉTICA ENZIMÁTICA COM INIBIDOR	75
3.8. TESTES DE TRANSGlicosILAÇÃO	75
3.9. INFLUÊNCIA DE MONOSSACARÍDEOS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	76
3.10. DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA DA PROTEÍNA	76
3.10.1. CRISTALIZAÇÃO DA PROTEÍNA	76
3.10.2. COLETA DE DADOS E DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA	77
3.11. AVALIAÇÃO EXPLORATÓRIA DA FUNÇÃO DO DOMÍNIO DE FIBRONECTINA	78
3.11.1. CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS DOMÍNIOS SEPARADOS DA BaBgl	78
3.11.2. TESTES DE PULL DOWN	78
3.11.3. ENSAIOS ENZIMÁTICOS COMPARATIVOS ENTRE A BaBgl INTEIRA E O DOMÍNIO CCD	79
3.12. REFINAMENTO E ANÁLISE ESTRUTURAL DE DUAS $\beta$ -GLICOSIDASES DA FAMÍLIA GH 1 (ThBgl1 e ThBgl2)	80
<b>CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>81</b>
4.1. CLONAGEM E TRANSFORMAÇÃO	82
4.2. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA BaBgl	83
4.3. ANÁLISE DA ESTABILIDADE TÉRMICA DA BaBgl	85
4.3.1. FLUORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSF)	85
4.3.2. ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR (CD)	89
4.4. ANÁLISE DO ESTADO OLIGOMÉRICO DA BABGL EM SOLUÇÃO	91
4.5. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA BaBgl	94

4.5.1. CURVA PADRÃO PARA OS EXPERIMENTOS DE ENSAIOS DE ATIVIDADE	94
4.5.2. DETERMINAÇÃO DE PH E TEMPERATURA ÓTIMA	95
4.5.3 ATIVIDADE RESIDUAL DA Babgl	96
4.5.4. ATIVIDADE ESPECÍFICA DA ENZIMA EM pNPG	98
4.5.5. INFLUÊNCIA DE ÍONS METÁLICOS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	98
4.5.6. ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM DIFERENTES SUBSTRATOS	99
4.5.7. CINÉTICA ENZIMÁTICA	101
4.5.7.1. DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICAS COM VARIAÇÃO DE pNPG	101
4.5.7.2. CALCULO DA CONSTANTE DE INIBIÇÃO POR GLICOSE	102
4.6. TESTE DE TRANGLICOSILAÇÃO	105
4.7. INFLUÊNCIA DE MONOSSACARÍDEOS NA ATIVIDADE DA Babgl	107
4.7.1. ATIVIDADE RESIDUAL DA BABGL COM DIFERENTES LIGANTES	108
4.8. ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DA ENZIMA BaBgl	113
4.8.1 ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DA ENZIMA BaBgl	113
4.8.2. SÍTIO ATIVO	119
4.8.3. INTERAÇÃO COM O GLICEROL	122
4.9. AVALIAÇÃO EXPLORATÓRIA DA FUNÇÃO DO DOMÍNIO DE FIBRONECTINA	124
4.9.1. CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS DOMÍNIOS SEPARADOS DA BaBgl	124
4.9.2. TESTES DE PULL DOWN	126
4.9.3. ENSAIOS ENZIMÁTICOS COMPARATIVOS ENTRE A BaBgl INTEIRA E O DOMÍNIO CCD	128
4.10 REFINAMENTO E ANÁLISE ESTRUTURAL DE DUAS $\beta$ -GLICOSIDASES DA FAMÍLIA GH 1.	129
4.10.1. $\beta$ -GLICOSIDASES DA FAMÍLIA GH 1	129
4.10.2. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS ENZIMAS ThBgl1 E ThBgl2 E MECANISMOS DE TRANSGlicosILAÇÃO	131

<b>CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b>	<b>137</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>141</b>



Capítulo 1

Introdução

---

Nos últimos anos tem surgido um grande interesse mundial em pesquisas de técnicas capazes de promover o desenvolvimento sustentável. O objetivo principal é a geração cada vez menor de resíduos, efluentes tóxicos e a menor liberação de gases tóxicos ao meio ambiente. Além disso, para garantir a melhor qualidade de vida da população e solucionar o esgotamento das reservas de petróleo, maior componente da matriz energética mundial, torna-se essencial a busca por formas alternativas de energia.

A preocupação da sociedade civil e das autoridades governamentais com os subprodutos tóxicos gerados pelas indústrias tornou-se evidente nos últimos anos. As cobranças sobre as indústrias químicas são no sentido de aprimorar o desenvolvimento de processos que sejam cada vez menos prejudiciais ao meio ambiente. A emissão de contaminantes pode ser minimizada através de reagentes alternativos apropriados, a utilização de catalisadores para facilitar a separação do produto final da mistura e reciclagem dos reagentes e catalisadores utilizados nos processos. Essa nova área da química que tem a preocupação de criar tecnologias e processos que poluam menos o meio ambiente é a *Química Verde*. Entre as técnicas estudadas na área de química verde a biocatálise tem sido bastante estudada. A biocatálise envolve o emprego de enzimas para a catálise de reações. Possuem muitas vantagens se comparadas às reações com reagentes químicos, incluindo a alta quimiosseletividade além da realização de reações que dificilmente poderiam ser simuladas por técnicas de síntese orgânica convencional (Dalby, 2007).

O petróleo, o carvão mineral e o gás natural representam atualmente quase 90% da energia mundial utilizada, segundo dados da *BP Statistical Review of World Energy*. A queima desses combustíveis é responsável por mais de 70% das emissões de CO<sub>2</sub>. Neste sentido, o objetivo é desenvolver métodos que contenham a emissão de gases responsáveis pelo efeito estufa. As fontes renováveis de energia podem ser uma solução para a diminuição do aquecimento global gerado pelo uso de combustíveis fósseis. Dentro desse contexto os biocombustíveis, em especial o etanol vêm sendo estudado como alternativa ao problema, já que pode ser usado como um substituto do petróleo, principalmente como combustível para alguns meios de transporte. O etanol representa um combustível que pode reduzir de 90 a 100% a emissão de gases causadores do efeito estufa (especialmente o CO<sub>2</sub>), uma vez que o crescimento da planta retira da atmosfera quantidades importantes deste gás como

fonte de carbono. Porém o uso de etanol de primeira geração esbarra no problema da competição com a demanda mundial de alimentos (Chundawat, Beckham, Himmel, & Dale, 2011). Nesse cenário, o aproveitamento dos resíduos lignocelulósicos provenientes de diversos setores agrícolas e industriais é apontado como uma alternativa viável e extremamente interessante.

Dados obtidos a partir da Empresa de Pesquisa Energética (EPE)<sup>1</sup> mostram que as fontes renováveis constituem 42,4% da matriz energética brasileira (dados de 2012), enquanto no mundo este percentual é de apenas 13,2%. Dentre as fontes de energia renovável no país destacam-se biomassa de cana-de-açúcar (15,4%) e a hidráulica (13,8%). Os dados da EPE mostram que o Brasil se destaca no uso de fontes renováveis. No entanto, o mesmo documento ainda demonstra que o etanol correspondeu a apenas 4,2% do consumo final de energia por fonte no ano de 2012, o que é um consumo tímido, próximo a outras fontes, como o óleo diesel (18,3%), a gasolina (9,7%) e o gás natural (7,2%). Curiosamente, o bagaço da cana-de-açúcar representa um consumo de energia por fonte maior que o próprio etanol (11,2%). Atualmente o bagaço da cana é tipicamente queimado para a produção de energia nas usinas. Estes dados levantados pela EPE demonstram que o etanol ainda é uma fonte de energia com consumo tímido no país. Dentre outros fatores, o custo de produção do etanol ainda é um problema no cenário brasileiro.

A vantagem do uso da biomassa lignocelulósica é que esse material apresenta uma alternativa de substrato renovável, de baixo custo, sustentável e principalmente por ser considerada uma fonte quase neutra de emissão de carbono no meio ambiente. Muitos materiais lignocelulósicos têm sido testados para a produção de bioetanol entre eles o bagaço da cana-de-açúcar, palha de milho, palha de trigo, casca de arroz, cevada, resíduos de celulose entre outros. Porém os monossacarídeos disponíveis na biomassa não estão em fácil acesso para a bioconversão (Cardona, Quintero, & Paz, 2010).

Para a produção do bioetanol a partir da biomassa lignocelulósica, é necessário 'desconstruir' os componentes da parede celular vegetal até a formação de açúcares que possam ser fermentados. No caso da cana-de-açúcar e de gramíneas de forma geral, o principal componente da parede celular é a celulose.

---

<sup>1</sup> <http://www.epe.gov.br/>

Neste caso, a estratégia baseia-se na degradação da celulose até o seu componente primário, a glicose, para que esta possa ser posteriormente fermentada levando à produção de etanol.

São quatro as etapas importantes para a obtenção do bioetanol através da biomassa lignocelulósica: o pré-tratamento e a desconstrução da biomassa, a hidrólise enzimática dos polissacarídeos, a fermentação do hidrolisado e a destilação e obtenção do etanol. A hidrólise enzimática vem se apresentando como o caminho mais promissor para a desconstrução ou sacarificação dos componentes da parede celular vegetal. Porém, a técnica caminha com o progresso do pré tratamento, uma vez que este aumenta a porosidade da biomassa, facilitando o acesso à celulose.

A hidrólise enzimática parece ser mais eficiente quando comparada a hidrólise ácida, pois ocorre em condições com baixas demandas de energia e pode atingir 100% de eficiência na hidrólise. Os processos de hidrólise ácida podem levar a formação de subprodutos que degradam os polissacarídeos, diminuindo a eficiência do processo de fermentação, além de demandar o uso de equipamentos caros e resistentes à corrosão (Rabelo, 2010). Muitos coquetéis enzimáticos têm sido produzidos e estudados para o processo de hidrólise. Estes coquetéis são compostos por enzimas genericamente denominadas celulases, que são biocatalisadores capazes de hidrolisar a celulose em açúcares simples. Porém a produção e a purificação dessas enzimas, tipicamente produzidas por microorganismos, ainda é um processo de alto custo, o que limita a aplicação desta biotecnologia em processos produtivos para a produção do etanol celulósico. A descoberta de novos biocatalisadores eficientes e que possam ser produzidos e purificados com custos reduzidos justifica o interesse pelo estudo destas enzimas.

Esta tese apresenta o resultado dos estudos realizados com enzimas conhecidas como  $\beta$ -glicosidases, que são as enzimas que catalisam a última etapa para a produção da glicose a partir da celulose. Neste projeto, foram realizadas as caracterizações estrutural e bioquímica de uma  $\beta$ -glicosidase de *Bifidobacterium adolescentis* (BaBgl) e duas  $\beta$ -glicosidases de *Trichoderma harzianum* (ThBgl1 e ThBgl2). Nas seções a seguir neste capítulo serão feitas revisões bibliográficas sobre a hidrólise da biomassa e sobre  $\beta$ -glicosidases. No capítulo 2, serão descritos os objetivos específicos deste projeto. No capítulo 3, a descrição dos materiais e

métodos utilizados na realização dos experimentos. No capítulo 4, a análise e discussão dos resultados. E finalmente, no capítulo 5 a conclusão desse trabalho.

## 1.1. BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Biomassa lignocelulósica é definida como qualquer matéria de origem vegetal que possui componentes energéticos e que pode ser processada para fornecer formas bioenergéticas. Como exemplos de biomassa, podemos citar os resíduos agrícolas e agroindustriais, resíduos florestais, resíduos orgânicos (que podem ser convertidos em biocombustíveis como o bioetanol e o biodiesel). Vários estudos têm sido feitos para viabilizar a conversão da celulose para produção de biocombustíveis. A resistência natural ao ataque de microrganismos tem sido a principal barreira da hidrólise enzimática (Popper, 2008).

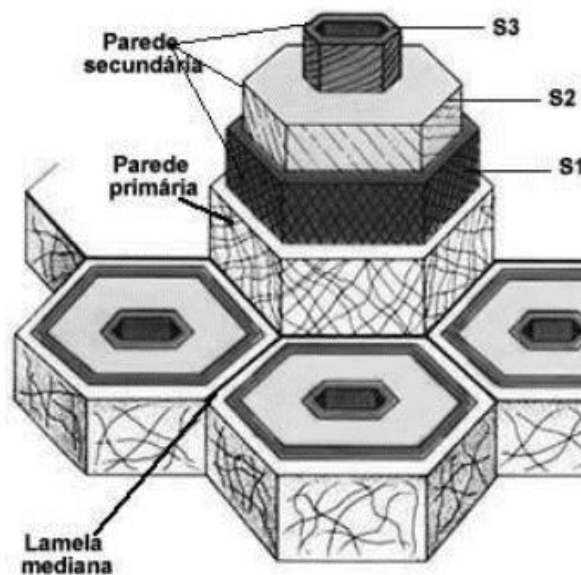


Figura 1: Representação estrutural da parede celular vegetal. Lamela mediana, parede primária e parede secundária (S1, S2 e S3). (Raven, 2001).

A parede celular vegetal é composta em três camadas principais: lamela mediana, parede celular primária e parede celular secundária. A lamela mediana é uma fina camada que separa os dois núcleos, mantendo a integridade do tecido

vegetal. Ela é formada logo após a mitose. Em seguida a parede celular primária é depositada e continua ao longo do crescimento e expansão da célula. A parede celular primária é a fonte mais abundante de material lignocelulósico, pois a maioria do carbono fixado fotossinteticamente é incorporado aos polímeros da parede celular vegetal (Balat, 2011). A parede celular secundária é a principal resistência mecânica da parede celular e é depositada na etapa final do crescimento celular. Contem três camadas distintas, S1, S2 e S3, que diferem entre si quanto a espessura, a composição e orientação das fibras (figura 1). A camada mais exterior S1 e a mais interior S2 possuem fibras orientadas de maneira transversal. A camada intermediária S2 possui fibras orientadas longitudinalmente em relação ao comprimento da célula. Esta orientação fornece à célula grande resistência à tensão e compressão (Balat, 2011) .

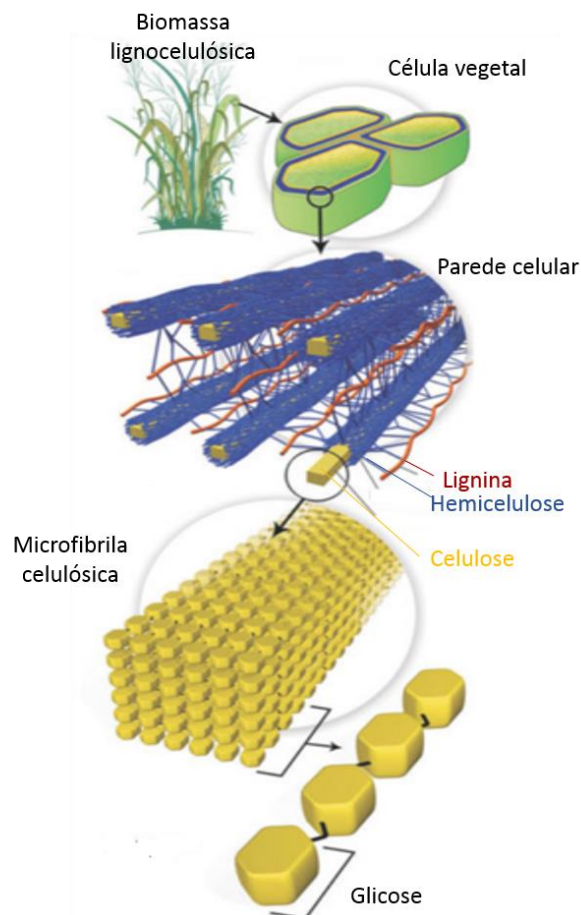


Figura 2: Estrutura da biomassa lignocelulósica. Representação dos principais componentes da parede celular vegetal: celulose cristalina, hemicelulose e lignina (Rubin, 2008).

Em termos de composição, a parede celular é composta basicamente por polissacarídeos, proteínas, compostos fenólicos e sais minerais. Os polissacarídeos representam cerca de 90% do peso seco da parede celular. Dos 90%, entre 35% e 50% consiste de celulose, 20 a 35% de hemicelulose e 10 a 25% de lignina (Rubin, 2008). A figura 2 apresenta um esquema da estrutura da biomassa lignocelulósica. As ligações de hidrogênio entre as diferentes camadas de polissacarídeos contribuem para a resistência da celulose cristalina à degradação. A hemicelulose é composta de várias pentoses e hexoses como arabinose, galactose, glicose, manose e xilose. A lignina é composta dos três maiores componentes fenólicos: álcool *p*-coumaril, álcool coniferil e álcool sinapil. A lignina é sintetizada pela polimerização desses componentes e sua quantidade dentro desses polímeros varia entre diferentes plantas. Ainda na figura 2, observa-se que os componentes são arranjados de modo que as cadeias de celulose e hemicelulose sejam fixadas pela lignina. Celulose, hemicelulose e lignina formam estruturas chamadas microfibrilas que são organizadas dentro de macrofibrilas que são responsáveis pela estabilidade estrutural da parede celular.

## ***1.2. COMPONENTES DA PAREDE CELULAR VEGETAL: CELULOSE, HEMICELULOSE E LIGNINA***

A celulose é o componente mais abundante da parede celular. Sua estrutura é formada por anéis  $\beta$ -D-glicopiranosose unidas por ligações  $\beta$ -D (1,4) glicosídicas. A fórmula empírica do polímero é  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . A celulose é um homopolissacarídeo linear e sua unidade repetitiva é a celobiose. A figura 3 apresenta a fórmula estrutural do polímero de celulose e sua unidade básica, a celobiose.

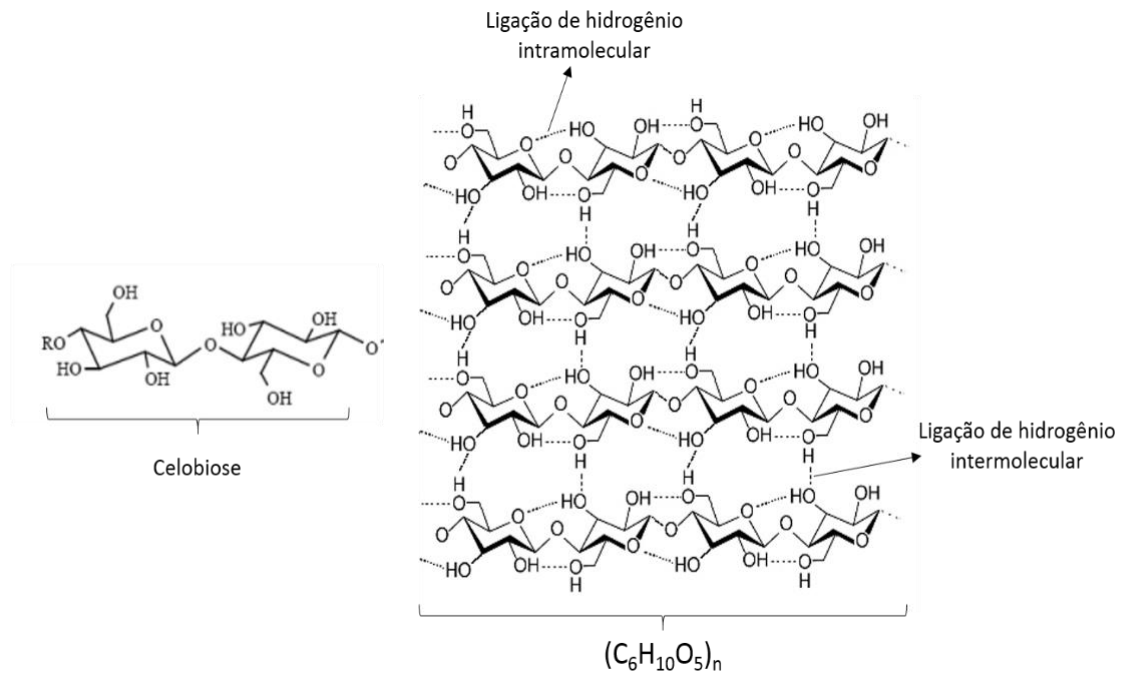


Figura 3: Fórmula estrutural da celobiose e do polímero de celulose  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . As setas indicam as ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares. Adaptado de (Morais, Nascimento, & Melo, 2005).

As cadeias de glicose são unidas por forças de van der Waals e as interações entre as moléculas são feitas através de ligações de hidrogênio. As moléculas de glicose são invertidas  $180^\circ$  em relação à molécula anterior, mostrada na figura 3. As orientações das ligações e a quantidade de ligações de hidrogênio presentes entre as moléculas vão definir a forma cristalina ou amorfa da estrutura da celulose. As ligações intramoleculares são responsáveis pela formação de estruturas altamente ordenada que se associam formando as fibras de celulose, são as fibrilas. As interações intermoleculares são responsáveis pela rigidez e organização das fibrilas (Bidlack, Malone, & Benson, 1992).



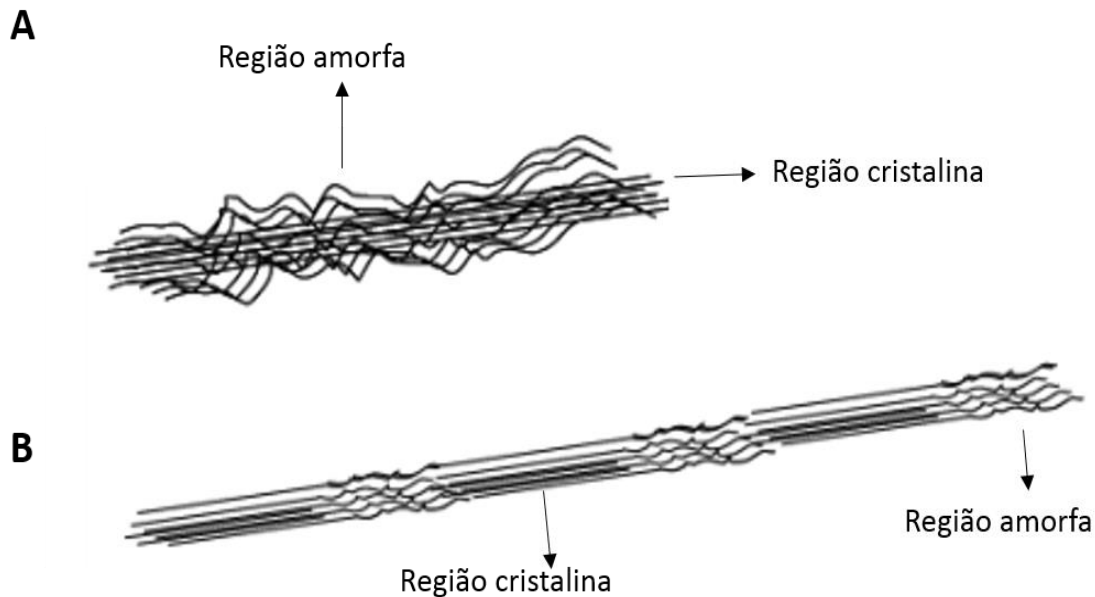


Figura 4: Distribuição da celulose amorfa e cristalina na microfibrila. A) Celulose com núcleo de estrutura cristalina envolvido pela parte amorfa. B) Celulose semi cristalina com regiões cristalinas e amorfas no mesmo sentido (Rabelo, 2010).

As fibrilas apresentam comprimento infinito e largura de aproximadamente 250 Å, que é chamado de microfibrila. Dentro das microfibrilas existem regiões cristalinas e amorfas. Estudos mostraram que a maioria das regiões amorfas dentro da celulose correspondem a cadeias poliméricas situadas nas superfícies. Enquanto que as regiões mais cristalinas ocupam o núcleo da microfibrila como mostra a figura 4 a (Larsson et al., 1999). Em outro caso, a microfibrila pode ser semi cristalina, alternando regiões amorfas com regiões cristalinas como é mostrado na figura 4 b. O ataque enzimático pode ser preferencial a uma das estrutura das microfibrilas. A hidrólise da celulose produz polímeros menores e oligossacarídeos com extremidades redutoras e não redutoras. Após hidrólises mais extensas, essas unidades dão origem a moléculas de celobiose que, se clivadas, se transformam em unidades de glicose. Os espaços entre as microfibrilas de celulose são preenchidos por lignina e por hemicelulose.

As hemiceluloses constituem o segundo componente mais abundante das massas lignocelulósicas. Estão presentes em todas as camadas da parede celular das plantas. São formadas por unidades de açúcares que podem ser subdivididas em grupos como pentose, hexose, ácidos hexourônicos e desoxi-hexoses (figura 5). Mas além desses sacarídeos, também pode ser encontrado

outros tipos como arabinose, galactose, fucose, ramnose, manose e alguns compostos acetilados (Morais et al., 2005).

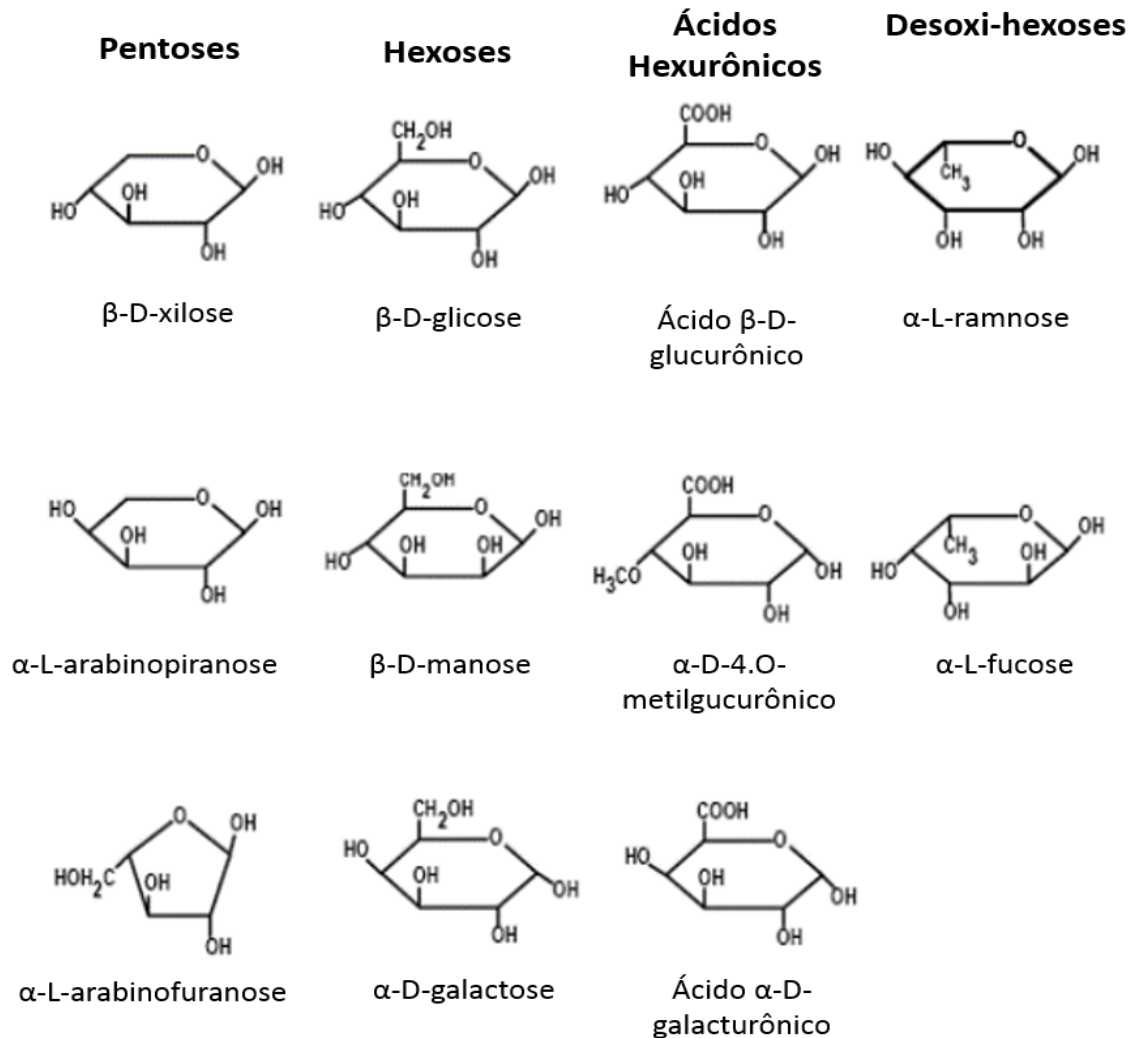


Figura 5: Estrutura dos monossacarídeos constituintes das hemiceluloses (Rabelo, 2010)

O xilano é o principal polissacarídeo encontrado na hemicelulose. É um heteropolissacarídeo com ligações  $\beta$ -1,4 de resíduos de D-xilopiranosil, com ramificações arabinosil. A estrutura da hemicelulose é uma cadeia curta, altamente ramificada pelas pentoses e hexoses. Devido às suas ramificações e a presença de grupo acetil, a hemicelulose não apresenta forma cristalina o que faz da hemicelulose mais suscetível à hidrólise química (Dodd; Cann, 2009).

A lignina representa uma boa parte dos componentes da parede vegetal podendo ser encontrada em toda a planta conferindo rigidez à parede vegetal. É formada por unidades de fenilpropano, cujos principais precursores são ácido cumarílico, coniferílico e sinapílico, que formam uma macromolécula tridimensional e amorfa. A maior parte das ligações encontradas na lignina é do tipo éter, formando uma estrutura mais aberta. As ligações entre carbonos na lignina aproximam os monômeros, tornando-a mais condensada. O grau de condensação altera sua reatividade. A figura 6 apresenta a estrutura geral de uma molécula de lignina com seus monômeros (Vanholme, Demedts, Morreel, Ralph, & Boerjan, 2010). A lignina possui uma série de sítios reativos que estão presentes tanto na cadeia lateral quanto nos anéis aromáticos

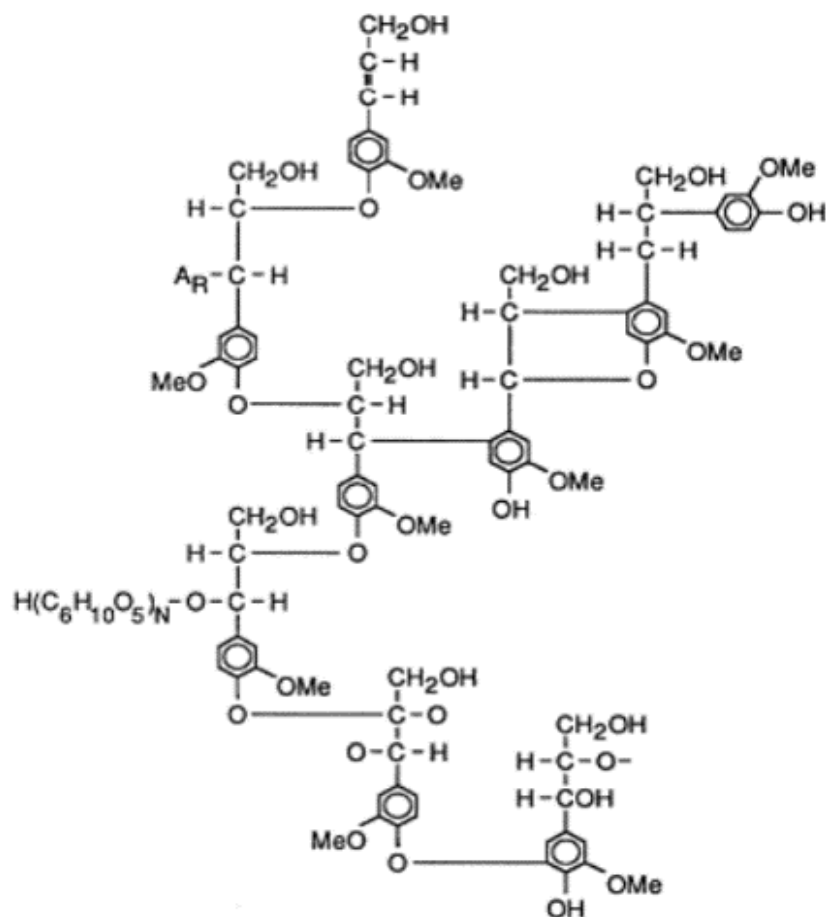


Figura 6: Estrutura da lignina (Vanholme et al., 2010).

Outro componente presente na biomassa lignocelulósica são as pectinas, que constituem o componente principal da lamela. São as frações mais fácil de serem extraídas da parede celular e representam uma complexa família de

polissacarídeos formada basicamente por ácido poligalacturônico e em menor quantidade por ramnose, arabinose e galactose. A maioria dos outros componentes da biomassa que não fazem parte da parede celular são altamente solúveis em solventes neutros como, por exemplo, polímeros de isopropeno, resinas, óleos, ácidos graxos, álcoois, carboidratos de baixo peso molecular, lignina solúvel e etc. Eles correspondem a uma fração entre 4 e 10% do peso seco da biomassa e são facilmente extraídos da biomassa (Rabelo, 2010). De todos os componentes da parede celular, a presença da lignina é a que fornece maior resistência ao processo de hidrólise enzimática.

### *1.3. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA*

Existem três técnicas de hidrólise para obtenção de açúcares fermentáveis: hidrólise com ácido concentrado, hidrólise com ácido diluído e hidrólise enzimática.

A hidrólise com ácido concentrado envolve soluções aquosas de ácidos fortes como ácido sulfúrico, ácido clorídrico ou ácido fosfórico em temperaturas abaixo de 100 °C, para quebrar a celulose e hemicelulose presentes na biomassa. Esses ácidos fortes utilizados, requerem equipamentos que sejam altamente resistentes à corrosão o que causa uma desvantagem no uso desta técnica, pois aumenta os custos da produção. Outra desvantagem é que a hemicelulose é hidrolisada mais rápido que a celulose, fazendo com que os monossacarídeos, provenientes da hemicelulose, fiquem muito tempo expostos ao ácido levando a perda e degradação desses açúcares. Além disso, ainda é necessário pensar na recuperação e reutilização dessas soluções ácidas por questões ambientais (Alves, 2011).

Na hidrólise com ácido diluído a hemicelulose e a celulose sofrem reações separadas. Assim, a hemicelulose hidrolisada pode ser removida após o primeiro passo da hidrólise dando continuidade à hidrólise da celulose. O segundo passo do processo, a hidrólise da celulose, ocorre a uma temperatura de aproximadamente 200 °C. A essa temperatura, os açúcares e a lignina solúvel são degradados apresentando desvantagens no processo.

O processo de produção de bioetanol a partir da biomassa lignocelulósica através da hidrólise enzimática e consequente fermentação, passa pelo processo de pré-tratamento. O pré-tratamento é uma etapa fundamental para a conversão. É ele que vai facilitar o acesso das enzimas às fibras de celulose e assim permitir a conversão dos polímeros de carboidratos a açúcares fermentáveis.

A transformação de celulose em monômeros de glicose é realizada através de reações catalisadas por enzimas, no processo de hidrólise. Entretanto, o acesso a essa celulose nativa é dificultado pela barreira lignina-carboidrato, tornando a biomassa muito recalcitrante à ação hidrolítica. Isso faz com que a transformação seja um processo lento sendo necessário um pré-tratamento da biomassa visando tornar as fibras de celulose mais expostas aos agentes hidrolíticos enzimáticos. Dessa forma, os principais objetivos do pré-tratamento são: aumentar a área superficial da biomassa, dissociar o complexo lignina-celulose e reduzir o grau de cristalinidade da celulose. E ainda, preservar as pentoses aumentando os rendimentos dos açúcares e evitar a produção de compostos inibidores do processo nas etapas de hidrólise e fermentação. A figura 7 é um esquema da ação do pré-tratamento, mostrando a remoção da lignina e o rompimento da estrutura cristalina da celulose.

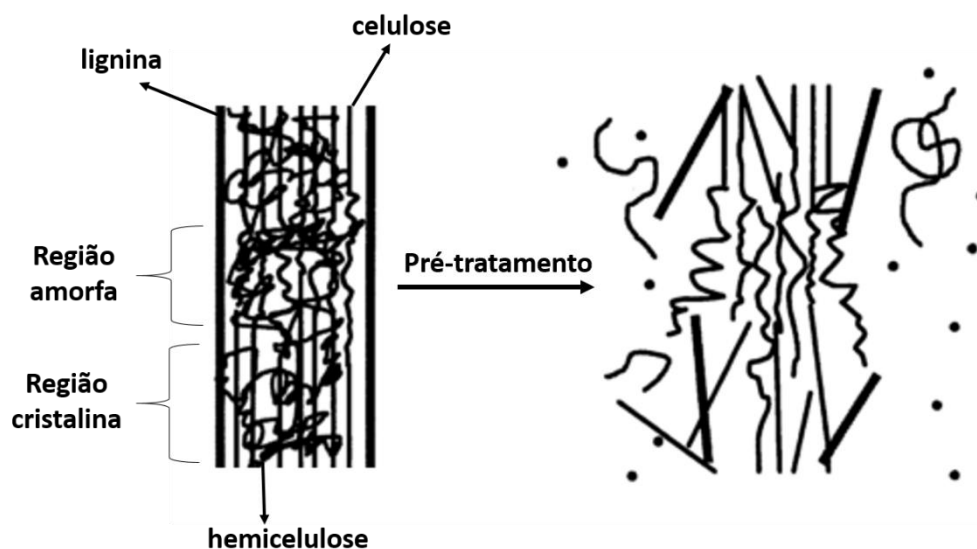


Figura 7: Esquema do objetivo do pré-tratamento na biomassa lignocelulósica. Adaptado de (Mosier, 2005).

Tsuchida e colaboradores investigaram a ação do pré-tratamento na biomassa de bagaço de cana-de-açúcar utilizando uma solução ácida de  $H_2SO_4$  e uma solução básica de NaOH (Tsuchida et al., 2014). As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV), mostradas na figura 8, ilustram bem a ação do pré-tratamento na biomassa. Na imagem observa-se que, com o aumento das concentrações das soluções ácida e básica utilizadas no processo, as fibras de celulose começam a ficar mais independentes uma das outras gerando maior acesso para a ação das enzimas na hidrólise posterior.

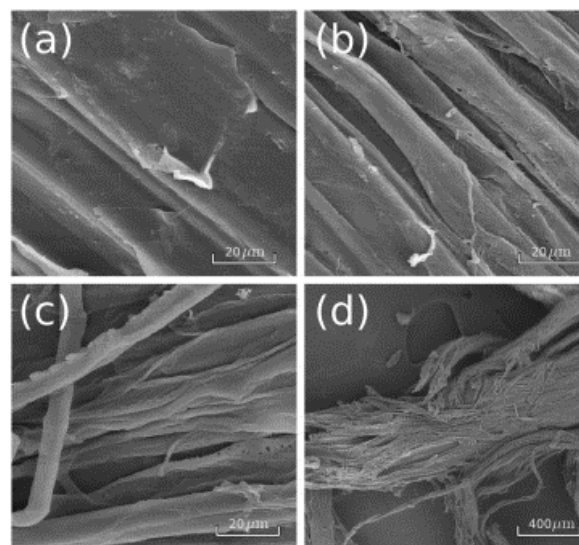


Figura 8: Imagem de MEV na superfície das fibras do bagaço da cana-de-açúcar antes e depois do tratamento. A) amostra não tratada, mostrando as fibras mais unidas. B) amostra tratada com  $H_2SO_4$  a 1% e NaOH 0,5% com fibras individuais mais aparentes. C) amostra tratada com  $H_2SO_4$  a 1% e NaOH 2% com as fibras mais independentes e não comprometidas estruturalmente. D) visão geral da degradação do bagaço com perda das fibras. Imagem de (Tsuchida et al., 2014).

Após o pré-tratamento, o material lignocelulósico é então hidrolisado mediante ação de enzimas. Condições de pH, pressão, temperatura, tempo de sacarificação, concentrações enzimáticas entre outras, devem ser muito bem determinadas e estabelecidas para garantir o melhor desempenho da hidrólise. A completa sacarificação da celulose é realizada pela ação sinérgica de pelo menos três grupos principais de enzimas no modelo enzimático clássico: as endoglucanases ou 1-4- $\beta$ -glucanase (EG), as exoglucanases ou celobiohidrolases (CBH) e as  $\beta$ -glicosidases (BG). Cada uma dessas enzimas atua num sítio específico na celulose e de modo distinto. Para que a sacarificação ocorra de forma eficiente é necessária a

adsorção da enzima à fibra de celulose, formando o complexo enzima-substrato (Desrochers, Jurasek, & Paice, 1981).

Em princípio, a hidrólise enzimática apresenta vantagens na eficiência, no rendimento e nas questões ambientais, sobre os processos de hidrólise química para a produção de açúcares fermentáveis. O grande desafio é tornar o processo de produção de enzimas viável para tornar-se competitiva com as demais rotas de produção de bioetanol em larga escala.

#### 1.4. CELULASES

Celulases são enzimas responsáveis pela degradação da celulose (Bhat, S. Bhat, 1997). A celulose é um substrato insolúvel e, ao contrário dos substratos solúveis que podem se difundir até o sítio ativo das enzimas, as celulases têm que se difundir, ancorar e posicionar a molécula de celulose em seu sítio ativo. A maior parte das celulases é formada por proteínas modulares, formadas por domínios catalíticos (CCD), um conector flexível e um módulo de ligação à celulose (CBM). O CCD é responsável pela atividade hidrolítica da enzima, é onde se encontra o sítio ativo. O conector flexível fornece flexibilidade entre o CCD e o CBM. A função do CBM é manter a enzima conectada à fibra de celulose e aumentar a concentração efetiva de enzimas atuando na fibra (Várnai, Siika-Aho, & Viikari, 2013). O CBM também desestabiliza as ligações de hidrogênio presentes na superfície da celulose, assim ele tem papel importante na solubilização das zonas cristalinas da celulose. A figura 9 apresenta a estrutura molecular típica de uma celulase adsorvida na celulose.

As celulases podem ser classificadas não apenas de acordo com as reações que catalisam, mas com base em propriedades estruturais e de sequência. O banco de dados CAZy (Carbohydrate-Active enZYmes Database) classifica as celulases como Glicosil Hidrolases (GHs), agrupadas em diferentes famílias (Henrissat, Vegetales, & Grenoble, 1991; Levasseur, Drula, Lombard, Coutinho, & Henrissat, 2013; Vincent Lombard, Golaconda Ramulu, Drula, Coutinho, & Henrissat, 2014). A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBM) fornece às GHs um código específico denominado Enzyme Commission number (EC) com base na reação catalisada e no tipo de substrato sobre o qual as enzimas atuam.

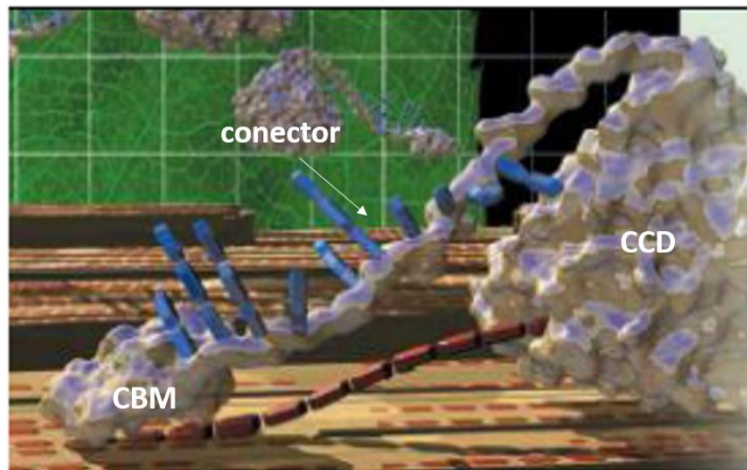


Figura 9: Estrutura tridimensional das celulasas. CBM aderido à fibra de celulose. Um polímero formando o conector entre o CBM e o CCD. Adaptado de (Rabelo, 2010).

As três enzimas GHs que trabalham para a completa degradação da celulose (as endoglucanases (EC 3.2.1.4), as celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) e as  $\beta$ -glicosidases (EC 3.2.1.21)) estão representadas na figura 10, que mostra um esquema da ação sinérgica destes biocatalisadores.

As endoglucanases (EG) são enzimas que catalisam a hidrólise interna de ligações  $\beta$ -1,4-D-glicosídicas da celulose. Elas atacam preferencialmente regiões amorfas das celulosas e clivam aleatoriamente as ligações internas (figura 10), gerando oligossacarídeos de vários comprimentos com extremidades redutoras e não redutoras e reduzindo o grau de polimerização das cadeias celulósicas. As EG são encontradas, de acordo com o CAZy, nas famílias de GH 5, 6, 7, 8, 9, 12, 44, 45, 48, 51 e 61 (<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>).

Celobiohidrolases são enzimas que clivam as extremidades das cadeias de celulose, liberando celobiose. Catalisam a hidrólise de ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas na celulose, podendo agir nas extremidades com resíduos redutores (CBH I) e resíduos não redutores (CBH II). De acordo com a classificação do CAZy, as CBH I são encontradas na família GH 7 e as CBH II na família GH 6 (<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>). Tanto as EGs como as CBHs estão sujeitas à inibição pelo produto (celobiose e glicose) (Payne et al., 2015). Vale destacar que a consequência da ação das EGs é que as novas extremidades se tornam suscetíveis à ação das celobiohidrolases.



Por último as  $\beta$ -glicosidasas (BG) convertem celobiose em glicose. Elas hidrolisam ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4,  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6 a partir de extremidades não redutoras de oligossacarídeos. A celobiose é o principal produto de hidrólise das CBHs e de muitas EGs. Desta forma, as BG representam a última etapa na produção de monossacarídeos a partir da hidrólise enzimática da celulose. São classificadas nas famílias GH 1, 3, 5, 9, 30 e 116 (<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>). Por produzir glicose a partir da celobiose, as BG diminuem o efeito inibidor da celobiose sobre as EGs e CBHs. Dessa forma elas são consideradas limitantes para o processo.

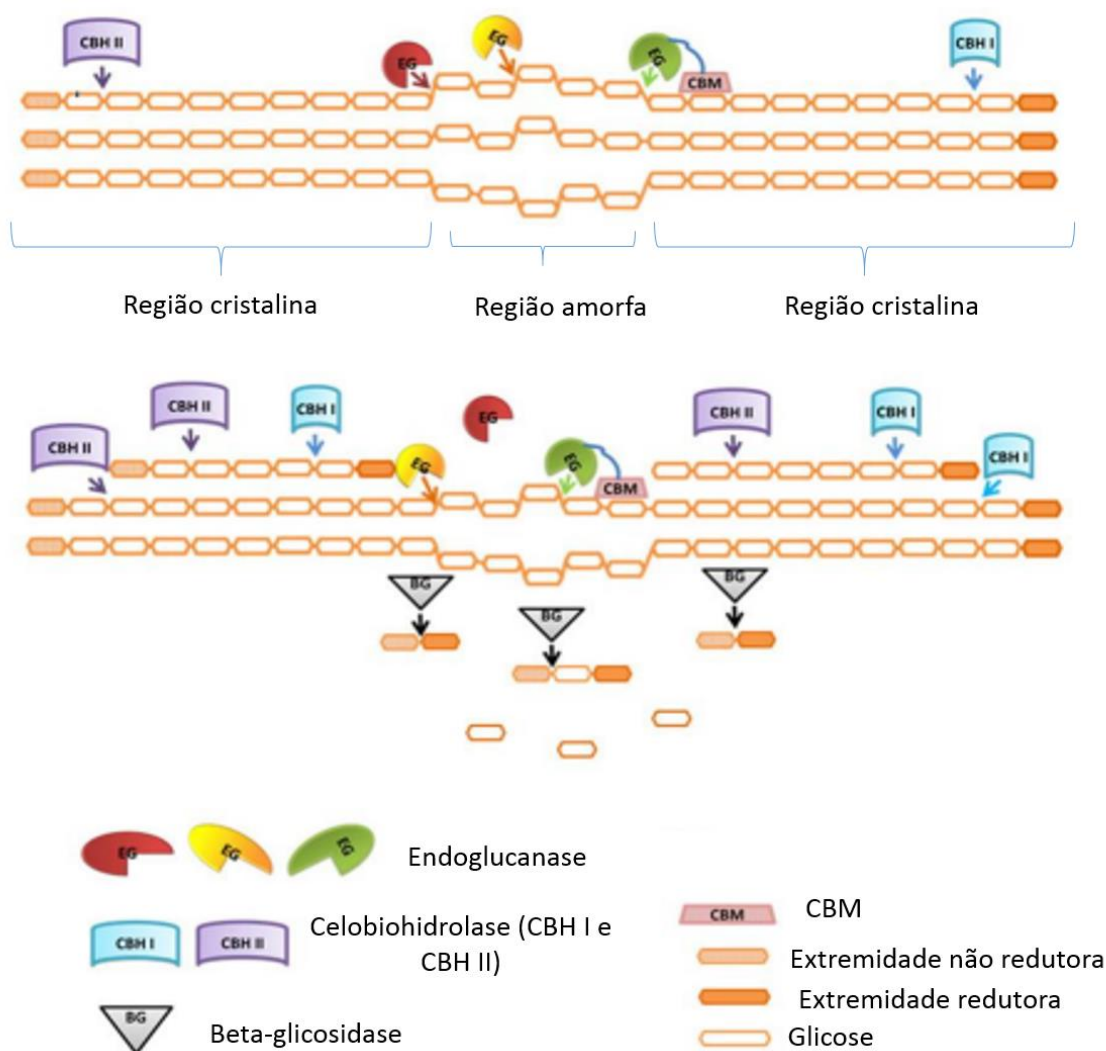


Figura 10: Esquema de hidrólise completa da celulose. A EGs clivam as regiões amorfas da celulose liberando extremidades redutoras e não redutoras. As CBHs hidrolizam essas extremidades liberando celobiose. As BGs clivam as celobioses liberando glicose. Adaptada de (Phitsuwan, Laohakunjit, Kerdchoechuen, Kyu, & Ratanakhanokchai, 2013).

As celulasas são encontradas em plantas, insetos, bactérias, fungos e arqueas. Os complexos de celulasas comerciais são derivadas de fungos, embora as celulasas bacterianas têm se mostrado com eficiências equivalentes na hidrólise da celulose. O fungo filamentoso *Trichoderma reesei* é o mais conhecido produtor de celulasas utilizado nos coquetéis celulolíticos. Ele secreta grandes quantidades de celulasas com alta atividade específica (Balat, 2011). O processo de hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica é um processo completo que depende do entendimento e otimização da ação destas três classes de enzimas e, eventualmente, pela complementação com outras enzimas que possam sinergizar o efeito hidrolítico.

O primeiro 'coquetel' a ser estudado foi o coquetel de enzimas produzido pelo fungo *Trichoderma reesei*. Para este coquetel, observou-se que a suplementação de  $\beta$ -glicosidases aumentou a eficiência da hidrólise (Desrochers et al., 1981; Sternberg, Vuayakumar, & Reese, 1977), sugerindo que estas enzimas representam a etapa limitante da reação como um todo.

### 1.5. $\beta$ -GLICOSIDASE

Amplamente distribuídas em bactérias, fungos, plantas e animais, as  $\beta$ -glicosidases (BG) representam um grupo de enzimas com funções variadas e fazem parte das glicosil hidrolases. As BGs são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações  $\beta$ -glicosídicas de dissacarídeos, oligossacarídeos e glicosídeos conjugados, exibindo uma alta especificidade. BGs têm sido classificadas, com base na similaridade de sequência de aminoácidos e similaridades estruturais, em seis famílias das hidrolases de glicosídeos GH 1, GH 3, GH 5, GH 9, GH 30 e GH 116 (<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>). A família GH 1 possui o maior número de  $\beta$ -glicosidases já caracterizadas. Por este motivo a maior parte do conhecimento nessa enzima se resume a essa família.

As BGs têm papel importante na indústria de alimentos devido à sua capacidade de realçar o sabor de bebidas e alimentos. Como exemplo, podemos citar o uso dessa enzima para a liberação do terpeno em vinhos. O terpeno é um dos principais compostos responsáveis pelo aroma do vinho. Sua forma não volátil

encontra-se ligada a um dissacarídeo. A quebra dessa ligação libera o terpeno aumentando o aroma do vinho. Apesar da hidrólise ácida ser capaz de quebrar a ligação entre o terpeno e o dissacarídeo, essa reação altera o sabor da bebida, tornando a hidrólise enzimática mais vantajosa (Joner Daroit, 2007).

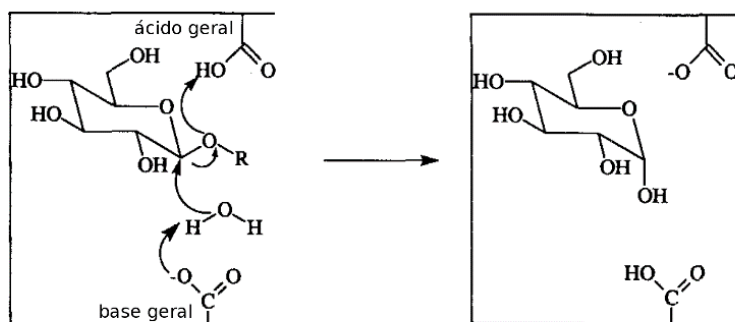
As  $\beta$ -glicosidases liberam vitaminas e antioxidantes capazes de melhorar a qualidade nutricional de alguns alimentos. Os flavonóides são uma classe de compostos polifenólicos, na forma de  $\beta$ -glicosídeos, derivados do metabolismo secundário dos vegetais e possuem atividades antioxidantes e quelantes. Acredita-se que a deglicosilação desses compostos através de BG citosólicas em mamíferos aumenta a capacidade de absorção dos flavonoides pelo organismo.

Nas plantas, as BGs desempenham maior número de funções biológicas que em qualquer outro organismo vivo. As BGs nas plantas têm papel importante na defesa, simbiose, catabolismo da parede celular, lignificação e metabolismo secundário. As BGs também são responsáveis pelos produtos voláteis que liberam o aroma das flores. A maior parte das BGs expressas em plantas fazem parte da família GH 1 (Cairns & Esen, 2010). Várias são as funções desempenhadas pelas BGs na natureza. Compreender a relação estrutura-função é essencial para a otimização dos processos de biocatálise industrial. O mecanismo de hidrólise utilizado pelas  $\beta$ -glicosidases será descrito na seção seguinte.

### ***1.5.1. MECANISMOS DE CATÁLISE DAS $\beta$ -GLICOSIDASES***

As famílias de GHs realizam a hidrólise de ligações glicosídicas através de dois mecanismos típicos: retenção ou inversão da quiralidade do carbono anomérico. Ambos os mecanismos dependem da mudança de configuração do oxigênio glicosídico durante a reação (figura 11).

### Mecanismo de Inversão



### Mecanismo de Retenção

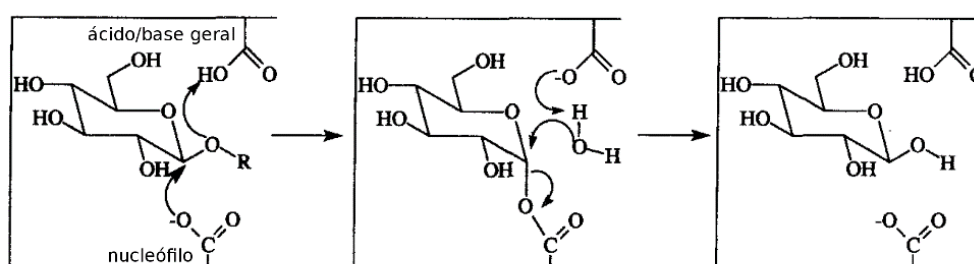


Figura 11: Mecanismos de catálise das Glicosil Hidrolases incluindo as BGs. Adaptado de (McCarter & Withers, 1994).

No mecanismo de inversão, a reação é realizada de forma que uma molécula de água ataca o grupo de saída enquanto o mecanismo de retenção envolve um duplo deslocamento com um intermediário enzima-glicosil (McCarter & Withers, 1994). Apesar das diferenças, ambos os mecanismos empregam um par de ácidos carboxílicos no sítio ativo para a hidrólise. No mecanismo de inversão, um aminoácido ácido faz o papel de um ácido geral e outro faz o papel de base geral. Já no mecanismo de retenção, um aminoácido ácido faz o papel de nucleófilo enquanto o outro desempenha os papéis de ácido geral e base geral (figura 11).

#### 1.5.2. GLICOSIL HIDROLASES (GH)

As enzimas ativas sobre glicosídeos são agrupadas atualmente em 135 famílias, de acordo com o CAZy (<http://www.cazy.org>). As BGs estão presentes em

seis destas famílias (GH 1, GH 3, GH 5, GH 9, GH 30 e GH 116). As seções a seguir fazem uma breve descrição das estruturas e mecanismos de catálise dessas famílias, dando ênfase as duas famílias estudadas nesse trabalho, GH1 e GH3.

#### 1.5.2.1. GH 1

Dentre as famílias de GHs, a GH 1 é a família que possui o maior número de enzimas e que estão presentes em todas as classes de organismos. As GH 1 são pouco específicas, pois apenas uma enzima é capaz de hidrolizar  $\beta$ -D-glicosídeos,  $\beta$ -D-fucosídeos,  $\beta$ -D-galactosídeos,  $\beta$ -D-mannosídeos,  $\alpha$ -L-arabinosídeos ou clivar apenas um substrato (Cairns & Esen, 2010).

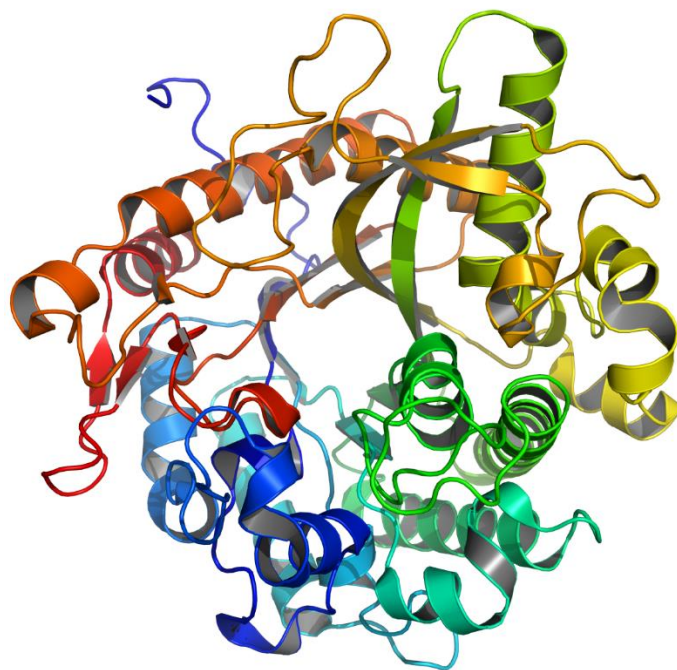


Figura 12: Estrutura de uma enzima da família GH 1.  $\beta$ -glicosidase de *Zea mays* (código PDB: 1E1E). As cores seguem do azul para o vermelho, do domínio N para o C-terminal (Czjzek et al., 2001).

As GH 1 possuem enovelamento do tipo barril TIM ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> com resíduos catalíticos situados na extremidade C-terminal das fitas  $\beta$  4 e 7 (Cairns & Esen, 2010). O mecanismo de catálise é o de retenção utilizando como nucleófilo catalítico/base e como doador próton um ácido glutâmico. O tamanho das enzimas da família GH 1 varia consideravelmente devido a presença ou não dos domínios auxiliares. Contudo,

o domínio catalítico é constituído de 440 a 550 resíduos dependendo do comprimento dos loops na extremidade C-terminal. Quanto à estrutura quaternária, as enzimas podem ser ativas como enzimas monoméricas, diméricas, tetrâméricas, hexaméricas e octaméricas. A figura 12 é a estrutura de uma  $\beta$ -glicosidase de *Zea mays* (código PDB: 1E1E) da família GH 1.

#### 1.5.2.2. GH 3

Entre as enzimas da família GH 3 com estrutura conhecida, observa-se uma diversidade estrutural bastante interessante. Podemos citar aqui quatro enzimas bacterianas e duas enzimas eucarióticas. São elas:  $\beta$ -N-acetil-hexosaminidase de *Vibrio cholerae* (código PDB: 1TR9) (Gorman e Shapiro, não publicado),  $\beta$ -N-acetil-hexosaminidase de *Bacillus Subtilis* (código PDB: 3BMX) (Litzinger et al., 2010), exo-1,3-1,4- $\beta$ -glucanase de *Pseudoalteromonas sp.* (código PDB: 3UT0) (Nakatani, Cutfield, Cowieson, & Cutfield, 2012),  $\beta$ -glicosidase de *Thermotoga neapolitana* (código PDB: 2X40) (Pozzo, Pasten, Karlsson, & Logan, 2010), exo-1,3-1,4- $\beta$ -glucanase de *Hordeum vulgare* (código PDB: 1EX1) e  $\beta$ -glicosidase de *Kluyveromyces marxianus* (código PDB: 3ABZ) (Yoshida et al., 2010).

Entre essas enzimas, as duas  $\beta$ -glicosidases com estruturas resolvidas possuem estruturas significativamente diferentes. A  $\beta$ -glicosidase de *Thermotoga neapolitana* é uma enzima com três domínios, com um C-terminal um pouco mais estendido com um enovelamento do tipo fibronectina III (FnIII). O domínio do tipo FnIII ainda possui função desconhecida em  $\beta$ -glicosidases. Acredita-se que ele possa estar envolvido na ancoragem da enzima sobre grandes substratos poliméricos e na termoestabilidade da mesma (Lima et al., 2013). A  $\beta$ -glicosidase de *Kluyveromyces marxianus* apresenta os mesmos domínios que a de *T. neapolitana*, porém há a inserção de um quarto domínio PA14 entre o  $(\alpha/\beta)_6$ -sanduíche (figura 13).

O sítio ativo das enzimas da família GH 3 encontra-se normalmente entre os domínios barril  $(\beta/\alpha)_8$  e  $(\alpha/\beta)_6$  sanduíche. Essas enzimas possuem um mecanismo de catálise de retenção utilizando um aspartato como nucleófilo catalítico e um ácido glutâmico como ácido/base geral (Cairns & Esen, 2010).



Figura 13: Estrutura de uma enzima da família GH 3.  $\beta$ -glicosidase de *Kluyveromyces marxianus* (código PDB: 3ABZ). O domínio em amarelo é o domínio FnIII e em laranja o domínio PA14. Domínio N-terminal está em azul.  $(\alpha/\beta)_6$ -sanduíche em verde (Yoshida et al., 2010).

Em resumo, comparando as enzimas da família GH 3 com as enzimas da família GH 1, observa-se que as GH 3 têm um domínio catalítico estruturalmente similar ao domínio simples das enzimas da família GH1. A principal diferença é a presença de um segundo domínio de adesão ao carboidrato como o CBM ou FnIII. Apesar de sua relevância na depolimerização da biomassa, os estudos estruturais e funcionais das  $\beta$ -glicosidases da família GH3 ainda são escassos.

#### 1.5.2.2. OUTRAS FAMÍLIAS DE GHS COM ATIVIDADE $\beta$ -GLICOSIDASE

A família GH 5 é uma das mais extensas das Glicosil Hidrolases. Nesta família são encontradas enzimas com função endoglucanase, endomananase, exoglucanase,  $\beta$ -glicosidase e  $\beta$ -manosidase. Elas possuem um enovelamento do tipo barril TIM  $(\beta/\alpha)_8$  com dois resíduos catalíticos localizados na extremidade C-terminal nas fitas  $\beta$  4 e 7. O mecanismo de catálise das enzimas desta família é o de

retenção, utilizando ácidos glutâmicos como nucleófilo catalítico e como ácido/base geral.

A maior parte das enzimas da família GH9 são endoglucanases, mas algumas poucas  $\beta$ -glicosidases são também encontradas na família. Possuem uma estrutura do tipo barril  $(\alpha/\alpha)_6$ . O mecanismo de catálise das enzimas dessa família é por inversão utilizando um aspartato como ácido geral e um ácido glutâmico como base geral. As  $\beta$ -glicosidases desta família são as únicas a terem mecanismo de catálise por inversão (Cairns & Esen, 2010).

As enzimas da família GH 30 incluem as funções  $\beta$ -glicosilceramidase ( $\beta$ -glicosidase),  $\beta$ -1,6-glicanase e  $\beta$ -xilosidase. Assim como as enzimas das famílias GH 1 e GH 5, essas enzimas possuem um enovelamento do tipo barril TIM  $(\beta/\alpha)_8$  e mecanismos de retenção para catálise, utilizando ácidos glutâmicos como aminoácidos catalíticos.

Finalmente, na família GH 116 são encontradas  $\beta$ -glicosidases,  $\beta$ -xilosidase e  $\beta$ -N-acetil-glucosaminidase. As enzimas dessa família possuem um mecanismo de catálise de retenção com ácido glutâmico como nucleófilo e aspartato como ácido/base geral. Até o momento da finalização desta tese nenhuma estrutura de enzima pertencente a esta família havia sido determinada.

### 1.5.3. TRANSGLICOSILAÇÃO

A função mais atribuída às glicosidases é a hidrólise de ligações glicosídicas. No entanto, algumas glicosidases são capazes de catalisar a reação reversa produzindo novamente as ligações glicosídicas através da hidrólise reversa ou de transglicosilação. A hidrólise reversa depende do deslocamento de equilíbrio da reação. Já a transglicosilação depende do controle cinético de rotas alternativas dos mecanismos de reação catalisadas pelas glicosidases (Frutuoso & Marana, 2013).

A transglicosilação tem sido melhor caracterizada para as  $\beta$ -glicosidases da família GH 1. A catálise nessas enzimas acontece através do



mecanismo de retenção. Esse mecanismo envolve a formação de um intermediário covalente (glicosil-enzima) que pode seguir duas rotas distintas. A primeira rota é a hidrólise na ligação  $\beta$ -glicosídica entre o o açúcar glicona (sítio anterior à ligação glicosídica ou -1) e o aglicona (sítio posterior à ligação glicosídica ou +1), liberando o monossacarídeo da extremidade não redutora. A segunda rota é a transglicosilação que ocorre através da síntese por controle cinético. Nesta rota, o intermediário é atacado por uma outra molécula de substrato (acceptor glicosídico), gerando um novo glicosídeo.

A figura 14 apresenta um modelo de uma reação entre uma  $\beta$ -glicosidase e o substrato sintético *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (pNPG ou Glc-NP), substrato utilizado na maioria dos procedimentos experimentais deste trabalho. A reação indicada na figura pode seguir a rota de hidrólise ou a rota de transglicosilação. Na primeira etapa, indicada por (I) na figura, a enzima livre liga-se ao substrato Glc-NP (S1) formando o complexo enzima-substrato (não representado). Esta etapa origina o covalente intermediário enzima- $\alpha$ -glicosil (E-Glc) ao mesmo tempo que libera o primeiro produto (P1), no caso o *p*-nitrofenolato (NP). O ataque de uma molécula de água ao intermediário, caracteriza a hidrólise, indicado por (III) na figura. Por outro lado, o ataque por uma segunda molécula de substrato (S2, acceptor), indicado por (IV), define a rota de transglicosilação (Frutuoso & Marana, 2013; Teugjas & Våljamäe, 2013).

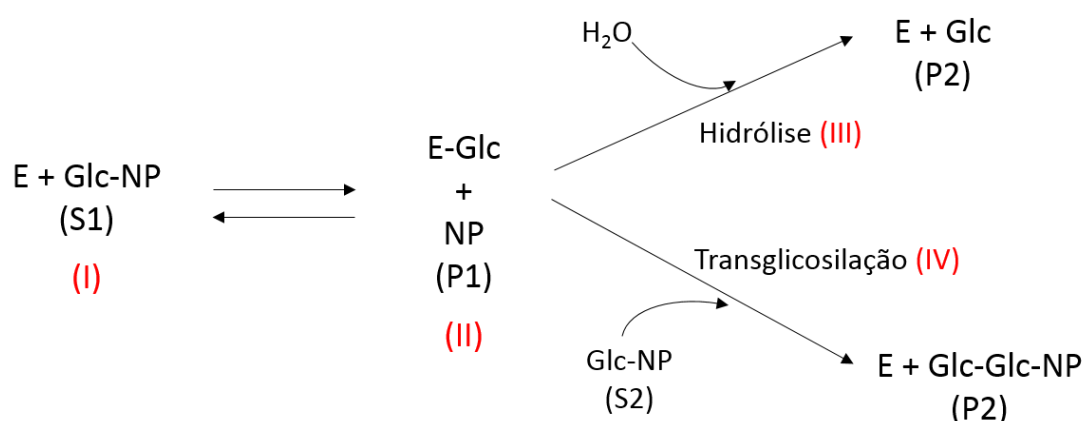


Figura 14: Esquema de reações de catálise por  $\beta$ -glicosidases. Rotas de hidrólise e rotas de transglicosilação. (E) = enzima. (Glc-NP) = para-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo. (Glc) = glicose. (NP) = para-nitrofenolato. (S1) = primeiro substrato. (S2) = segundo substrato. (P1) = primeiro produto formado. (P2) = segundo produto formado. Adaptado de (Frutuoso & Marana, 2013).

O produto P1 (*p*-nitrofenolato, no caso) é comum para as duas rotas, porém a glicose é formada apenas na rota de hidrólise. A probabilidade de a reação seguir a rota de transglicosilação dependeria, de acordo com este modelo, da competição entre a molécula de água e o aceptor pelo covalente intermediário. Logo, os resíduos envolvidos no acesso das moléculas de água no sítio ativo devem ter um papel relevante no balanço entre a tendência da enzima em catalisar reações de transglicosilação ou de hidrólise. A mutação de alguns resíduos tem sido estudada afim de alterar este balanço em algumas  $\beta$ -glicosidases (Kittl & Withers, 2010) (Mackenzie, Wang, Warren, & Withers, 1998)(Feng, 2005). Nesse contexto Frutuoso e colaboradores estudaram a mutação de uma lisina por uma fenilalanina (K201F) no sítio catalítico de uma  $\beta$ -glicosidase de *Tenebrio molitor* (Tm $\beta$ gly) da família GH 1. A mutação deste único aminoácido foi suficiente para tornar a enzima mais propensa à catálise da reação de transglicosilação (Frutuoso & Marana, 2013).

Se por um lado a capacidade de catálise da transglicosilação representa uma redução na capacidade de sacarificação da enzima  $\beta$ -glicosidase, por outro lado, representa também uma possibilidade de síntese estéreo-específica de oligossacarídeos que podem ter interesse comercial e mesmo biomédico, na produção de probióticos, por exemplo. Desta forma, a caracterização da capacidade de realização de transglicosilação é bastante relevante no estudo de  $\beta$ -glicosidases. Uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na regulação do balanço hidrólise/transglicosilação no nível atômico é de grande valia.

# Capítulo 2

## Objetivos

---

## 2.1. OBJETIVO GERAL

As  $\beta$ -glicosidases possuem um papel fundamental em diversos setores da indústria. Na indústria alimentícia elas têm sido largamente estudadas para liberação de aromas bem como para aumentar o valor nutritivo de alimentos. Além disto, essa enzima representa um passo determinante no processo de sacarificação de biomassa, visto que ela é a responsável pela hidrólise da celobiose, um forte inibidor de outras enzimas que atuam na hidrólise da celulose.

O trabalho apresentado nesta tese foi realizado no grupo de Biotecnologia Molecular e Estrutural do Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP) com o objetivo geral de contribuir com as pesquisas em Bioenergia com a caracterização de enzimas  $\beta$ -glicosidases da família GH 3 e da família GH 1. Embora as  $\beta$ -glicosidases sejam uma das enzimas mais estudadas e caracterizadas, dados estruturais das enzimas da família GH 3 assim como o entendimento dos seus multi domínios ainda são escassos. No caso das enzimas da família GH 1, o estudo foi focado na compreensão dos mecanismos estruturais envolvidos no balanço transglicosilação/hidrólise.

## 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

No presente trabalho foi caracterizada estruturalmente e bioquimicamente, uma  $\beta$ -glicosidase da família GH 3 de *Bifidobacterium adolescentis* (BaBgl). Nesta etapa, os objetivos específicos foram:

- Clonagem e expressão da  $\beta$ -glicosidase de *Bifidobacterium adolescentis* (BaBgl).
- Purificação da BaBgl;
- Determinação das condições ótimas da atividade da enzima, como pH e temperatura;
- Determinação de parâmetros cinéticos contra substrato sintético pNPG;

- Determinação da ocorrência da rota de transglicosilação no mecanismo de catálise da Babgl;
- Interferência de monossacarídeos na atividade da BaBgl;
- Função do domínio de FnIII na adsorção da BaBgl à substratos como lignina, Avicel e papel filtro;
- Cristalização e resolução da estrutura tridimensional da enzima;
- Estudo da relação entre estrutura e atividade;

Foi objetivo deste trabalho também, a comparação da BaBgl com duas enzimas  $\beta$ -glicosidases da família GH 1. As duas enzimas são oriundas do fungo *Trichoderma harzianum* (ThBgl1 e ThBgl2) e foram purificadas, caracterizadas e cristalizadas pela então aluna do grupo de Biotecnologia Molecular Hêmily Sanches Mutti. Os objetivos específicos nesta etapa foram:

- Refinamento estrutural e análise das estruturas da ThBgl1 e ThBgl2.
- Análise da relação das estruturas das enzimas com a atividade de transglicosilação.



## Capítulo 3

### Materiais e métodos

---

Este capítulo descreve todas as metodologias e materiais utilizados para a produção e purificação da  $\beta$ -glicosidase de *Bifidobacterium adolescentis* (BaBgl) e para a sua caracterização estrutural e bioquímica.

### 3.1. CLONAGEM E TRANFORMAÇÃO DA BaBgl

O processo de clonagem foi realizado no laboratório do grupo de Biotecnologia Molecular e Estrutural do Instituto de Física de São Carlos pelo Dr. César Moisés Camilo. Os clones foram obtidos através de uma plataforma de clonagem, expressão e purificação de proteínas recombinantes em alto desempenho. O vetor utilizado para a clonagem foi o pETTRXA-1a/LIC, cedido pelo Dr. Arie Geerlof (EMBL - Heidelberg). Esse vetor é uma modificação do vetor pETTRX-1a, e foi adaptado para o método de clonagem independente da ligação (LIC) (Aslanidis & de Jong, 1990). A metodologia utilizada para a obtenção do plasmídeo recombinante está descrita (Camilo, 2014).

Esse vetor acrescenta à proteína alvo a tiorredoxina (TRX) e uma cauda de seis histidinas, além de conferir resistência ao antibiótico canamicina. O poder redutor do domínio TRX, ajuda a evitar agregações causadas por ligações dissulfeto entre as proteínas tornando a enzima alvo mais solúvel. A cauda de histidina torna possível a purificação por cromatografia de afinidade.

Os vetores de expressão contendo os genes de interesse foram utilizados no processo de transformação das células competentes de *Escherichia coli* linhagem DH10B, para a propagação do plasmídeo, e linhagem *Rosetta*, essa última utilizada para a expressão proteica.

### 3.2. EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM *Escherichia coli*

Inicialmente, foram realizados alguns testes de expressão em pequena escala, para chegar à condição de cultivo das células que resultasse em maior expressão proteica. Para isto, células das cepas de *E. coli* transformadas foram



inoculadas em 5 mL de meio Luria Broth (LB) estéril contendo 0,05 mg/mL de canamicina e 0,08 mg/mL de cloranfenicol e incubadas por 12 horas a 37 °C sob agitação constante de 150 rpm.

Após a definição das condições, foram realizadas expressões em larga escala. Nesse processo, uma pré cultura, crescida por 12 horas a 37 °C foi inoculada em 1 L de meio auto-indutor estéril, descrito na tabela 1. As soluções descritas na tabela 1, depois de preparadas, devem ser misturadas na quantidade de 929 mL de ZY, 1 mL de MgSO<sub>4</sub>, 20 mL de 50 X 5052 e 50 mL de 20 X NPS. Foram adicionados ao meio auto-indutor canamicina e cloranfenicol, nas concentrações finais de 0,05 mg/mL e 0,08 mg/mL, respectivamente. O inóculo foi mantido sob agitação constante de 130 rpm a 37 °C por aproximadamente 5 horas (tempo necessário para que, nessas condições, fosse atingida uma densidade ótica de 0,6 em um comprimento de onda de 600 nm, devido à turbidez do meio) para o crescimento das bactérias. Após esse tempo, a temperatura foi alterada para 17 °C, para a expressão da proteína de interesse por, aproximadamente, 16 horas sob agitação constante de 130 rpm.

Tabela 1: Descrição do meio auto-indutor: componentes das soluções expressas em quantidades ou concentrações (Studier, 2005).

<b>Solução</b>	<b>Componentes</b>	<b>Quantidade/ concentração</b>	<b>pH</b>
<b>ZY*</b>	Água destilada	925 mL	6,5
	Triptona	10 g	
	Extrato de levedura	5 g	
<b>20 X NPS (solução aquosa)*</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5 M	6,75
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1M	
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 M	
<b>50 X 5052 (solução aquosa)*</b>	Glicerol	25% w/v	Não é necessário ajustar o pH
	Glicose	0,14 M	
	α-lactose	0,3 M	
<b>MgSO<sub>4</sub>*</b>		1 mM	Não é necessário ajustar o pH

\* Todas as soluções foram autoclavadas a pressão de 1 atm por 20 minutos.

### 3.3. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA

#### 3.3.1. EXTRAÇÃO DA PROTEÍNA

Após a expressão, o meio de cultura foi centrifugado por 40 minutos a 6000 rpm a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. As células de *E. coli* contendo a proteína de interesse foram ressuspensas em 20 mL de tampão de lise (descrito na tabela 2), pH 8,0, para cada litro de cultura e mantidas em repouso por 40 minutos em gelo. Após este período, as células foram lisadas por sonicação, utilizando um sonicador *550 Sonic Dismembrator – Fisher Scientific*. Foram aplicados 8 ciclos de pulsos de 30 segundos intercalados com 30 segundos de descanso em gelo. Após a sonicação, o lisado foi centrifugado a 10.000 rpm por 40 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi então purificado por cromatografia de afinidade.

Tabela 2: Componentes do tampão de lise.

<b>Componente</b>	<b>Concentração</b>
Tris-HCl	50 mM
NaCl	300 mM
Glicerol	10% v/v
PMSF (inibidor de protease)	0,1 mM
Lisozima	250 µg/mL

#### 3.3.2. PRIMEIRO PASSO DE PURIFICAÇÃO: CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

A construção da proteína expressa possuía uma cauda de tiorredoxina (TRX) com seis histidinas na região N-terminal. A cauda de hexahistidinas possui afinidade por íons bivalentes carregados positivamente e esta característica foi explorada no primeiro passo de purificação, sendo essa técnica conhecida como IMAC (*Immobilized Metal ion Affinity Chromatography*). A resina utilizada foi da GE-Healthcare), contendo íons Ni<sup>2+</sup> imobilizados. Para eluir a proteína aderida aos íons

Ni<sup>2+</sup>, foi utilizado o imidazol, C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>. O imidazol é um composto heterocíclico contendo dois nitrogênios nas posições 1 e 3 do anel imidazólico. Este, por sua vez tem maior afinidade, em pH entre 8,0 e 8,5, com os íons de Ni<sup>2+</sup>. Assim ele compete com os resíduos de histidina para se ligar ao Ni<sup>2+</sup>, fazendo com que as proteínas de interesse, que contêm as histidinas, sejam eluídas.

Uma coluna de purificação contendo 4 mL de resina de Ni<sup>2+</sup> foi equilibrada com 20 mL (5 volumes de coluna) de tampão composto por 50 mM de Tris-HCl pH 8,5, 500 mM de NaCl e 5 mM de imidazol. O sobrenadante coletado, depois da lise das células, foi aplicado na coluna e mantido em repouso a 10 °C por 30 minutos. Após esse tempo, foram eluídas as proteínas que não aderiram à coluna. Uma vez que a cauda de histidina tem afinidade pelos íons Ni<sup>2+</sup>, a enzima se fixa na coluna, enquanto as demais proteínas são eluídas.

Após este processo, foi feita a lavagem da resina para retirar as proteínas que não eram de interesse. Assim foi realizado um gradiente de imidazol. A base do tampão era a mesma do tampão de equilíbrio em todas as etapas de lavagem (50 mM de Tris-HCl e 500 mM de NaCl com pH de 8,5) com variações nas concentrações de imidazol. Esse gradiente de imidazol foi aplicado com 10 volumes de coluna (40 mL) e concentrações de 5, 10, 25 e 50 mM de imidazol cada.

As proteínas, após o gradiente de lavagem, foram eluídas utilizando 8 volumes de coluna (32 mL) de um tampão com 50 mM de Tris-HCl, 500 mM de NaCl e 130 mM de imidazol com pH de 8,5. As frações eluídas foram analisadas em um gel SDS-PAGE com 10% de poliacrilamida.

### 3.3.3. CLIVAGEM DA TIORREDOXINA E SEGUNDO PASSO DE PURIFICAÇÃO: CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

Depois da primeira etapa de purificação que resultou na enzima pura, era necessário remover o domínio de tiorredoxina e a cauda de histidina. Para o processo de clivagem do domínio e da cauda, foi utilizada a protease do vírus *Tobacco Etch* (TEV). A expressão e purificação da protease TEV seguiu o protocolo previamente publicado por Kim e colaboradores (Kim et al., 2004).

Antes de aplicar a protease TEV na amostra proteica foi necessário remover o imidazol presente na mesma, pois ele pode reduzir consideravelmente a atividade da TEV. Para isso, foi utilizado um concentrador do tipo Vivaspin (GE healthcare) com corte molecular de 50 kDa e centrifugação de 2700 rpm. Além de concentrada, a solução contendo a proteína foi diluída em tampão contendo 50 mM de Tris-HCl e 300 mM de NaCl em pH 8,0 até atingir uma concentração final de imidazol menor que 10 mM.

Após essa etapa, a proteína foi incubada com TEV na razão TEV/proteína de 1/50 (massa/massa) por, aproximadamente, 12 horas a 4 °C. Passado este período de incubação, foi feito um gel SDS-PAGE para certificar que o domínio de TRX e a cauda de histidina foram clivados. Confirmada a clivagem, a solução contendo a proteína de interesse, TRX e cauda de histidinas foi submetida ao segundo passo de purificação, também explorando a afinidade dos componentes da amostra. Similarmente à etapa anterior, foi utilizada uma coluna de afinidade contendo 4 mL de resina de Ni<sup>2+</sup> pré equilibrada com 10 volumes de coluna (40 mL) de tampão contendo 50 mM de Tris-HCl e 300 mM de NaCl em pH 8,0. Assim, o domínio de TRX e a cauda de histidina permaneciam aderidos à coluna de Ni<sup>2+</sup> e apenas a proteína clivada era eluída.

Todos os tampões utilizados na primeira e segunda etapas de purificação por inidade foram mantidos a temperatura de 4 °C e em todos os passos foram retiradas alíquotas para análise em gel SDS-PAGE com 10% de poliacrilamida.

#### *3.3.4. TERCEIRO PASSO DE PURIFICAÇÃO: CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR MASSA MOLECULAR*

Para que fossem obtidas as amostras da proteína de interesse com um grau de pureza mais elevado, foi realizada uma terceira etapa de purificação que explorava as diferenças de massas moleculares dos contaminantes. A cromatografia de exclusão por massa molecular foi realizada utilizando uma coluna de gel filtração *Superdex 200 HR 16/60 (GE-Healthcare)*.

Com o auxílio de um aparelho de *High-performance liquid chromatography* (HPLC) da *AKTA Explorer 10* (GE-Healthcare), a coluna de gel filtração foi equilibrada com 2 volumes de coluna (120 mL) de tampão contendo 50 mM Tris pH 8,0 e 150 mM de NaCl. Posteriormente, foi realizada uma eluição isocrática com uma unidade de volume de coluna total, com fluxo de 1 mL/min de tampão, e monitoramento das soluções a 280 nm por espectrofotometria. Frações de 1 mL foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE para a confirmação do processo de purificação.

Após análise do gel SDS-PAGE, as frações que continham a proteína com alto grau de pureza, foram concentradas utilizando um concentrador Vivaspinn (GE healthcare) com corte molecular de 50 kDa e centrifugação de 2700 rpm. Algumas alíquotas da proteína já concentrada foram acrescidas de 20% de glicerol e foram mantidas congeladas a temperatura de -80 °C para testes posteriores.

### 3.4. FLUORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSF)

A técnica de Fluorimetria Diferencial de Varredura (também conhecida por DSF ou por *Thermofluor*) auxilia na identificação de moléculas ligantes ou condições capazes de produzir uma maior estabilidade térmica das amostras proteicas (Niesen, 2007). A técnica utiliza uma sonda que possui afinidade por partes hidrofóbicas das proteínas que, regularmente, só ficam expostas quando a proteína está desenovelada. Desta forma, o experimento é realizado varrendo várias temperaturas e analisando o sinal de fluorescência que é emitido quando a sonda liga-se às regiões hidrofóbicas da proteína e aumenta drasticamente a intensidade da emissão por fluorescência. Este experimento permite o cálculo da temperatura do ponto médio de transição da curva de desnaturação ou, ponto médio da curva de *melting* (Temperatura de *melting* –  $T_M$ ) da fase enovelada para a desenovelada da proteína. Esse experimento foi realizado em colaboração com a Dra. Amanda Bernardes, do grupo de Biotecnologia Molecular e Estrutural do Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP).

Neste experimento foi analisada a estabilidade térmica da enzima em diferentes pHs e tampões, além do efeito da concentração de NaCl. A influência da

presença de diferentes moléculas ligantes também foi avaliada. Assim, foi possível analisar o tipo de tampão onde a proteína se apresenta mais estável com maior valor da temperatura de *melting*. O equipamento utilizado para esse experimento foi o CFX96 *Real-Time System* (Bio-Rad). A proteína pura na concentração final de 0,5 mg/mL foi incubada nas diferentes condições (diferentes tampões e pHs) a serem testadas. A sonda *SYPRO orange* (Invitrogen) foi diluída em água e depois adicionada a solução contendo proteína nas diferentes condições, resultando em uma diluição de 1:2000. Logo após a adição da sonda, foram realizadas as medidas que, para a detecção da fluorescência, foi utilizada uma excitação a 490 nm e a emissão monitorada a 530 nm. As amostras foram aquecidas passando por um intervalo de temperaturas de 25 a 90 °C em um gradiente de 1°C/min. Todas as medidas foram feitas em triplicata para cada condição testada. A análise das curvas de desnaturação da proteína e obtenção do valor de  $T_m$ , para a posterior comparação, foram obtidos utilizando o programa Origin 8.6 (OriginLab) e a planilha Excel *DSF analysis tool*.

### 3.5. EXPERIMENTO DE DICROÍSMO CIRCULAR

Foi realizado o experimento de Dicroísmo Circular (CD) com finalidade de analisar a desnaturação térmica da amostra de BaBgl. O equipamento utilizado foi Jasco J-815. Uma cubeta com caminho ótico de 0,1 cm foi utilizada como porta amostra. Os experimentos foram realizados no Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Para o experimento, a amostra foi diluída em tampão Bis tris 10 mM, pH 6,5 até a concentração de 0,28 mg/mL. O mesmo tampão foi utilizado para o controle do experimento. Com essas amostras (tampão e enzima), foi realizado uma rampa de temperatura entre 20 e 90 °C, com incremento de 0,5 °C/min. A velocidade de escaneamento utilizada para coletar os espectros foi de 20 nm/min. Para as medidas, três comprimentos de onda foram selecionado: 222 e 208 nm, que indicam sinal de alfa-hélice e 215 nm, estrutura folhas betas. O espectro final é resultado de uma média de oito espectros coletados.

### 3.6. GEL FILTRAÇÃO ANALÍTICA

O estado oligomérico da proteína em solução foi testado utilizando o experimento de gel filtração analítica. O experimento foi realizado no equipamento de HPLC *AKTA Explorer 10 (GE-Healthcare)* e foi utilizada a coluna *Superdex 200 HR 16/60 (GE-Healthcare)* que apresenta um intervalo de separação de massa molecular de 10 a 600 kDa.

A determinação do peso molecular através da gel filtração é feita através da comparação entre o volume de eluição de substâncias padrões com massas moleculares conhecidas e o volume de eluição da proteína de interesse. As substâncias padrão utilizadas, fornecidas pelo fabricante, foram as seguintes: Ribonuclease A (13,7 kDa), Anidrase Carbônica (29 kDa), Ovoalbumina (44 kDa), Conalbumina (75 kDa), Aldose (158 kDa) e Ferritina (440 kDa), todas com concentrações de 4 mg/mL e volumes pré determinados pelo fabricante (GE Healthcare, 2006). A coluna foi previamente equilibrada com 2 volumes de coluna (120 mL) de tampão Bis tris 50 mM, pH 6,5.

O volume de eluição ( $V_e$ ) foi determinado para cada uma das amostras. O reagente *Blue Dextran 200*, também fornecido pelo fabricante, foi utilizado para determinar o volume morto ( $V_0$ ) da coluna. De posse desses valores foi possível calcular o coeficiente de partição ( $k_{av}$ ) para cada uma dessas substâncias segundo equação 1:

$$k_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad (1)$$

onde  $V_t$  é o volume total da coluna, no caso, 120 mL. O cálculo da massa molecular da proteína estudada, foi feito através da equação da reta da regressão linear obtida plotando os valores de  $k_{av}$  de cada substância padrão pelo logaritmo das suas respectivas massas molares.

### 3.7. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA *BaBgl*

#### 3.7.1. CURVA PADRÃO DE *pNP* e GLICOSE

Para os ensaios de atividade e cinética enzimática é necessário calcular a quantidade de produto liberado em cada reação. Para isso foram feitas curvas padrão com os produtos de cada reação. Nos ensaios cujos substratos utilizados foram sintéticos, foi realizada a curva padrão com o para-nitrofenol (*pNP*), enquanto que, nos ensaios com celobiose, a curva padrão foi feita com glicose.

Para a curva padrão de *pNP*, quantidades variadas de 2 a 9 nmol de *pNP* foram diluídas em volumes de 100  $\mu$ L de tampão Bis tris 50 mM, pH 6,5. Em seguida adicionou-se 100  $\mu$ L da solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 1 M. A leitura da absorbância ocorreu em um espectrofotômetro a 405 nm. Os dados foram plotados em um gráfico de valor de absorbância por quantidade de produto.

A curva padrão para a quantificação de glicose nas reações com celobiose, foi realizada variando-se quantidade de 0 a 45 nmol de glicose preparadas em volume de 100  $\mu$ L de tampão Bis tris 50 mM, pH 6,5. As soluções de glicose foram aquecidas a 95 °C por 5 minutos. Após esse tempo, com a amostra já resfriada, adicionou-se 100  $\mu$ L da solução do *kit* glicose PP (Analisa), que utiliza o método de glicose oxidase-peroxidase, GOD (KUNST, DRAEGER, ZIEGENHORN, 1984) para quantificação de glicose, e incubou-se a 37 °C por 15 min. A leitura da absorbância ocorreu em um espectrofotômetro a 495 nm. Os dados foram plotados em um gráfico de valor de absorbância por quantidade de produto.

As condições dos experimentos para determinar as curvas padrões foram exatamente as mesmas abordadas nos ensaios.

#### 3.7.2. DETERMINAÇÃO DE PH E TEMPERATURA ÓTIMAS DE ATIVIDADE DA *BaBgl*

A finalidade desse experimento foi determinar as melhores condições de atividade da *BaBgl* analisando o pH e a temperatura em que ela apresentava a



maior quantidade de formação do produto na reação com o substrato. O substrato utilizado para esse experimento foi o 4-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (pNPG) da *Sigma-Aldrich*, um substrato sintético cromogênico.

Primeiramente, foram realizados testes de atividade para determinar o pH ótimo da atividade enzimática. Para isso, foram preparadas sete reações, com pHs de 5,8 a 8, em triplicatas, compostas por 50  $\mu$ L de pNPG a 10 mM e 50  $\mu$ L de enzima BaBgl a 8  $\mu$ g/mL, ambos diluídos e preparados em 50 mM de tampão Bis tris nos diferentes pHs explorados. O comportamento do substrato em tampão sem enzima (branco) foi realizado nas mesmas condições das reações, um para cada pH, em triplicatas, com 50  $\mu$ L de pNPG a 10 mM e 50  $\mu$ L de tampão. Todos os ensaios, foram realizados a 45 °C por 10 minutos. A reação foi interrompida com a adição da solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 1 M. Nessas condições, o produto formado (pNP) 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 absorvância a 405 nm. As absorvâncias foram convertidas em mols de produto, utilizando a curva padrão de pNP. Esse procedimento de cessação da reação e leitura da absorvância será utilizado em todos os experimentos com pNPG e outros substratos sintéticos.

Para o teste de temperatura ótima, foi utilizado o tampão Bis tris, 50 mM, pH 6,5 (valor de pH determinado no experimento anterior). Foram realizadas dez reações, cada uma com 50  $\mu$ L de pNPG a 10 mM e 50  $\mu$ L de enzima Babgl a 8  $\mu$ g/mL diluídos e preparados em tampão já especificado. O branco foi feito nas mesmas condições da reação com 50  $\mu$ L de pNPG a 10 mM e 50  $\mu$ L de tampão. Os ensaios foram realizados em temperaturas variadas entre 10 e 70 °C, com passos de 5 °C, durante 10 minutos e em triplicatas. A reação foi interrompida adicionando-se 100  $\mu$ L de solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 1 M. A leitura da absorvância ocorreu em um espectrofotômetro a 405 nm.

Os dados dos ensaios para determinação de pH e temperatura ótima e, todos os ensaios de atividade descritos nas próximas seções, foram analisados utilizando os programas Origin 8.6 (OriginLab) e Excel (Microsoft).

### 3.7.3. ATIVIDADE RESIDUAL

Os experimentos de atividade residual foram realizados para testar a estabilidade da atividade enzimática no tempo em função da temperatura. Foram realizados dois tipos de teste: o primeiro para analisar a influência em diferentes tampões e o segundo para analisar a influência de monossacarídeos na estabilidade da enzima.

No primeiro teste, a enzima BaBgl (8 µg/mL) foi incubada em diferentes tampões, apresentados na tabela 3, a 45 e 30 ° C, durante 0, 10, 15, 20, 25, 30 e 60 minutos. Nesses tempos determinados, eram retiradas alíquotas da amostra para a realização do teste de atividade. Os testes de atividade foram realizados com 50 µL da amostra de enzima incubada em tampão, 50 µL de pNPG a 10 mM, diluído no mesmo tampão. O branco da reação foi feito com 50 µL de pNPG a 10 mM e 50 µL de tampão. A reação foi incubada a 45 °C. As reações foram interrompidas adicionando-se 100 µL de solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 1 M. A leitura da absorbância ocorreu em um espectrofotômetro a 405 nm.

Tabela 3: Relação dos tampões de incubação da enzima. pH dos tampões e temperatura de incubação da enzima nos tampões.

<b>Tampão</b>	<b>pH</b>	<b>Temperaturas de incubação (°C)</b>
Bis tris 50 mM	6,5	45 e 30
Citrato de sódio 50 mM	6,5	45
Citrato de sódio 50 mM	5,0	45 e 30

No segundo teste, a enzima BaBgl (1 µg/mL) foi incubada a 45 °C durante 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 minutos em tampão Bis tris 50 mM pH 6,5. A mesma incubação foi realizada acrescentando 1 M de glicose e em outra 1 M de galactose. Após os tempos de incubação, as alíquotas foram retiradas para o teste de atividade. As reações foram feitas com 50 µL de enzima incubada (3 amostras: pura, com glicose e com galactose) e 50 µL de pNPG a 10 mM diluído em tampão Bis tris 50 mM, pH 6,5. Os controles foram feitos nas mesmas condições da reação, porém, acrescentando somente o tampão com glicose ou com galactose. A

temperatura das reações foi de 30 °C e o tempo da reação foi de 5, 10, 20 e 40 minutos. A reação foi interrompida adicionando-se 100 µL de solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 1 M. A leitura da absorbância ocorreu em um espectrofotômetro a 405 nm.

#### 3.7.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA EM CELOBIOSE E pNPG

Os experimentos para calcular a quantidade em µmol de produto liberado por minuto de reação por miligrama de enzima (U/mg, onde U=µmol/min) foram realizados tanto com celobiose quanto com pNPG, como substratos.

A reação utilizando pNPG como substrato foi realizada com 50 µL de enzima a 1 µg/mL, 50 µL de pNPG a 10 mM, ambos diluídos em tampão Bis tris 50 mM pH 6,5. O tempo de reação foi de 5 minutos a 45 °C, feito em triplicatas. A reação foi interrompida adicionando-se 100 µL de solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 1 M. A leitura da absorbância ocorreu em um espectrofotômetro a 405 nm.

A reação utilizando a celobiose a 10 mM como substrato foi realizada nas mesmas condições do experimento com pNPG. Para interromper a reação, a mistura foi fervida a 95 °C por 5 minutos. Após esse tempo, com a amostra já resfriada, adicionou-se 100 µL da solução do *kit* glicose PP (Analisa) e incubou-se a 37 °C por 15 min. A leitura da absorbância ocorreu em um espectrofotômetro a 495 nm.

#### 3.7.5. INFLUÊNCIA DE ÍONS METÁLICOS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para testar a influência de íons metálicos na atividade da BaBgl, foram realizados testes de atividade na presença dos mesmos. A reação foi feita com 2 µL de enzima a 8 µg/ml, 50 µL de pNPG, 12,5 µL de íons metálicos a 5 mM diluídos em água e 35,5 µL de tampão. O tampão utilizado foi o Bis tris 50 mM, pH 6,5. O branco foi feito substituindo os 2 µL de enzima pelo tampão. A reação foi feita a 45 °C por 10 minutos, em triplicatas, e interrompida adicionando-se 100 µL de solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 1 M. A leitura da absorbância ocorreu em um espectrofotômetro a 405 nm.

### 3.7.6. ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM DIFERENTES SUBSTRATOS

Para testar se a enzima BaBgl tinha atividade em outros substratos sintéticos (todos com pNP como produto liberado), foi realizado o mesmo teste de atividade descrito na seção 3.6.4 para o pNPG. Os substratos utilizados foram: p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo, 4-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo, 4-nitrofenil- $\beta$ -D-celobiosídeo, 4-nitrofenil- $\beta$ -D-fucopiranosídeo, 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo, 2-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo, 4-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo e 4-nitrofenil- $\alpha$ -L-rhamnopiranosídeo. Todos os substrato foram preparados em concentração de 10 mM em tampão Bis tris 50 mM, pH 6,5.

### 3.7.7. CINÉTICA ENZIMÁTICA

A cinética enzimática é baseada em medidas da velocidade da reação catalisada pela enzima. A equação de Michaelis-Menten (Equação 2) relaciona a variação da velocidade de reação em função da concentração de substrato. 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, 1999).

$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]} \quad (2)$$

onde  $V$  = velocidade da reação,  $V_{max}$  = velocidade máxima, quando não há mais enzimas livres na reação,  $[S]$  = concentração de substrato e  $K_M$  é a *constante de Michaelis-Menten*.

Os experimentos para determinar as constantes cinéticas diretas como o  $V_{max}$  e  $K_M$ , a constante obtida indiretamente,  $K_{cat}$  (constante catalítica, calculada pela razão entre  $V_{max}$  e a concentração de enzima utilizada) e a eficiência da enzima ( $K_{cat}/K_M$ ), foram realizados da seguinte maneira: a reação foi preparada com 50  $\mu$ L de

enzima a 1,1 µg/mL e 50 µL de pNPG em concentrações variadas, ambos preparados em tampão Bis tris 50 mM, pH 6,5. As concentrações de pNPG utilizadas foram 0,005; 0,15; 0,4; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 14; 16; 18 e 20 mM. A temperatura das reações foi de 30 °C e os tempos de reação foram 10, 20, 30 e 40 minutos. As reações foram interrompidas adicionando-se 100 µL de solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 1 M. A leitura das absorvâncias ocorreu em um espectrofotômetro a 405 nm. Todas as reações foram feitas em triplicatas.

Os dados foram plotados em um gráfico de velocidade por concentração de substrato (pNPG). As constantes cinéticas foram obtidas com base no ajuste da curva ao modelo de Michaelis-Menten (Equação 2).

### 3.7.8. CINÉTICA ENZIMÁTICA COM INIBIDOR

O mesmo experimento descrito na seção 3.7.7 foi realizado para medir a inibição da enzima pela glicose. A reação e as concentrações de pNPG utilizadas foram as mesmas descritas, porém, em cada experimento, a enzima foi incubada com concentrações variadas de glicose (0; 3,5; 7; 14; 21 e 28 mM).

Os dados foram plotados em um gráfico de velocidade por concentração de substrato (pNPG), sendo uma curva para cada concentração de glicose. As constantes cinéticas foram obtidas com base na curva de Michaelis-Menten (Equação 2).

Os ensaios de cinética enzimática foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. 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 do mesmo Grupo.

## 3.8. TESTES DE TRANSGLICOSILAÇÃO

A ocorrência ou não de transglicosilação no mecanismo de catálise da enzima foi analisado através da reação descrita na seção 3.7.7. Depois da reação entre a enzima e o pNPG, metade da reação foi usada para medir a quantidade de pNP liberado através do procedimento descrito na seção 3.7.7 e a outra metade foi

usada para a medir a quantidade de glicose na reação através do procedimento de *kit* glicose PP (Analisa) descrito na seção 3.6.4. Foram plotados gráficos de velocidade de formação de produto pNP e glicose por concentração de pNPG. A forma das curvas fornece informações sobre a transglicosilação.

### 3.9. INFLUÊNCIA DE MONOSSACARÍDEOS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para analisar a influência de inibição/ativação dos monossacarídeos, foi realizado o mesmo teste de atividade descrito na seção 3.6.4 acrescentando em cada reação concentrações finais variadas de substratos. Os monossacarídeos utilizados foram: glicose, galactose, arabinose, manose, frutose, xilose e glucanolactona. As concentrações utilizadas foram de 0 a 1 M com passos de 0,1 M. A análise do efeito de inibição/ativação foi realizada plotando um gráfico de atividade relativa por concentração de monossacarídeos.

### 3.10. DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA DA PROTEÍNA

#### 3.10.1. CRISTALIZAÇÃO DA PROTEÍNA

A cristalização foi feita concentrando-se a proteína até 23 mg/mL em tampão Tris-HCl, 50 mM, pH 8,0. Para os testes de cristalização foi utilizada a técnica de difusão de vapor em gota sentada com o auxílio do robô micropipetador de precisão *Honeybee* (*Genomic Solutions*) e uma placa de cristalização com 96 poços. A gota era formada com 1  $\mu$ L da proteína e 1  $\mu$ L da solução dos *kits* comerciais de cristalização. O poço era preenchido com 80  $\mu$ L da mesma solução de cristalização. A placa foi vedada e mantida a 18 °C. Os kits comerciais utilizados para a cristalização foram: *Crystal Screen*, *Index* e *Additive Screen* da *Hampton Research* e *Classics Suite* e *MbClass Suite* da *Qiagen*.

As condições analisadas que apresentaram cristais foram otimizadas em uma placa de 24 poços variando-se a concentração do agente precipitante (PEG 3350) e o pH do tampão (Hepes) e, desta vez, utilizando a técnica de difusão de vapor em gota suspensa. O processo foi realizado manualmente com 2  $\mu$ L da enzima e 2  $\mu$ L da solução de cristalização. O poço foi preenchido com 300  $\mu$ L da solução de cristalização. A placa foi vedada e mantida a 18 °C.

### 3.10.2. COLETA DE DADOS E DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA

Os cristais obtidos foram utilizados para a coleta de dados de difração em uma fonte doméstica Rigaku UltraX-18, com anodo rotatório de cobre ( $\lambda = 1,542$  Å) operando em 50 kV e 100 mA e equipada com um detector do tipo placa de imagem Mar345 (MarResearch). Os cristais foram rapidamente transferidos para um fluxo de vapor de nitrogênio a 100 K, no qual foram mantidos durante toda a coleta de dados. A coleta foi realizada em 360 imagens com uma oscilação de 1 grau e um tempo de exposição de 10 minutos por imagem. O cristal foi mantido a uma distância de 200 mm do detector.

Ao final da coleta, o conjunto de dados foi processado utilizando o programa XDS (Kabsch, 2010) e escalonado utilizando o programa AIMLESS (Evans, 2011). A estrutura foi resolvida pelo método de substituição molecular, empregando a estrutura da  $\beta$ -glicosidase de *Thermotoga neapolitana* como modelo de busca (Pozzo et al., 2010) no programa PHASER (A J McCoy et al., 2007; Airlie J McCoy, 2007). O refinamento da estrutura foi realizado em ciclos interativos de reconstrução manual no programa Coot (Emsley & Cowtan, 2004) e ciclos de refinamento no espaço recíproco com o programa PHENIX.REFINE (Afonine et al., 2012). Finalmente, o modelo final foi validado através da ferramenta MOLPROBITY (Chen et al., 2010).

### 3.11. AVALIAÇÃO EXPLORATÓRIA DA FUNÇÃO DO DOMÍNIO DE FIBRONECTINA

A função do domínio fibronectina (FnIII) na atividade das  $\beta$ -glicosidases ainda não está completamente estabelecida. Alguns estudos, realizados em  $\beta$ -glicosidase de *Aspergillus niger* sustentam a hipótese de que o domínio apresenta a função de ancoragem da enzima ao substrato, aumentando a concentração de BGL no substrato (Lima et al., 2013). Esta seção descreve alguns experimentos preliminares sobre a função do FnIII na BaBgl.

#### 3.11.1. CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS DOMÍNIOS SEPARADOS DA BaBgl

Foram clonados e purificados domínios separados da Babgl, catalítico (CCD) e FnIII. Os métodos de clonagem, expressão e purificação foram idênticos aos usados para a proteína inteira e, portanto, correspondem aos descritos nas seções 3.1, 3.2 e 3.3. A única diferença foi o pH do tampão utilizado (seção 3.3.4) que no caso do domínio FnIII foi o pH 7,0, pois a proteína se desenovelava em pH 8,0.

#### 3.11.2. TESTES DE PULL DOWN

Os testes, preliminares, de *pull down* foram testes qualitativos para analisar a adsorção da BaBgl inteira, do domínio CCD e do domínio FnIII sobre a lignina, celulose microcristalina (Avicel) e papel filtro. Os testes foram realizados adicionando-se 300  $\mu$ L de BaBgl, CCD ou FnIII (um teste para cada domínio) a 1 mg/mL em 1 mg de lignina, Avicel ou papel filtro. Os volumes foram completados para 2 mL com tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,5 em tubos do tipo *ependorf* de 2 mL. As reações foram realizadas a 45 °C durante 30 min sob agitação constante de 130 rpm.



Após esse período as amostras foram centrifugadas a 15.000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi totalmente retirado do substrato insolúvel e foi retirada uma alíquota. As amostras foram ressuspensas no mesmo tampão utilizado para a reação, novamente com um volume final de 2 mL. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas novamente a 15.000 g por 15 minutos e separadas do sobrenadante. Esse procedimento de lavagem foi repetido por mais duas vezes. Todas as alíquotas dos sobrenadantes foram utilizadas para a análise em gel SDS-PAGE.

### 3.11.3. ENSAIOS ENZIMÁTICOS COMPARATIVOS ENTRE A BaBgl INTEIRA E O DOMÍNIO CCD

Com o objetivo de comparar a atividade específica da BaBgl com e sem o domínio de FnIII, foram realizados ensaios enzimáticos com a BBbgl inteira e apenas o CCD. Os experimentos foram realizados com dois substratos: celobiose e pNPG.

Nos testes com pNPG a reação foi feita com 50 µL da enzima (inteira ou CCD) a 8 µg/mL e 50 µL de pNPG a 10 mM, ambos preparados em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5,5. Esse experimento foi realizado a 45 °C por 10 minutos em triplicatas. A reação foi interrompida adicionando-se 100 µL de solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 1 M. A leitura da absorbância ocorreu em um espectrofotômetro a 405 nm.

A reação utilizando celobiose a 10 mM como substrato foi realizada nas mesmas condições do experimento com pNPG. Para interromper a reação, a mistura foi aquecida a 95 °C por 5 minutos. Após esse tempo, com a amostra já resfriada, adicionou-se 100 µL da solução do *kit* glicose PP (Analisa) e incubou-se a 37 °C por 15 min. A leitura da absorbância ocorreu em um espectrofotômetro a 495 nm.

### 3.12. REFINAMENTO E ANÁLISE ESTRUTURAL DE DUAS $\beta$ -GLICOSIDASES DA FAMÍLIA GH 1 (*ThBgl1* e *ThBgl2*)

Nesse projeto foram feitas análise e comparações estruturais da BaBgl com duas enzimas  $\beta$ -glicosidases de *Trichoderma harzianum* (*ThBgl1* e *ThBgl2*), cujas descrições de cristalização foram descritas na dissertação de mestrado de Hêmily S. Mutti (Mutti, 2014). Os programas utilizados para refinar os dados foram os mesmos decrits na seção 3.10.2 deste capítulo.

## Capítulo 4

# Resultados e discussões

---

Neste capítulo serão apresentados todos os resultados obtidos a partir da caracterização bioquímica e estrutural da enzima BaBgl3, bem como da análise da relação estrutura-atividade das enzimas ThBgl1 e ThBgl2.

#### 4.1. CLONAGEM E TRANSFORMAÇÃO

Foi feita a amplificação por PCR (*Polimerase chain reaction*) do gene a partir do DNA genômico de *B. adolescentis* utilizando oligonucleotídeos específicos. A amplificação gerou fragmentos com 2.256 pares de base. Através do método LIC de clonagem, os fragmentos foram clonados e as colônias que continham o gene de interesse foram selecionadas e transformadas em células de *E. coli* competentes (Rosetta) para expressão da proteína. Foi feito um estoque em 20% de glicerol das colônias selecionadas e foram congeladas a -80 °C. Deste modo, todos os experimentos foram realizados com proteínas expressas a partir desses clones congelados.

Essa proteína possui 751 aminoácidos em sua sequência. Através do programa *online ProtParam* (<http://www.expasy.org/>) foi possível estimar o peso molecular teórico da proteína em 81,121 kDa. Além disso, o programa fornece a quantidade de cada um dos vinte aminoácidos, como mostrado na tabela 4.

Tabela 4: Quantidade de resíduos de aminoácidos que compõem a sequência da proteína. Dados tirados do programa online Expasy/ProtParam.

<b>Resíduo</b>	<b>Quantidade</b>
Alanina	89
Arginina	26
Asparagina	34
Aspartato	54
Cisteína	4
Glutamina	19
Glutamato	53
Glicina	64

Continuação tabela 4.

Histidina	16
Isoleucina	35
Leucina	54
Lisina	32
Metionina	22
Fenilalanina	25
Prolina	37
Serina	46
Treonina	40
Triptofano	14
Tirosina	23
Valina	64

---

#### 4.2. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA BaBgl

As alíquotas colhidas após cada passo de expressão e purificação, foram aplicadas em um gel SDS-PAGE com a finalidade de verificar a existência da proteína em cada etapa. No gel apresentado na figura 15 a, os números marcados de 1 a 10, correspondem às amostras das alíquotas das seguintes etapas:

- Coluna 1: marcador padrão de baixo peso molecular.
- Coluna 2: antes da indução, crescimento das bactérias.
- Coluna 3: após a indução, a banda mais larga, por volta de 94 kDa, corresponde à proteína.
- Coluna 4: *flow through*, corresponde a fração de proteína que não apresentou afinidade com a resina de Ni<sup>2+</sup> bem como proteínas contaminantes que não foram de interesse.
- Colunas 5, 6, 7 e 8: são as frações correspondentes às lavagens da coluna com tampão contendo 5, 10, 25 e 50 mM de imidazol respectivamente. Nessas frações, nota-se a presença de alguns contaminantes que tinham fraca afinidade com a resina. Na coluna 8 é possível observar que há uma quantidade significativa da proteína de interesse.

- Colunas 9 e 10: são as frações correspondentes à eluição da proteína numa concentração de imidazol de 130 e 200 mM. A maior parte da proteína se desligou da coluna quando foi utilizado o tampão com 130 mM de imidazol, porém uma parte da proteína ainda ficou na coluna, sendo eluída apenas com 200 mM de imidazol.

A análise do gel indicou que a maior parte dos contaminantes contidos no extrato bruto foram eliminados, porém alguns contaminantes ainda restaram e também o domínio de tiorredoxina e a cauda de histidina. Por isso as amostras que continham a proteína em maior grau de pureza, frações com 130 e 200 mM de imidazol, foram concentradas e diluídas em tampão sem imidazol (50 mM de Tris-HCl e 300 mM de NaCl, pH 8,0) até atingir a concentração máxima de 20 mM de imidazol. O gel da figura 15 b comprova a clivagem da cauda de histidina e TRX: na coluna 2 é apresentada uma alíquota da amostra antes da clivagem com a TEV e nas colunas 3 e 4, estão alíquotas da amostra após clivagem com TEV. A proteína sem TRX e cauda de histidina apresentou, pela análise do gel, um peso molecular por volta de 80 kDa, em conformidade com a predição teórica.

Após clivagem com TEV a amostra passou novamente pela segunda etapa de purificação por cromatografia de afinidade, desta vez para remover a TRX e a cauda de hexahistidina, já clivadas, da solução. Como após esse processo ainda haviam alguns contaminantes, mais uma etapa de purificação foi realizada. As colunas de 1 a 10 da figura 15 c, são referente às frações da purificação por cromatografia de exclusão molecular. É possível observar que são amostras praticamente sem contaminantes. As frações referentes as colunas de 4 a 7 no gel, apresentaram grau de pureza mais elevado.

Ao final das etapas de purificação, mediu-se a quantidade de enzima com alto grau de pureza, obtendo-se cerca de 23 mg de enzima por litro de cultura. Essas amostras foram utilizadas nos experimentos de atividade e ensaios cinéticos.

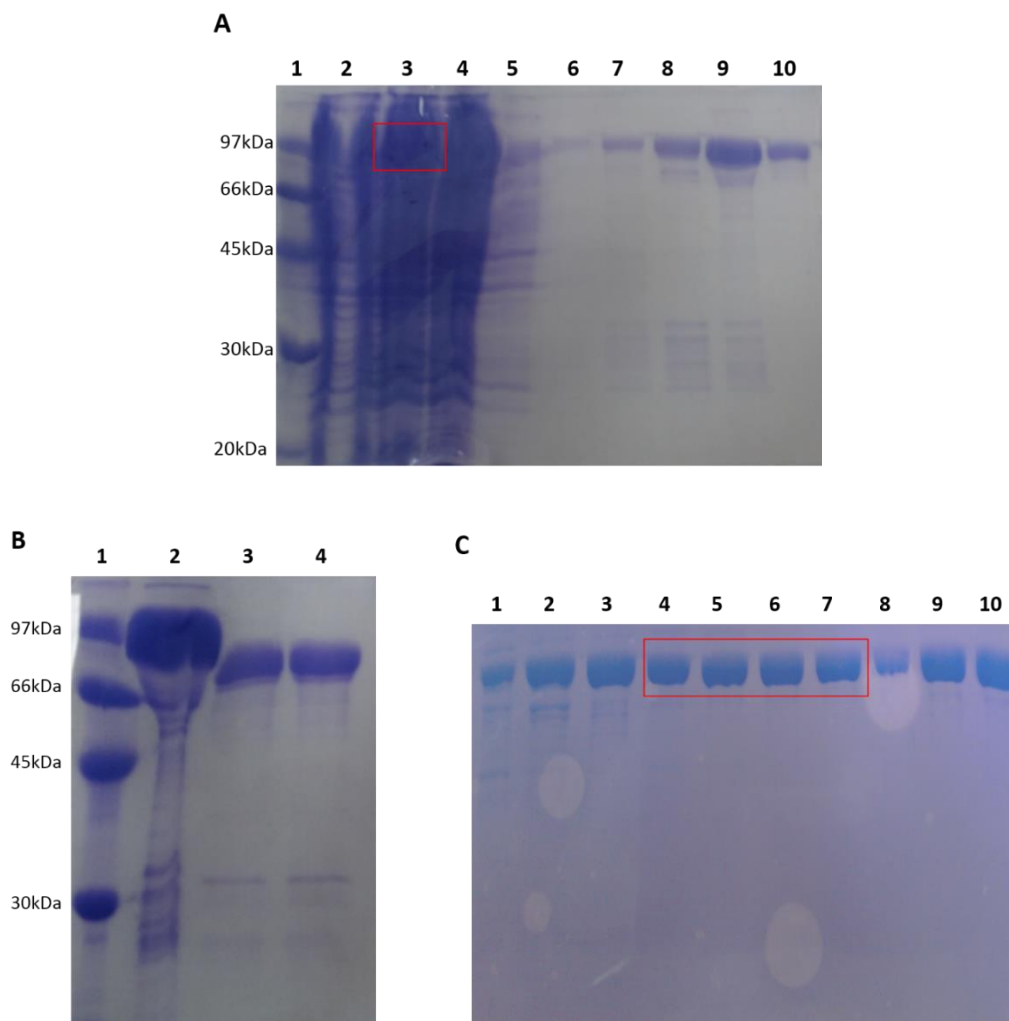


Figura 15: Eletroforese em gel SDS-PAGE. A) Primeira etapa de purificação. Coluna 1: marcador molecular de baixo peso (97 kDa a 14 kDa). Coluna 2: antes da indução. Coluna 3: após a indução. Coluna 4: *flow through*. Colunas 5 a 10: gradiente de concentrações de imidazol para lavagem e eluição da proteína (5, 10, 25, 50, 130 e 200 mM). B) Clivagem do domínio de TRX e cauda de histidina com TEV. Coluna 1: marcador molecular de baixo peso (97 kDa a 14 kDa). Coluna 2: proteína antes da clivagem. Coluna 3 e 4: proteína sem TRX e sem cauda de histidina. C) Terceira etapa de purificação por cromatografia de exclusão molecular. Colunas 1 a 10: frações de proteína eluída.

### 4.3. ANÁLISE DA ESTABILIDADE TÉRMICA DA *BaBgl*

#### 4.3.1. FLUORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSF)

Através da técnica de fluorimetria diferencial de varredura, também conhecida como *Thermofluor*, foi possível analisar o tipo de tampão, pH, quantidade de sal em solução que a enzima é mais estável. Além disso, foi analisada também a

estabilidade da proteína na presença de alguns aditivos metálicos e na presença de alguns monossacarídeos.

A análise da  $T_M$  da proteína variando com pH entre 3 e 9 e com concentrações crescentes de sal (NaCl) de 0 a 500 mM, está representada nos gráficos a e b da figura 16. A figura 16 mostra que a proteína é mais estável em pH 6,5, resultado que vai de acordo com a maioria das  $\beta$ -glicosidases bacterianas, que possuem estabilidade em pH neutro (Cairns & Esen, 2010).

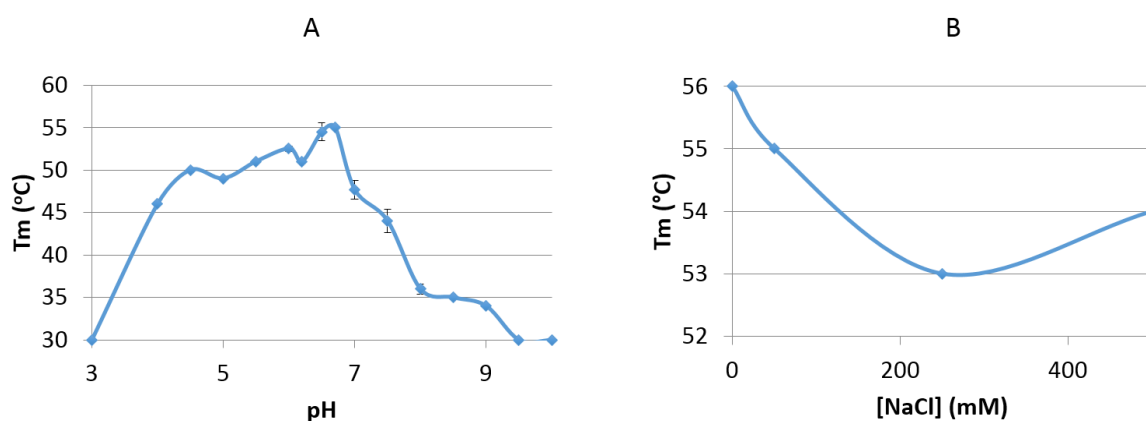


Figura 16: Fluorimetria de Diferencial de Varredura. A) Variação do  $T_M$  em função do pH. B) Variação do  $T_M$  em função da concentração de NaCl.

Experimentos de DSF para analisar a influência de tampões também foram analisados. Esse experimento é crucial para determinar o tipo e o pH do tampão utilizado para purificação e manutenção da enzima. O gráfico da figura 17, mostra os valores do  $T_M$  em diferentes tampões com diferentes pHs. Os resultados demonstram que essa enzima é estável em um grande intervalo de pHs, com perda de sua estabilidade somente para pHs extremos, entretanto, com uma preferência por tampões que exploram os pHs mais ácidos. Dentre as condições testadas, o tampão que assegurou uma maior estabilidade estrutural da proteína frente ao desenovelamento térmico foi o citrato de sódio pH 5,5, com o  $T_M$  de 53 °C, seguido pelos tampões bis-tris pH 6,5, fosfato de sódio pH 5,5 e fosfato de potássio pH 6,0, esses com  $T_M$  de 52 °C.



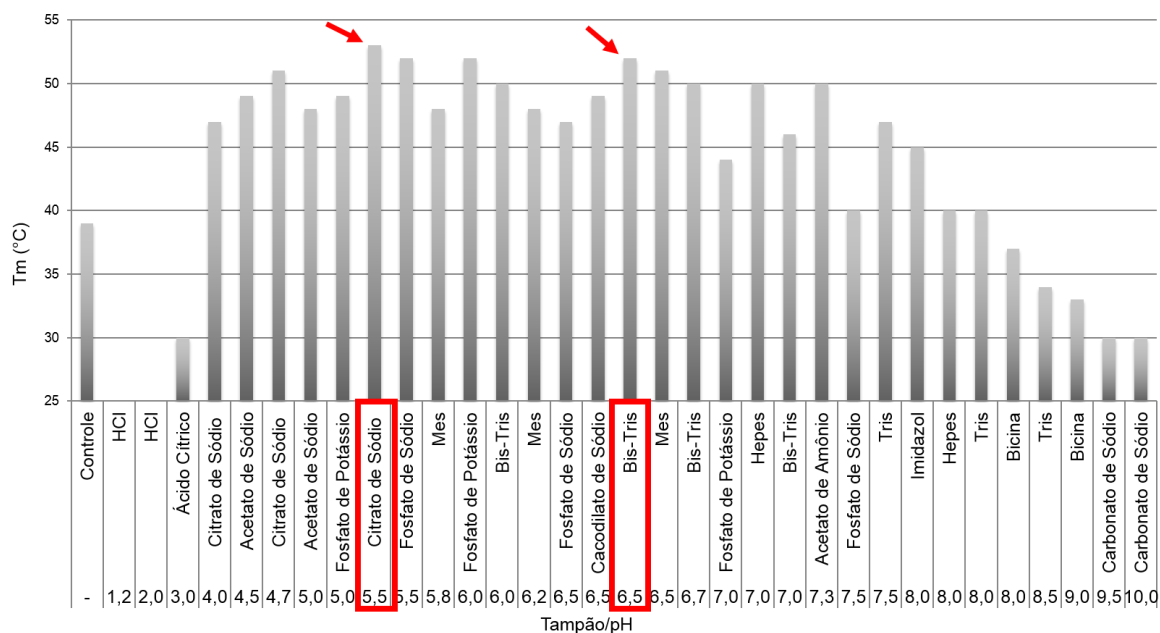


Figura 17: Gráfico obtido pela análise de ThermoFluor que apresenta a variação da temperatura de Melting ( $T_m$ ) da enzima BaBgl dependente das diferentes condições tamponantes. Marcados em vermelho estão os tampões que apresentaram as melhores condições.

Além de analisar a influência do tampão, foi examinada a importância de moléculas aditivas na estabilização da proteína, apresentadas na figura 18. Para isso, a enzima foi incubada com alguns metais multivalentes e sais. Nesse experimento foi analisado se o aditivo era capaz de assegurar valores de  $T_m$  superiores a do controle (enzima em umas das melhores condições tamponantes observadas anteriormente - bis-tris pH 6,5). Somente o metal bário gerou um aumento significativo na  $T_m$  da enzima, que foi cerca de 2,5 °C.

Foi realizado também, no mesmo tampão e pH, teste de thermofluor com alguns monossacarídeos como glicose, arabinose, frutose, galactose, glicanolactona, manose e xilose. Os resultados apresentados na figura 19, mostram que nenhum dos monossacarídeos testados alterou a estabilidade da enzima. A única exceção é a glucanolactona que estabiliza a enzima, aumentando sua temperatura de *melting* em 5°C. Este aditivo é conhecido por ter forte efeito inibitório em  $\beta$ -glicosidases com uma interação tão forte que pode ser considerada irreversível.

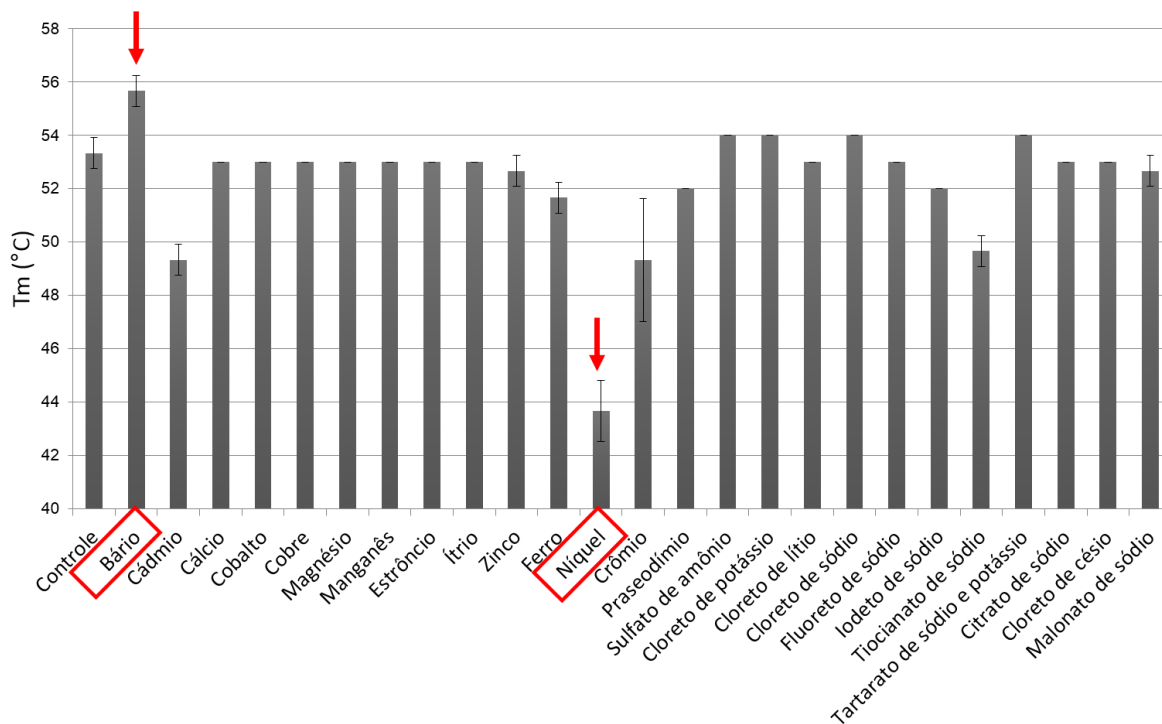


Figura 18: Gráfico de *thermofluor* de variação do Tm da enzima BaBgl com adição de aditivos. Marcados em vermelho, os metais que resultaram em aumento e perda mais significativas da Tm.

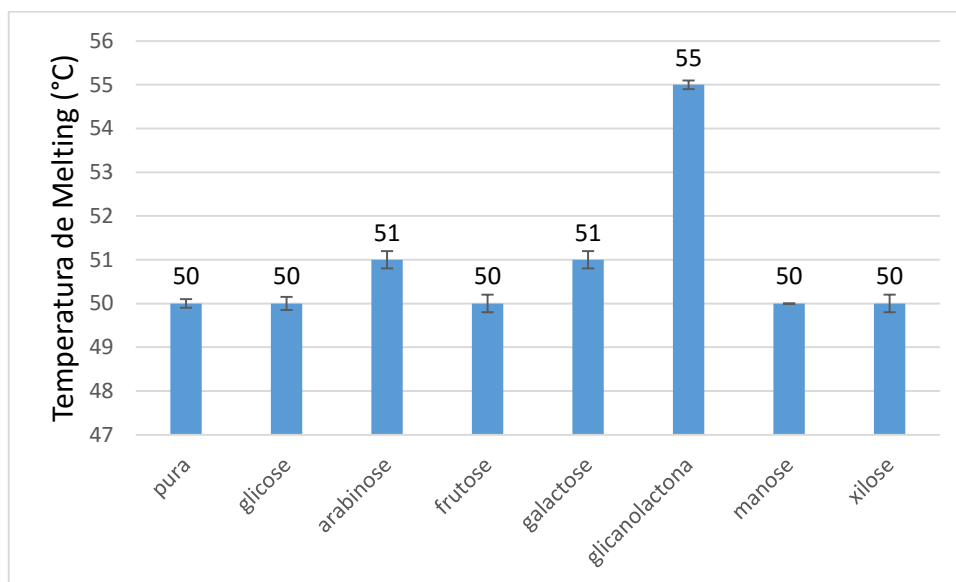


Figura 19: Gráfico de *thermofluor* de variação do Tm da enzima Babgl com adição de monossacarídeos.

Em resumo os testes de DSF indicaram estabilidade da Babgl em tampão Bis Tris com pH de 6,5 e com ausência de sal. Com relação aos pHs, a enzima apresentou perda de enovelamento nos valores extremos de pH. Além disso a análise com aditivos e com ligantes indicou que o bário é o metal que apresenta diferença significativa na estabilidade da enzima aumentando sua  $T_M$ , assim como o a glucanolactona.

#### 4.3.2. ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR (CD)

Os experimentos de dicroísmo circular foram realizados com a finalidade de complementar os experimentos de fluorimetria diferencial de varredura, detalhando os processos de desnaturação térmica da BaBgl e avaliando a temperatura de *melting* por esta técnica.

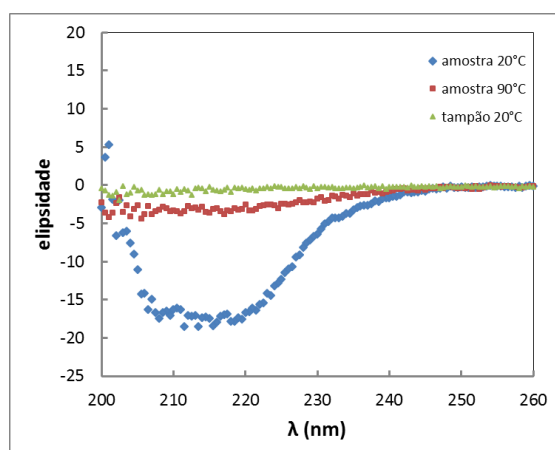


Figura 20: Espectro de dicroísmo circular (CD) da Babgl a 20 °C e a 90 °C.

A rampa de temperatura entre 20 °C e 90 °C, indicou a desnaturação térmica da proteína, resultado que pode ser observado no espectro a 90 °C da figura 20. O perfil de desnaturação em determinados comprimentos de onda, 208, 222 nm, da figura 21, indicou perda de estrutura secundária em alfa-hélice. Enquanto que o espectro a 215 nm, da figura 22, indica a perda de estruturas beta em função da temperatura. Nos três espectros (figuras 21 e 22) observa-se que a elipsidade possui valores baixos no início, indicando que a proteína está enovelada. Em seguida os

valores de elipsidade se aproximam de zero, indicando a perda de elementos de estrutura secundária a 45 °C. Diferente do que foi observado nos espectros de DSF, a desnaturação térmica acompanhada pelo CD revelou uma segunda transição ocorrendo entre 85 e 90 °C. Uma vez que o CD monitora o conteúdo de estrutura secundária da proteína durante o processo de desenovelamento, é possível inferir que a transição entre o estado enovelado e desenovelado ocorra através de um estado intermediário já inativo.

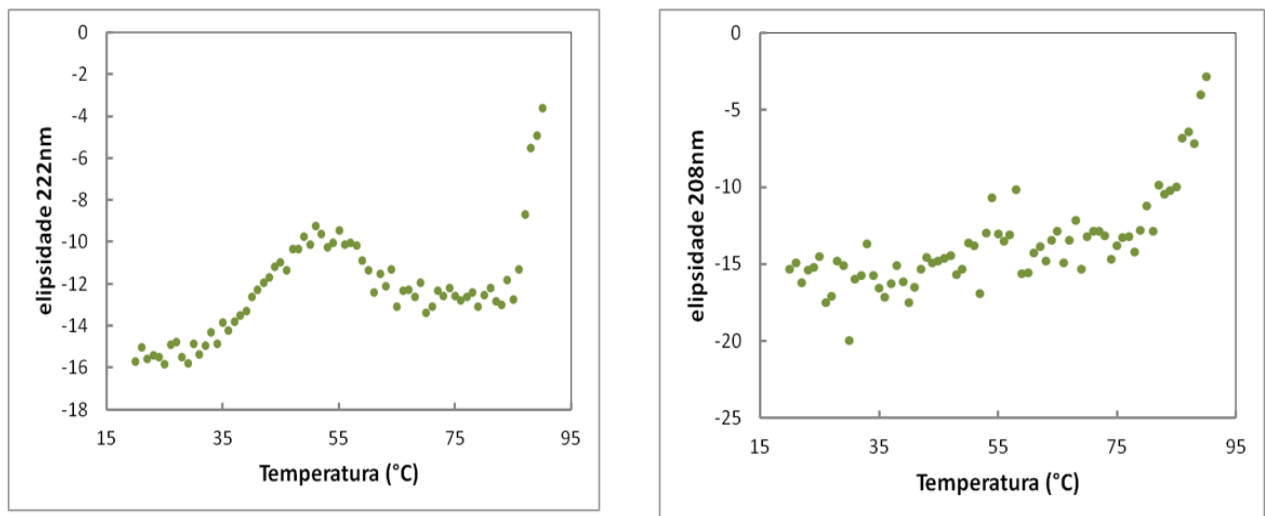


Figura 21: Perfil de desnaturação térmica da Babgl em comprimentos de onda de 208 e 222 nm, indicando sinal de alfa-hélice.

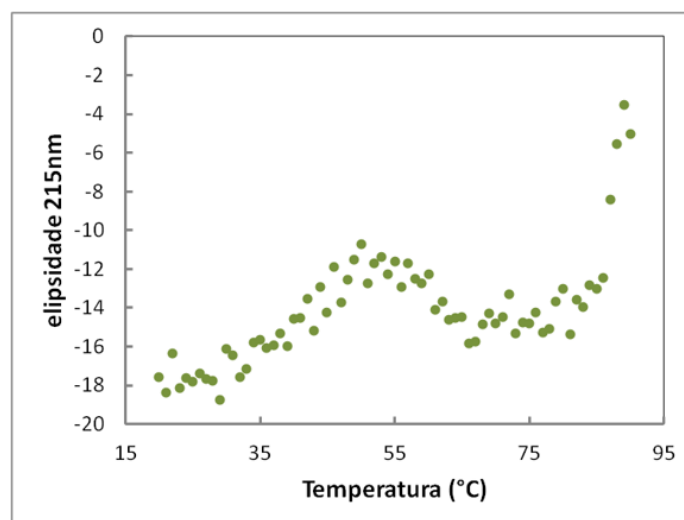


Figura 22: Perfil de desnaturação térmica da Babgl em comprimento de onda de 245 nm, indicando sinal de folhas betas

Os resultados de CD apontaram que o perfil de desnaturação térmica da Babgl aparenta ocorrer através de estados intermediários. Ou seja, sugere que o mecanismo de desnaturação enzima não é apenas a forma nativa gerando forma desnaturada, mas existem diferentes formas desnaturadas com estruturas diferentes. Uma hipótese para os resultados observados é que as transições observadas em 45 °C e 85 °C correspondam a perdas locais e globais de estruturas secundárias, respectivamente. Esta observação pode estar ligada a diferentes temperaturas de desnaturação para cada um dos domínios da BaBgl.

#### 4.4. ANÁLISE DO ESTADO OLIGOMÉRICO DA BaBgl EM SOLUÇÃO

O experimento de gel filtração analítica foi capaz de fornecer informações sobre a massa molecular da BaBgl e, conseqüentemente o estado oligomérico da proteína em solução mediante comparação com os volumes de eluição da enzima com volumes de eluição das proteínas padrão.

Na figura 23 estão os cromatogramas das misturas das proteínas utilizadas como padrão: mistura A: ferritina, conalbumina, anidrase carbônica e ribonuclease. Mistura B: aldose e ovoalbumina. E no terceiro cromatograma, *Bluedextran*. Os volumes de eluição, determinados pelos cromatogramas, estão na tabela 5 assim como suas respectivas massas moleculares.

Com o volumes de eluição ( $V_e$ ) de cada proteína padrão, o volume da coluna ( $V_t$ ) e o volume morto da coluna ( $V_0$ ), determinado pelo volume de eluição do *Bluedextran* (44,195 mL), calculou-se o valor de  $K_{av}$  de cada proteína padrão, através da equação 1, apresentados na tabela 5. Os valores de  $K_{av}$  foram plotados contra os logaritmos das respectivas massas moleculares (MW), figura 24 a. A equação da reta que determinou o comportamento da curva foi  $K_{av} = - 0,33105 \log(MW) + 2,07099$ , com  $R^2=0,9946$ . O valor teórico do volume de eluição da Babgl calculado pela equação da reta com MW de 81,121 kDa, foi de 77,93 mL. Esse valor condiz com o observado no cromatograma da Babgl, 79,230 mL, figura 24 b, demonstrando que a proteína encontra-se monomérica em solução.

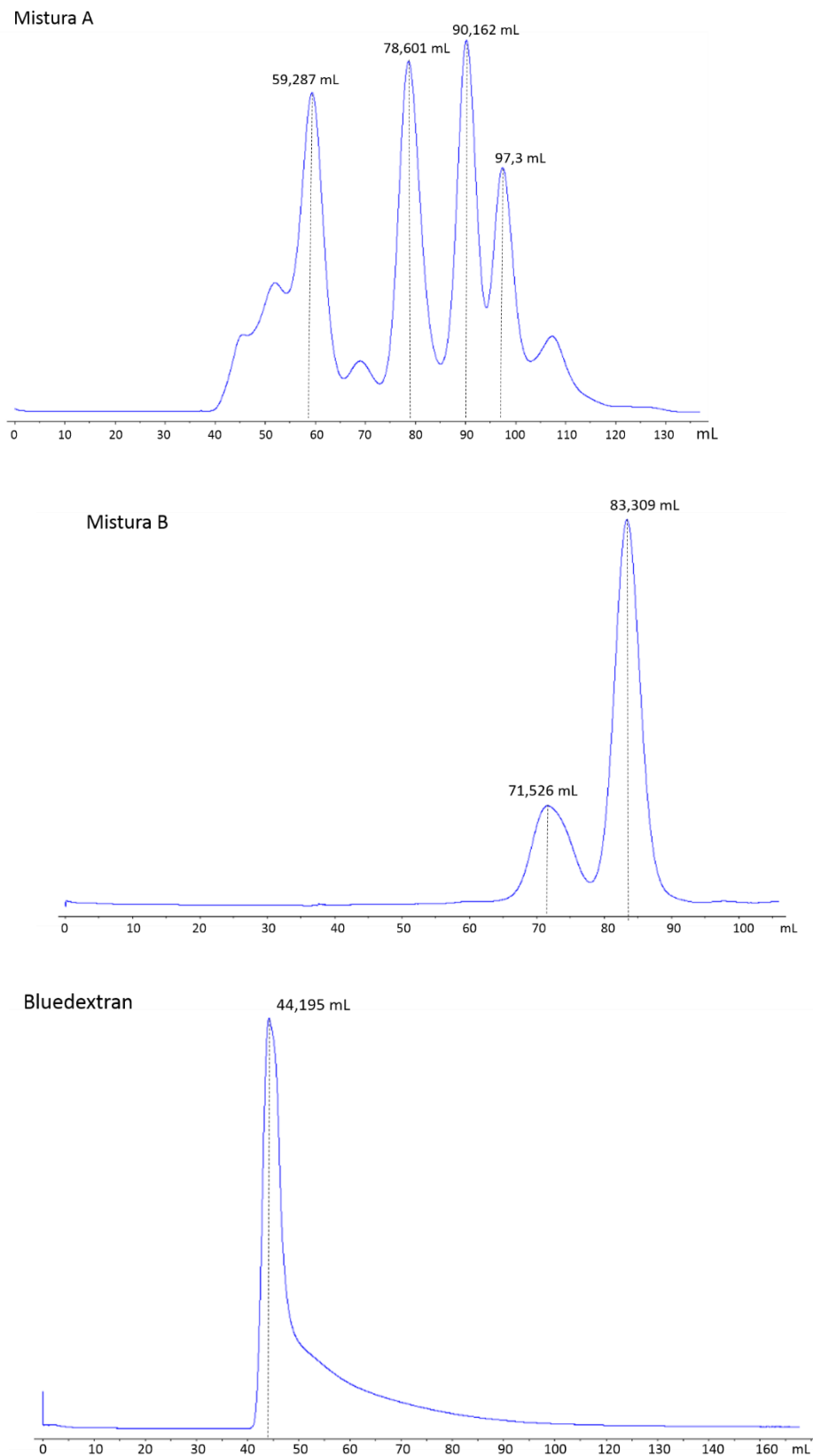


Figura 23: Cromatograma, com absorvância de 280 nm, das purificações das misturas das proteínas padrão. Mistura A: ferritina + conalbumina + anidrase carbônica + ribonuclease. Mistura B: aldose e ovoalbumina. Bluedextran. Os volumes de eluição de cada uma estão marcados acima dos picos.

Tabela 5: Valores de massa molecular (MW), volumes de eluição ( $V_e$ ) obtidos a partir dos cromatogramas da figura 23 e valores de  $K_{av}$  calculados pela equação 1 das proteínas padrão.

Proteína padrão	MW (kDa)	$V_e$ (mL)	$k_{av}$
Ferritina	440,0	59,29	0,20
Conalbumina	75,0	78,60	0,45
Anidrase carbônica	29,0	90,16	0,61
Ribonuclease	13,7	97,30	0,70
Aldose	158,0	71,53	0,36
Ovoalbumina	44,0	83,31	0,52

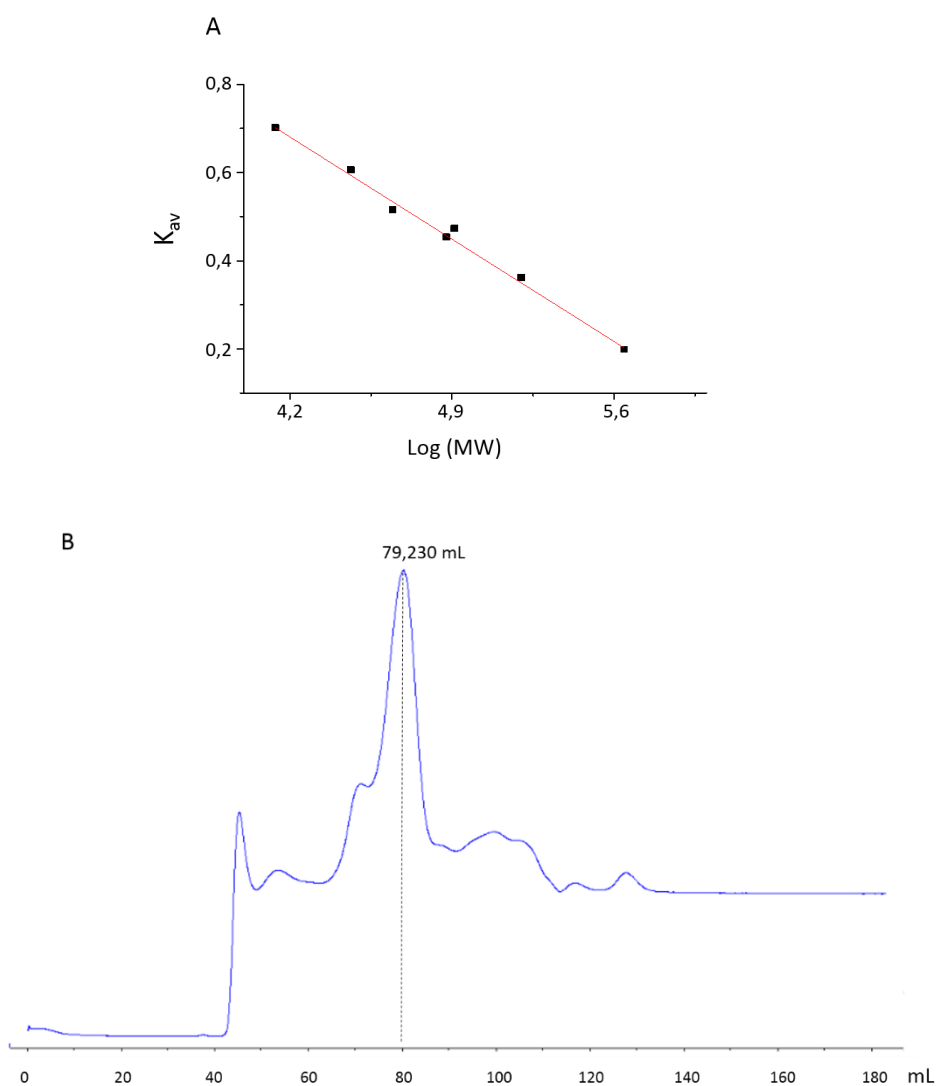


Figura 24: A) curva de calibração da coluna *Superdex 200 16/60* utilizando proteínas padrão. B) cromatograma de purificação da Babgl com seu respectivo volume de eluição.

## 4.5. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA BaBgl

A enzima BaBgl foi caracterizada bioquimicamente através da determinação das condições ótimas de atividade, valores de atividades específicas e constantes cinéticas.

### 4.5.1. CURVA PADRÃO PARA OS EXPERIMENTOS DE ENSAIOS DE ATIVIDADE

A curva padrão da figura 25 foi utilizada para determinar a quantidade glicose liberada nas reações da BaBgl com a celobiose. A equação da reta plotada a partir dos dados de absorbância a 490 nm por quantidade de glicose em nmol foi:  $y=0,0155x+0,1172$  com  $R^2=0,9963$ .

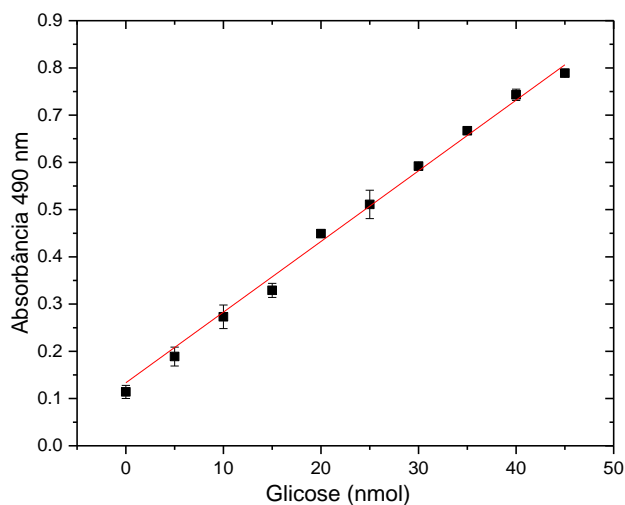


Figura 25: Curva padrão de glicose para calcular quantidade de produto liberado em ensaios enzimático que utilizam celobiose como substrato.

A figura 26 apresenta a curva padrão utilizada para o calcular a quantidade de pNP liberado nas reações de BaBgl com os substratos sintéticos utilizados, como o pNPG. A equação obtida pelo gráfico de absorbância a 405 nm contra quantidade de pNP em nmol foi:  $y=0,0432x+0,0484$ , com  $R^2=0,9977$ .



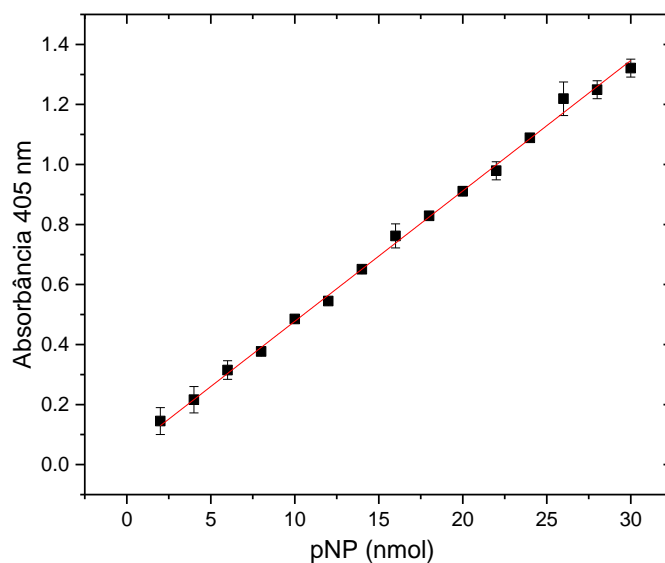


Figura 26: Curva padrão de pNP utilizada para calcular quantidade de produto liberado em reações que utilizam substratos sintéticos como p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo, 4-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo, 4-nitrofenil- $\beta$ -D-celobiosídeo, 4-nitrofenil- $\beta$ -D-fucopiranosídeo, 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo, 2-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo, 4-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo e 4-nitrofenil- $\alpha$ -L-rhamnopiranosídeo.

#### 4.5.2. DETERMINAÇÃO DE PH E TEMPERATURA ÓTIMA

Os gráficos das figuras 27 e 28 apresentam os perfis de atividade relativa da enzima, em pNPG, dependente do pH da solução e a da temperatura, respectivamente. A BaBgl apresentou melhor atividade em pH entre 6,0 e 6,5 e na temperatura de 45 °C. Esses resultados vão de acordo com a maioria das  $\beta$ -glicosidases bacterianas apresentam temperatura ótima entre 40 °C e 50°C e pH próximo da neutralidade (Wolosowska & Synowiecki, 2004), como a  $\beta$ -glucosidase de *Thermotoga neapolitana* que possui maior atividade em pH 5,6 (Pozzo et al., 2010).

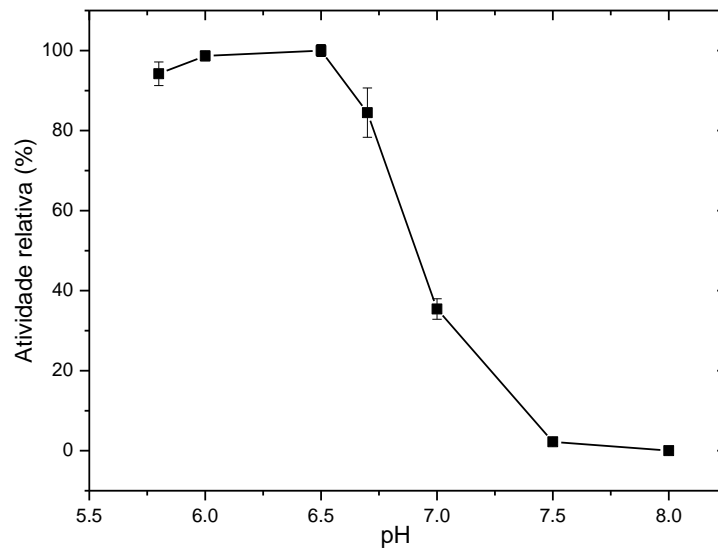


Figura 27: Perfil de dependência da atividade relativa da enzima com a variação de pH.

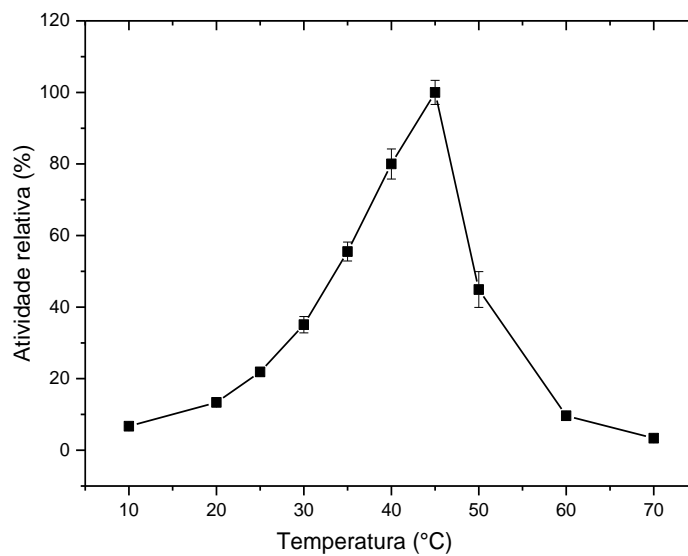


Figura 28: Perfil de dependência da atividade relativa da enzima com a variação de temperatura.

#### 4.5.3 ATIVIDADE RESIDUAL DA BaBgl

A atividade residual permitiu observar o tempo de meia vida da BaBgl em diversos tampões com diferentes pHs e temperaturas de incubação. O gráfico da

figura 29 apresenta os dados de atividade relativa por tempo de incubação da BaBgl. Dos tampões indicados na tabela 3, o Bis tris no pH 6,5 com temperatura de incubação de 30 °C foi o que manteve a enzima com maior atividade por mais tempo. Neste tampão, aproximando os dados para uma curva típica de decaimento exponencial de ordem 1, foi possível calcular o tempo aproximado de meia vida de  $120\pm 5$  minutos a 30 °C. A BaBgl incubada no mesmo tampão Bis tris com pH de 6,5, porém a 45 °C apresentou tempo de meia vida inferior a 10 minutos, indicando que neste caso a temperatura de incubação foi determinante para o tempo de atividade da enzima e não o pH da solução. Todas as outras condições testadas resultaram em tempo de meia vida também inferior a 10 minutos, incluindo a incubação no tampão citrato de sódio em pH 5,0 a temperatura de 30 °C. Neste caso, a temperatura não foi crucial para o tempo de meia vida e sim o tampão empregado, resultado esse que vai de acordo com o resultado observado com DSF.

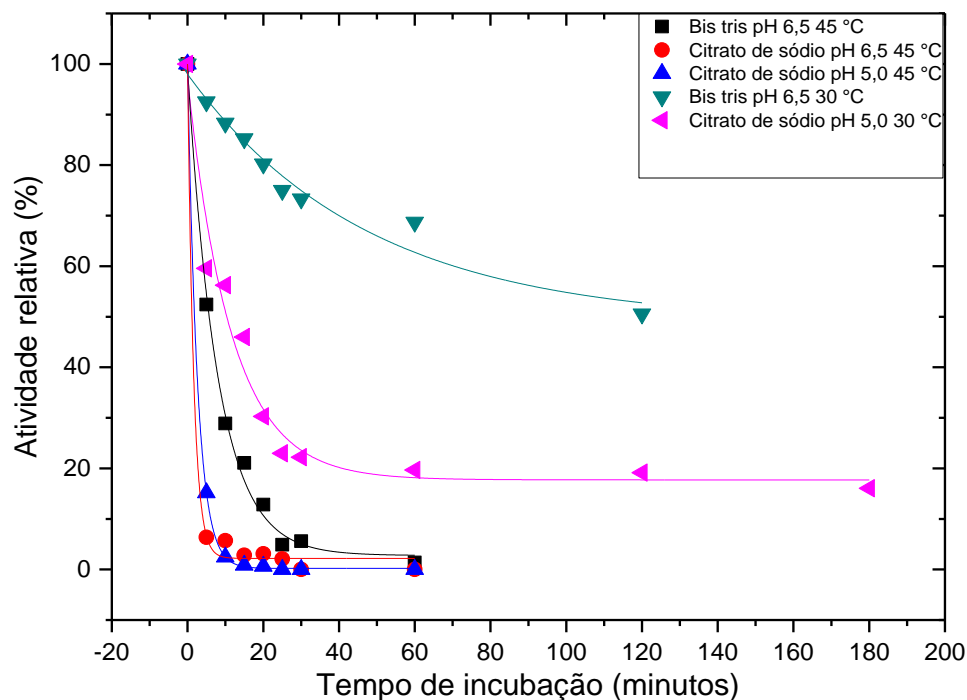


Figura 29: Atividade residual da enzima Babgl. Valores apresentados em termos de atividade relativa por tempo de incubação da enzima em minutos. Tampões utilizados para incubação foram os apresentados na tabela 3.

#### 4.5.4. ATIVIDADE ESPECÍFICA DA ENZIMA EM pNPG

Diante dos resultados de pH e temperatura ótima, foi medida a atividade específica da BaBgl contra pNPG. Na temperatura de 45 °C e pH 6,5, o resultado foi de  $40 \pm 1$  U  $\text{mg}^{-1}$ , valor calculado com base na equação da curva padrão de pNP apresentado na seção 4.5.1.

Em muitos testes realizados foram usadas frações de estoque congelado a -80 °C de Babgl com 20% de glicerol para manter a estabilidade da enzima. Um teste feito com a Babgl com glicerol congelada por 33 dias, apresentou uma atividade específica de  $150 \pm 4$  U  $\text{mg}^{-1}$ . Esse valor representa quase quatro vezes mais atividade que a enzima fresca sem glicerol do mesmo lote de purificação. Esse fato indica que o glicerol, provavelmente, fornece maior estabilidade à enzima, aumentando o tempo de meia vida.

#### 4.5.5. INFLUÊNCIA DE ÍONS METÁLICOS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A influência dos íons metálicos na atividade enzimática foi testada. A atividade relativa da enzima em pNPG com adição de alguns sais de íons metálicos, está mostrada na figura 30. Nela, é possível observar que a atividade da BaBgl foi completamente inibida na presença dos metais cério, cobalto, ferro, cobre, zinco e níquel. O lítio reduz em torno de 10%.

Alguns estudos feitos em  $\beta$ -glicosidase de *Streptomyces sp.* indicam que a presença de íons  $\text{Fe}^{3+}$  inibem a atividade, o mesmo visto para a Babgl, enquanto que íons  $\text{Ca}^{2+}$  mantém a atividade enzimática (Ueno & Miyashita, 1990). Além disso, Kataeva e colaboradores estudaram que íons  $\text{Ca}^{2+}$  em uma celobiohidrolase de *Clostridium thermocellum* que possui domínio FnIII, pode ter o efeito quelante (Kataeva et al., 2002). No caso da BaBgl, íons bivalentes, incluindo o  $\text{Ca}^{2+}$ , inibiram parcialmente a atividade da enzima. Quantidades crescentes de sal inibem a atividade de grande parte das  $\beta$ -glicosidasas (Bowers, Ragland, & Byers, 2007). A inibição pode ocorrer devido a uma mudança que ocorre no pKa com o aumento da concentração

de sal, alterando o mecanismo catalítico da enzima. Esse fato vai de acordo com os resultados do experimento de DSF que mostraram diminuição de estabilidade da BaBgl em função de quantidades crescentes de sal.

A atividade da Babgl medida na presença de EDTA também está apresentada na figura 30. O EDTA aumenta em 20% a atividade da enzima. O EDTA é um agente quelante capaz de produzir complexos altamente estáveis com íons metálicos. Esse pode ser o motivo pelo qual o EDTA aumenta significativamente a atividade da enzima, corroborando com os resultados de inibição pelos íons metálicos.

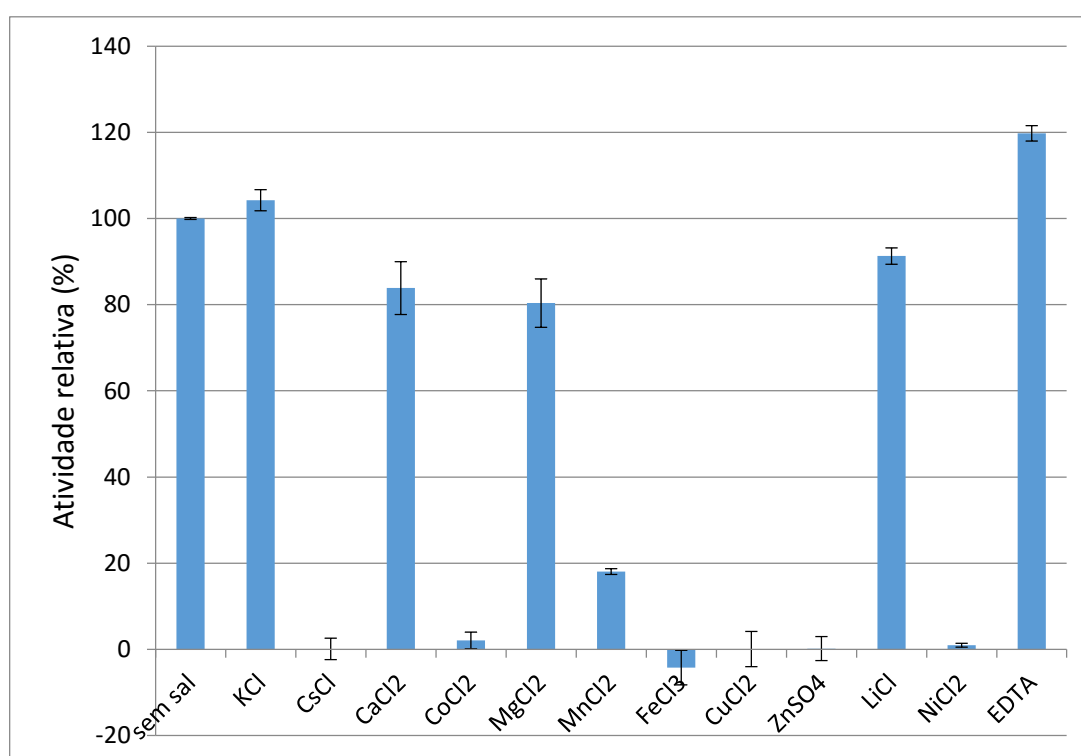


Figura 30: Atividade relativa da Babgl em pNPG com a presença de 5 mM de íons metálicos e 2% de EDTA.

#### 4.5.6. ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM DIFERENTES SUBSTRATOS

A figura 31 apresenta o resultado da especificidade da BaBgl em diferentes substratos sintéticos. Na figura 31 está representada a estrutura química de cada substrato testado e na figura 31 b, o resultado do ensaio cinético. Observa-se que a enzima BaBgl tem maior especificidade pelo pNPG. Possui 23% de atividade

em 4-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo e baixa atividade contra os outros substratos testados se comparados ao pNPG.

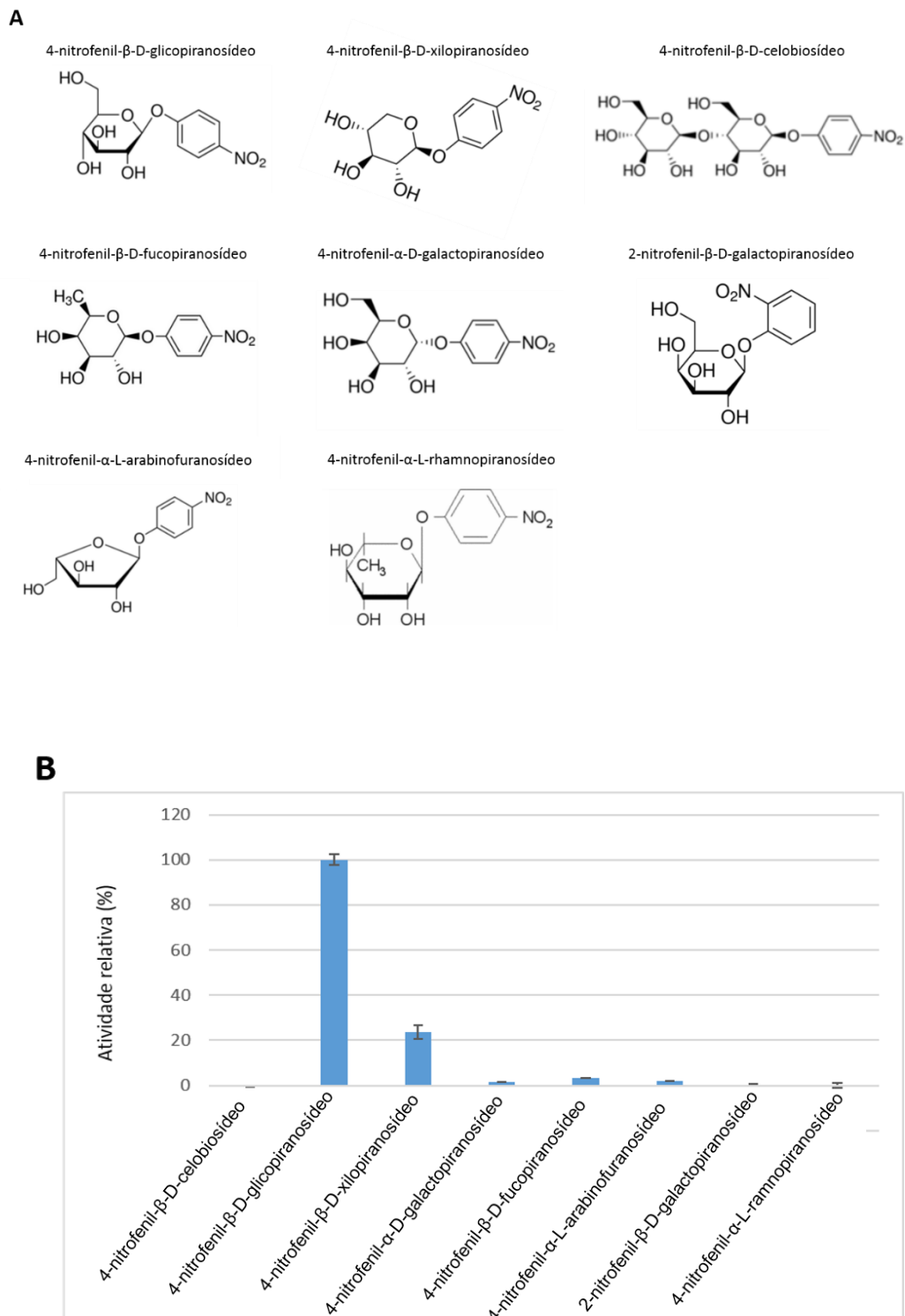


Figura 31: A) Substratos sintéticos utilizados para testar a especificidade da Babgl: : 4-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo, 4-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo, 4-nitrofenil- $\beta$ -D-celobiosídeo, 4-nitrofenil- $\beta$ -D-fucopiranosídeo, 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo, 2-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo, 4-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo e 4-nitrofenil- $\alpha$ -L-rhamnopyranosídeo B) Atividade relativa da Babgl em substratos sintéticos.

Esses resultados indicam que a atividade enzimática da BaBgl não depende apenas da existência de ligações O-glicosídicas, mas principalmente da posição do monossacarídeo, a posição da ligação e o comprimento da cadeia a ser hidrolisada. A hidrólise de pNPG e 4-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo demonstra alta especificidade por ligações  $\beta$ -glicosídicas. A atividade extremamente baixa nos substratos 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo, 4-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo e 4-nitrofenil- $\alpha$ -L-rhamnopiranosídeo indicam a baixa especificidade da BaBgl quanto à configuração anomérica das ligações glicosídicas a serem hidrolisadas.

#### 4.5.7. CINÉTICA ENZIMÁTICA

O efeito das diferentes concentrações de pNPG foram estudadas no pH ótimo da BaBgl porém em temperaturas de 30 °C. O motivo é a estabilidade térmica da enzima ser muito maior, como foi demonstrado na seção 4.5.3, apresentando um tempo de meia vida de quase 25 vezes mais do que na temperatura ótima.

##### 4.5.7.1. DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICAS COM VARIAÇÃO DE pNPG

O gráfico da figura 32 apresenta os dados coletados de atividade da BaBgl pela variação da concentração de substrato. A curva foi ajustada segundo a equação de Michaelis-Menten, equação 2. Os valores de  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$  obtidos através do ajuste da curva, foram de  $0,32\pm 0,03$  mM e  $0,37\pm 0,01$  nmol/min, respectivamente. Já os valores calculados de  $K_{cat}$  e da eficiência catalítica,  $K_{cat}/K_M$  foram de  $88\pm 1$  s<sup>-1</sup> e  $276,381\pm 0,003$  mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> respectivamente. O valor de  $K_M$  é relacionado à afinidade da enzima pelo substrato. Assim valores baixos de  $K_M$  indicam alta afinidade. Na literatura são encontrados valores muito distintos de parâmetros cinéticos das atividades das  $\beta$ -glicosidases (Dan et al., 2000) (Paal, Ito, & Withers, 2004).

Comparando os parâmetros cinético da BaBgl com a de *Thermotoga neapolitana* (TnBgl3B), que possui identidade sequencial de 37% (a mais alta

encontrada para BaBgl), observa-se maior afinidade pelo substrato por parte da TnBgl3B ( $K_M=0,060\pm 0,004$  mM) e eficiência catalítica de cerca de sete vezes maior que a BaBgl (Pozzo et al., 2010). Já comparando com as  $\beta$ -glicosidases da família GH 1, ThBgl1 e Thbgl2, a afinidade é maior para BaBgl, cerca de quase dez vezes maior e 60 vezes mais eficiente na catálise da reação da Babgl (Mutti, 2014). A comparação entre os dados cinéticos das celulases é normalmente difícil de ser feito, pois são muitas variáveis envolvidas no processo.

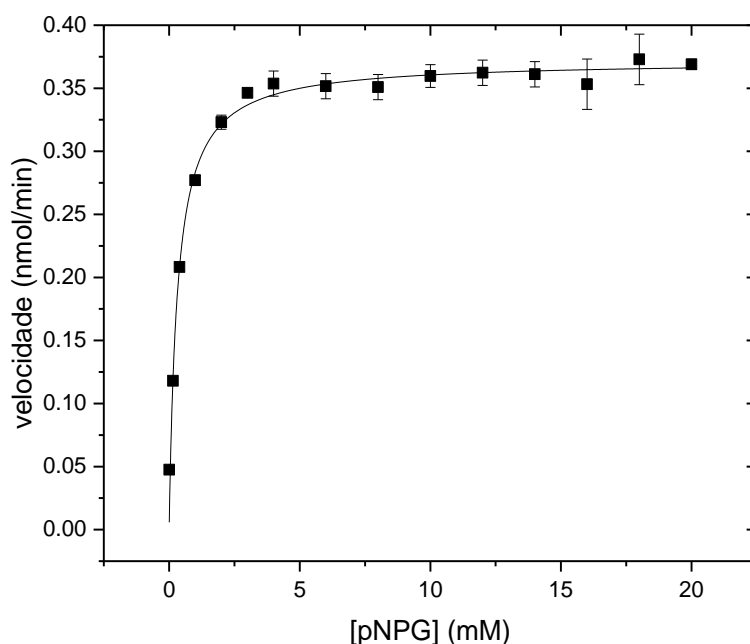


Figura 32: Curva de Michaelis-Menten para a Babgl. Velocidade de formação de produto, pNP, por variação de concentração do substrato, pNPG.

#### 4.5.7.2. CÁLCULO DA CONSTANTE DE INIBIÇÃO POR GLICOSE

As  $\beta$ -glicosidases são inibidas por açúcares no estado de transição do mecanismo de catálise, substratos análogos aos glicosídeos ou agliconas livres de seus substratos. Para calcular a constante de inibição por glicose, foram realizados experimentos de cinética em pNPG, com incubação de diferentes concentrações de glicose, de 0 a 28mM. Os gráficos de cinética da figura 33 apresentam a variação da velocidade de formação do produto, pNP, com a concentração de pNPG para cada



concentração de glicose. As curvas ajustadas apresentaram comportamentos da curva de Michaelis-Menten e os ajustes através da equação 2 forneceram os valores de  $V_{\text{máx}}$  e  $K_M$  listados na tabela 6.

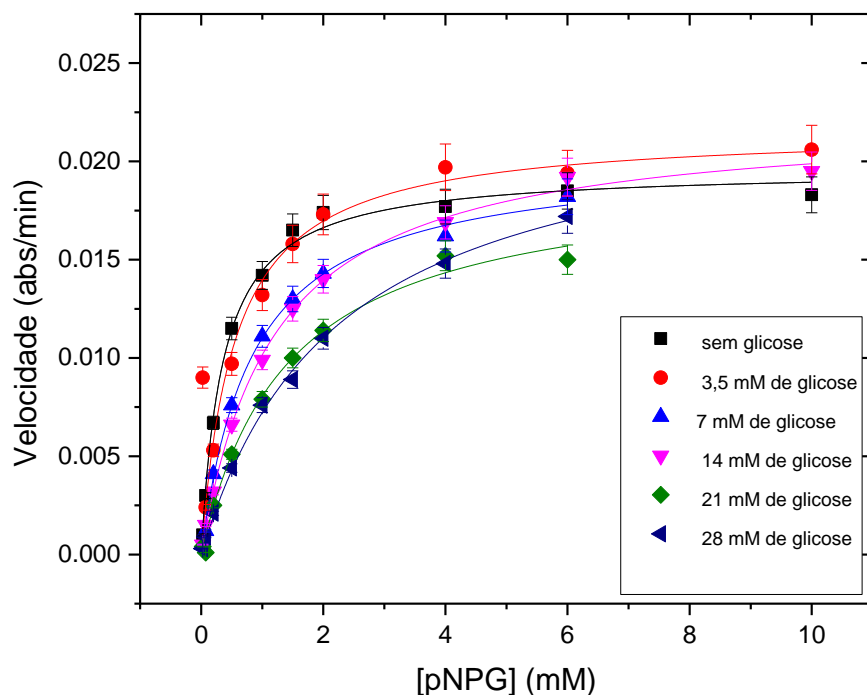


Figura 33: Curva de Michaelis-Menten com variação da velocidade de formação do produto, pNP, por variação da concentração de substrato, pNPG, para diferentes incubações da reação com glicose (variando de 0 a 28 mM). Quadrado preto: curva de cinética sem glicose. Círculo vermelho: curva de cinética com 3,5 mM de glicose. Triângulo azul: curva de cinética com 7 mM de glicose. Triângulo invertido magenta: curva de cinética com 14 mM de glicose. Losango verde: curva de cinética com 21 mM de glicose. Triângulo azul marinho: curva de cinética com 28 mM de glicose.

Tabela 6: Valores de  $K_M$  e  $V_{\text{máx}}$  obtidos através das curvas de Michaeli-Menten da figura 33 para cada concentração de glicose.

Concentração de glicose (mM)	$V_{\text{máx}}$ (abs/min)	$K_M$ (mM)
0	0,0196±0,0004	0.36±0,03
3,5	0,0216±0,0005	0.55±0,02
7	0,020±0,001	0.84±0,07
14	0,022±0,002	1.2±0,2
21	0,019±0,03	1.4±0,4
28	0,023±0,008	2.3±0,2

A tabela 6 indica que quanto maior a quantidade de glicose na reação, maior o valor de  $K_M$ , ou seja, a especificidade pelo substrato diminui. Para calcular a constante de inibição, foi necessário manipular os gráficos de cinética da figura 33, plotando um novo gráfico que correlaciona o inverso da velocidade de formação do produto pelo inverso da concentração de pNPG para cada concentração de glicose, como mostra o gráfico da figura 34.

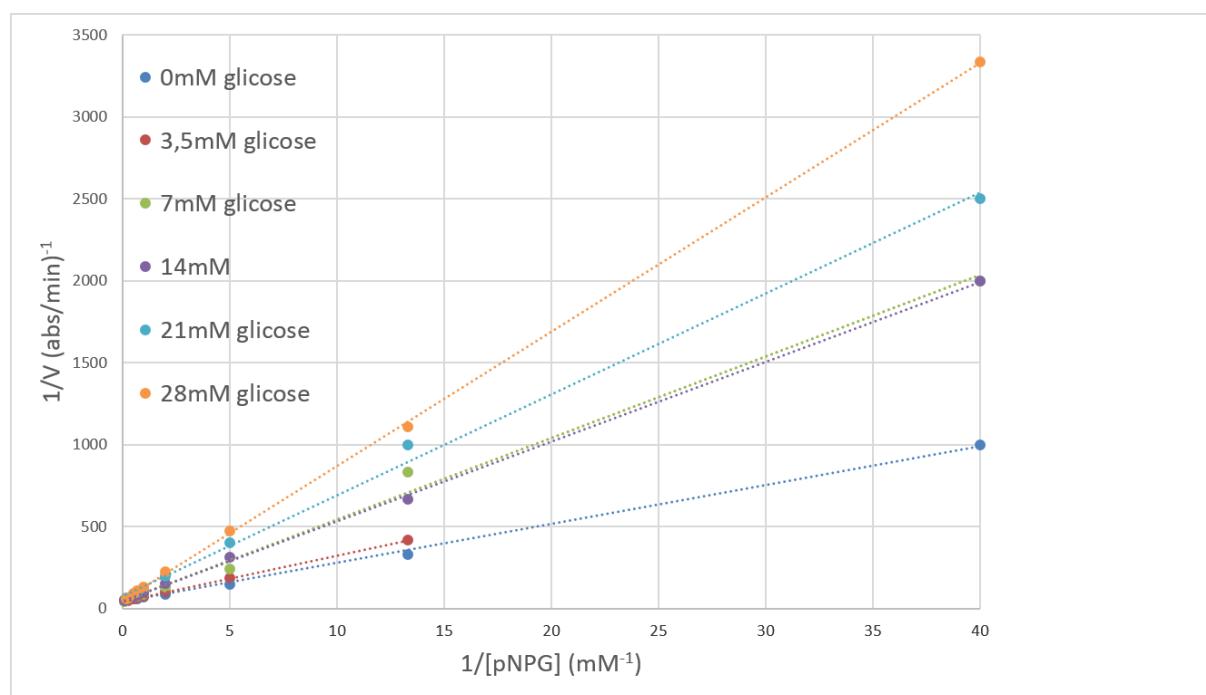


Figura 34: Plotes inversos da velocidade de reação da enzima por concentração de pNPG, para cada concentração de glicose. Em azul escuro, dados sem glicose. Em vermelho, dados com 3,5 mM de glicose. Em verde, dados com 7 mM de glicose. Em roxo, dados com 14 mM de glicose. Em azul claro, dados com 21 mM de glicose. Em laranja, dados com 28 mM de glicose.

A extrapolação das curvas do gráfico de plote, permitiu observar que todas as retas possuem aproximadamente o mesmo coeficiente angular. Isso indica que a velocidade máxima permaneceu praticamente inalterada nas reações com e sem glicose. Já a mudança dos coeficientes angulares na figura 26, torna mais evidente o aumento do  $K_M$  nas reações com glicose, que já havia sido observado no gráfico da figura 33. Estes fatos indicam que a inibição na hidrólise do pNPG pode ser superada através do aumento da quantidade de substrato, logo podemos concluir que a inibição da BaBgl por glicose é do tipo competitiva.

Após essas análises, a constante de inibição ( $K_i$ ) da BaBgl por glicose foi obtida através do gráfico de  $K_M/V_{m\acute{a}x}$ , ou seja, o inverso dos valores dos coeficientes angulares do gráfico da figura 34, pela concentração de glicose, apresentados na figura 35.

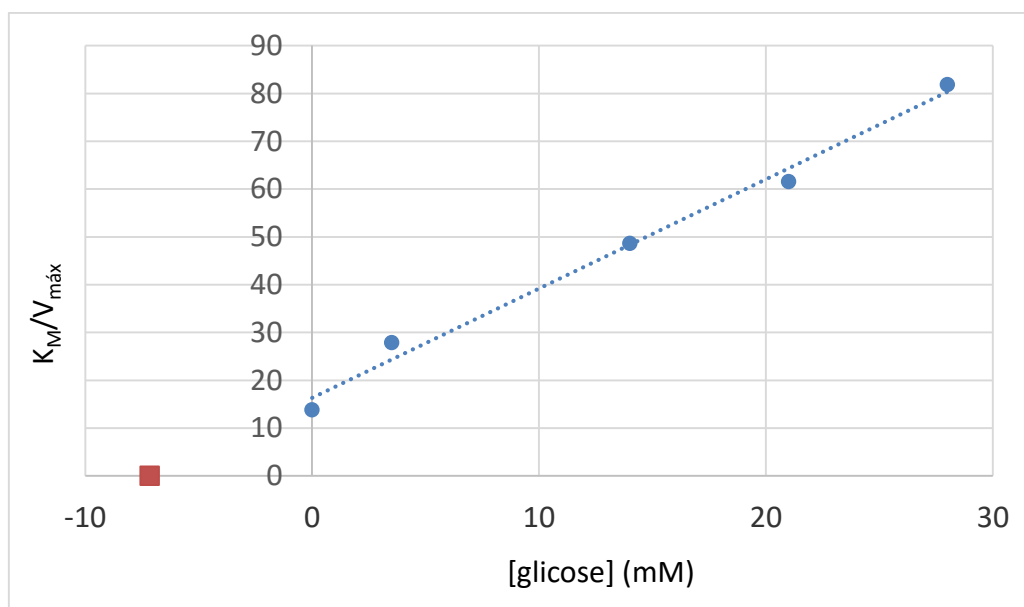


Figura 35: Representação gráfica dos valores de  $K_M/V_{m\acute{a}x}$  variando em função da concentração de glicose. O dado em vermelho foi obtido através da extrapolação da reta.

O ponto que a reta interceptou o eixo das abscissas foi obtido através da equação da reta apresentando um valor de  $K_i$  de  $7,1 \pm 0,4$  mM. Esse baixo valor de constante de inibição indica uma alta afinidade da glicose pela BaBgl. As  $\beta$ -glicosidases reportadas na literatura tem geralmente constantes de inibição em torno de 100 a 200 mM (Cairns & Esen, 2010), ou seja, a glicose é um fraco inibidor dessa enzima. Já para a BaBgl, a glicose se mostrou como um forte inibidor.

#### 4.6. TESTE DE TRANGLICOSILAÇÃO

Para testar se a BaBgl exerce o papel de enzima transglicosiladora, foi realizado teste de cinética e monitorado a liberação de pNP e glicose ao mesmo tempo, mostrado na figura 36.

O gráfico da figura 36 mostra que a cada molécula de pNPG hidrolisada, é formada uma molécula de pNP e uma de glicose (hidrólise). Além disso, as duas curvas foram plotadas através do mecanismo de Michaelis-Menten o que indica a ausência de reação de transglicosilação. Para seguir a rota de transglicosilação, só é formado pNP e uma molécula que é o substrato pNPG ligado a uma molécula de glicose. Portanto nesse caso, para concentrações maiores de pNPG, o gráfico de glicose decresce. Como no caso do gráfico da figura 28, não há decréscimo da curva de glicose, concluímos que a BaBgl não faz reação de transglicosilação (Frutuoso & Marana, 2013).

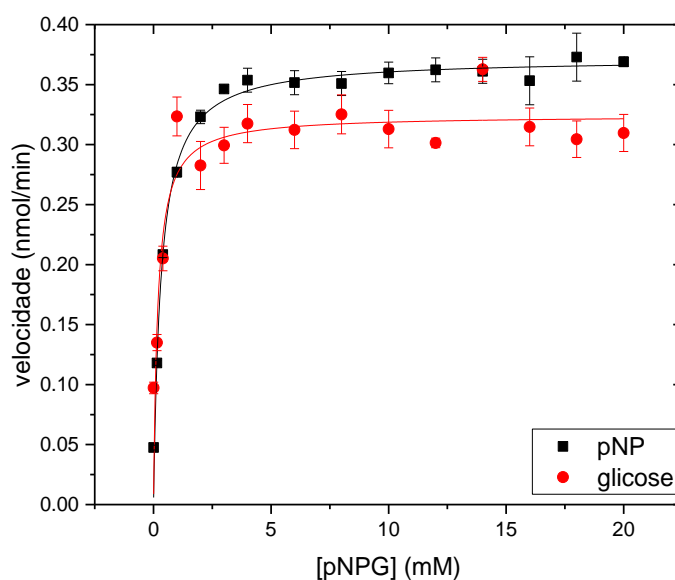


Figura 36: Cinética enzimática. Gráfico de velocidade de formação de produto, pNP e glicose, por concentração de substrato. Em preto, a formação de pNP. Em vermelho, a formação de glicose.

Apenas algumas enzimas da família GH 3 têm sido estudadas e mutadas para avaliar a reação de transglicosilação. Por exemplo, a enzima TnBgl3B de *Thermotoga neapolitana* (Pozzo et al., 2010) foi caracterizada como uma enzima capaz de realizar a reação de transglicosilação empregando álcoois como aceptores. Para a enzima GH 3 de *Aspergillus niger* (Seidle, McKenzie, Marten, Shoseyov, & Huber, 2005) foi demonstrada a capacidade de realização de transglicosilação e foi ainda mostrado que esta capacidade depende fortemente da presença de um triptofano na região do sítio ativo (W262 na enzima de *A. niger*). Curiosamente, a

enzima de *T. neapolitana* possui este mesmo triptofano conservado. No entanto, diferente do que foi mostrado para *A. niger*, a mutação deste triptofano para uma fenilalanina não aboliu a capacidade de catalisar a reação de transglicosilação em *T. neapolitana*. A enzima BaBgl possui o mesmo triptofano conservado em *A. niger* e *T. neapolitana* e foi caracterizada neste trabalho como uma enzima incapaz de realizar a reação de transglicosilação nas condições testadas.

Algumas conclusões podem ser extraídas aqui. Primeiramente, as diferenças estruturais em  $\beta$ -glicosidases da família GH 3 responsáveis pela ocorrência de transglicosilação parecem ser mais sutis do que previamente proposto, uma vez que a dependência do triptofano no sítio ativo é fundamental para a enzima de *A. niger* e não parece determinar a ocorrência de transglicosilação em *T. neapolitana* e *B. adolescentis*. Adicionalmente, as enzimas de *T. neapolitana* e *B. adolescentis* têm uma marcante similaridade estrutural, como será discutido nas seções seguintes. É possível que a enzima BaBgl apresente alguma atividade de transglicosilação com seletividade para o acceptor além daquele testado neste trabalho, uma vez que a enzima TnBgl3B foi caracterizada sobre aceptores álcoois não avaliados para BaBgl.

#### 4.7. INFLUÊNCIA DE MONOSSACARÍDEOS NA ATIVIDADE DA BaBgl

Os testes de atividade feitos para estudar a influência dos monossacarídeos na atividade da  $\beta$ -glicosidase, estão apresentados na figura 37. Analisando a figura, observamos efeitos de inibição e ativação dos monossacarídeos. Começando pela glicanolactona, que inibiu 100% da atividade da BaBgl na menor concentração testada. Glicanolactona é de fato um forte inibidor de  $\beta$ -glicosidases. A adição de arabinose e glicose também inibiram significativamente a atividade da enzima. Já a frutose, manose, xilose e galactose tiveram efeito de ativação durante a reação. Os resultados de cinética enzimática com glicose apresentados na seção 4.5.7.2, já haviam mostrado que o tipo de inibição da glicose sobre a BaBgl, é competitivo. Estudos utilizando as mesmas concentrações de monossacarídeos para testar a atividade de uma  $\beta$ -glicosidase de *Thermotoga petrophila* também da família

GH3, mostraram que essa enzima é ativada com galactose, arabinose e xilose, porém até a concentração de 0,6 M. A partir desse valor a atividade da enzima decresce (Diogo et al., 2015) o que não ocorreu com a BaBgl até 1 M de concentração.

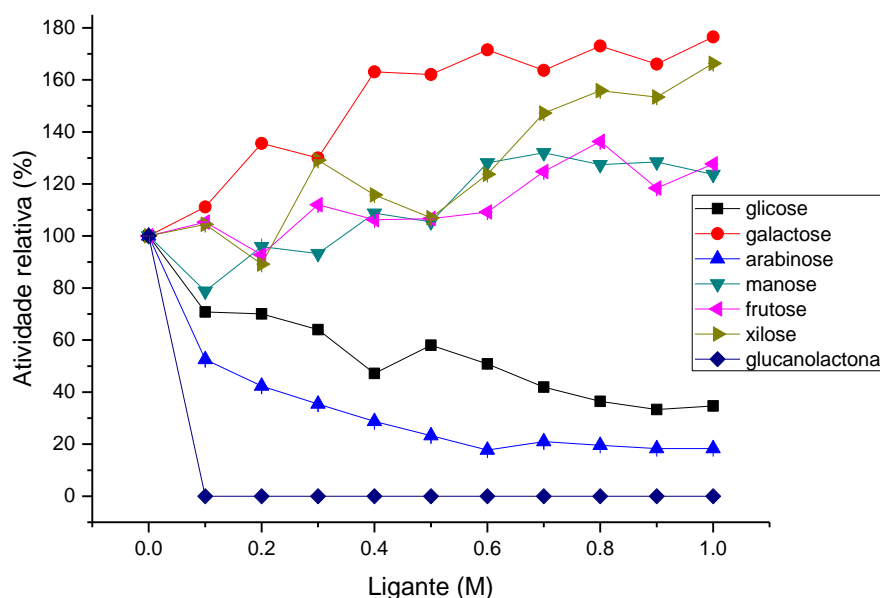
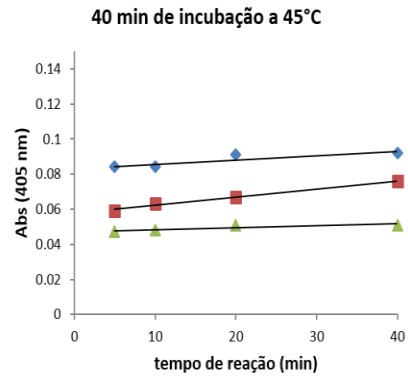
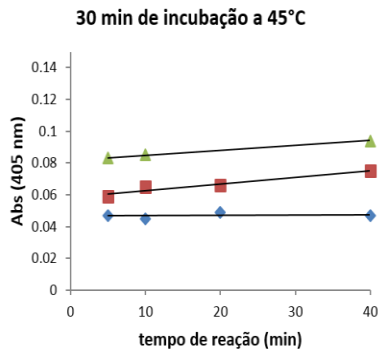
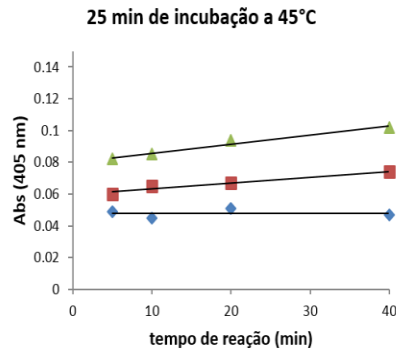
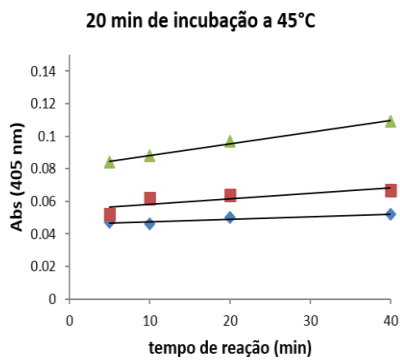
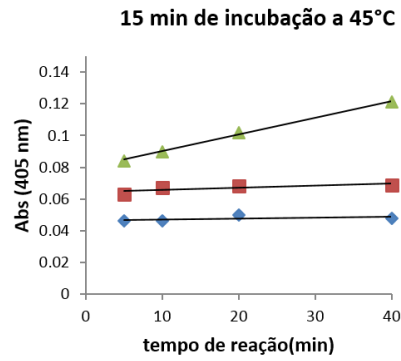
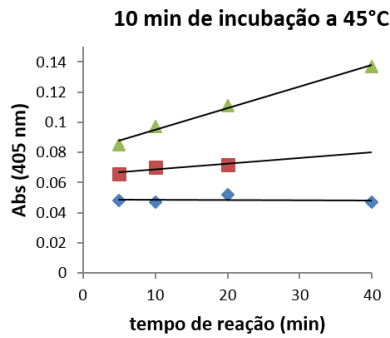
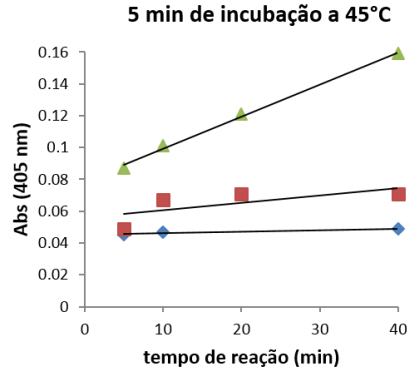
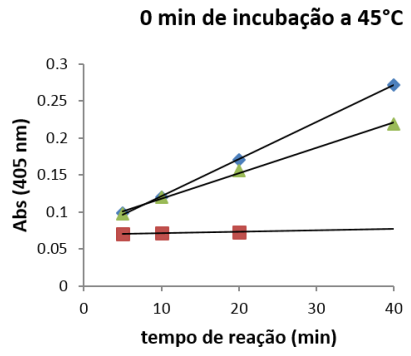


Figura 37: Efeito de inibição/ativação de monossacarídeos, em diferentes concentrações (0 a 1M), sobre a atividade da BaBgl em pNPG. Círculo preto: glicose. Quadrado vermelho: galactose. Triângulo azul: arabinose. Triângulo invertido verde: manose. Triângulo magenta: frutose. Triângulo amarelo: xilose. Losango azul marino: glucanolactona.

#### 4.7.1. ATIVIDADE RESIDUAL DA BaBgl COM DIFERENTES LIGANTES

Para responder o porque de alguns monossacarídeos inibirem a atividade da enzima enquanto outros ativam, foi realizado testes de atividade residual da enzima incubada com monossacarídeos a 45 °C e calculada a constante de inativação a 45 °C. Para isso foram escolhidos a glicose e galactose por serem os extremos de inibição e ativação respectivamente, observados no experimento anterior. A figura 38 apresenta os gráficos de variação de atividade da BaBgl sobre pNPG por tempo de incubação da enzima sem ligante, com 1 M de glicose e com 1 M de galactose. Cada gráfico é referente a um tempo de incubação de 0 a 40 minutos.



◆ pura  
■ glicose  
▲ galactose

Figura 38: Atividade da BaBgl sobre pNPG variando com o tempo de reação para cada tempo de incubação da enzima pura e com ligante. Losango azul: Babgl pura. Quadrado vermelho: Babgl com 1 M de glicose. Triângulo verde: Babgl com 1 M de galactose.

Esses resultados mostram que a atividade da BaBgl sobre o pNPG é inibida pela glicose e pela galactose quando não esta incubada a 45 °C. Com 5 minutos de incubação, a Babgl pura já começa diminuir significativamente sua atividade, resultado visto nos testes de atividade residual da seção 4.5.3. A partir de 10 minutos de incubação a enzima não possui mais atividade pura e com glicose, enquanto que a atividade com galactose permanece praticamente estável até quase 30 minutos de incubação.

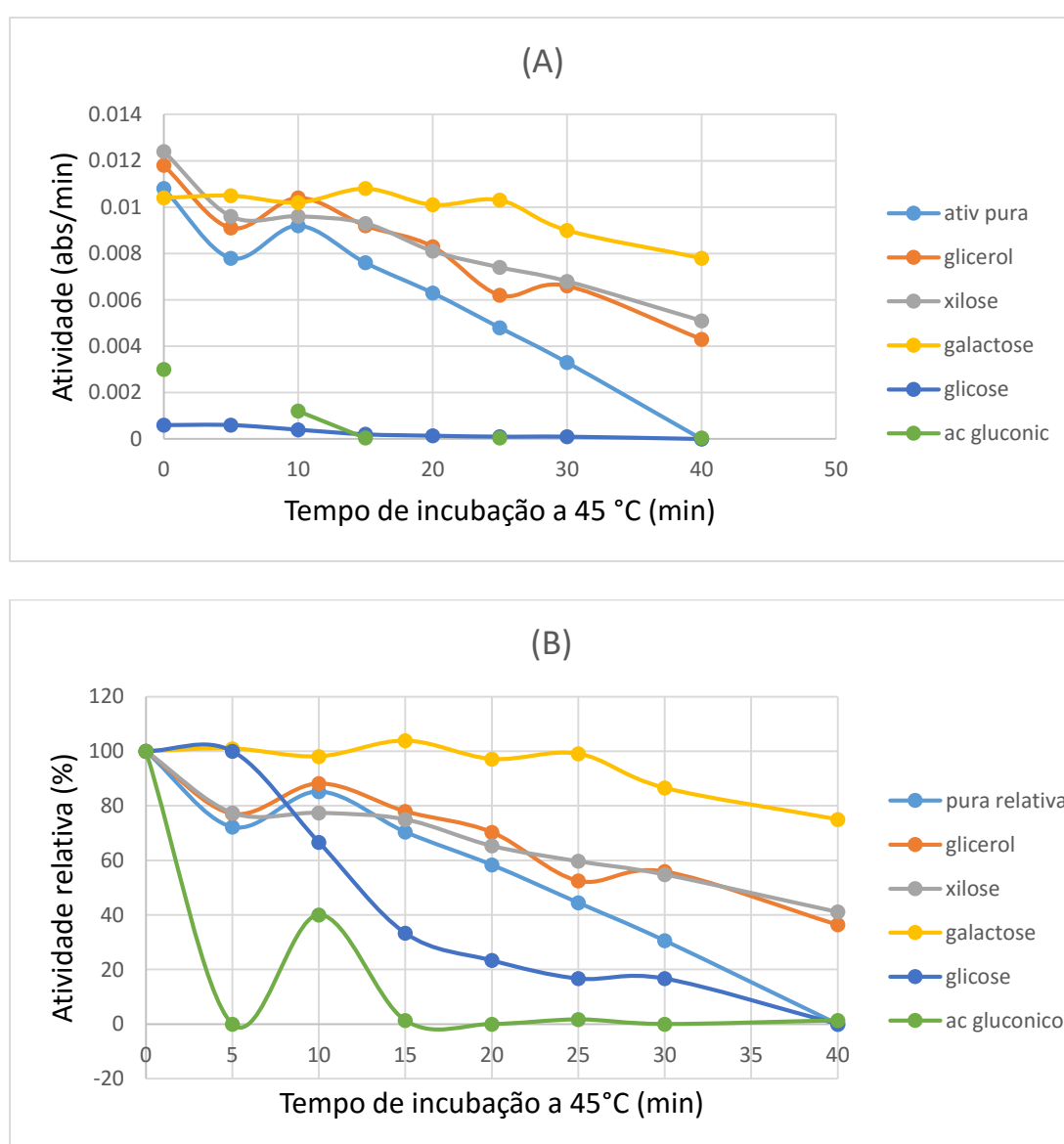


Figura 39: Atividade residual com enzima incubada a 45 °C e temperatura de reação a 30 °C. A enzima foi incubada pura (azul), com galactose (amarelo), glicose (azul), xilose (cinza), ácido glucônico (verde) e glicerol (vermelho).



Os resultados foram então comparados com testes realizados de atividade com incubação da Babgl a 45 °C, com glicerol, xilose e ácido glucônico, e reação a 30 °C. A figura 39 apresenta os resultados em dois gráficos de atividade por tempo de incubação: a) apresentando atividade em termos de absorbância por minuto e b) apresentando a atividade relativa.

Na figura figura 39 a, o primeiro ponto de todas as curvas é referente aos valores de atividade antes da incubação a 45 °C. Esses valores demonstram inibição de quase 70% da atividade da BaBgl por parte da glicose e do ácido glucônico, resultado corroborado com os testes de atividade mostrados na figura 37 da seção 4.7. Já galactose inibe menos de 5 % da atividade da enzima enquanto o glicerol e a xilose aumentam a atividade da enzima em quase 20 e 25% respectivamente.

Se analisarmos o tempo necessário para que a atividade enzimática seja reduzida em 50% quando incubada a 45 °C, observamos que a enzima livre leva aproximadamente 25 minutos para ter sua atividade reduzida em 50%. Quando incubada com glicerol ou com xilose, o tempo necessário para a queda de 50% na atividade é aumentado para 35 minutos. Finalmente, quando incubada com galactose, a atividade da enzima se mantém superior a 70% durante todo o tempo monitorado (40 minutos), sendo a condição de máxima estabilidade da atividade. É importante salientar que 45 °C, a temperatura de incubação deste experimento, representa a condição ótima para a atividade enzimática. Logo, o ganho na atividade residual representa um acréscimo importante na quantidade total de produto formado.

Esses resultados corroboram o resultado da figura 38, que mostra que a glicose inibe a BaBgl, porém a galactose, apesar de causar uma inibição de aproximadamente 10% no início do experimento, mantém a enzima ativa por tempos mais longos. Isso explica os resultados de atividade residual dependente da concentração de monossacarídeos (figura 37). A galactose apenas estabiliza a enzima fazendo com que esta fique ativa por mais tempo e, portanto, com valor maior de atividade na reação.

A atividade da BaBgl incubada com glicerol foi testada para racionalizar o aumento da atividade enzimática da BaBgl utilizada do estoque em 20% de glicerol que, como mostram os dados da seção 4.5.4, aumentou em quase quatro vezes a

atividade da BaBgl. De fato, como mostramos dados da figura 39, há um ganho de atividade no começo da reação e uma maior estabilidade da enzima.

Sabe-se que o glicerol é um conhecido agente estabilizador da estrutura de proteínas (Gekko & Timasheff, 1981; Leandro, Lechner, Tavares de Almeida, & Konecki, 2001). O efeito causado por este agente é provavelmente devido a um aumento da hidrofobicidade da proteína, uma vez que o glicerol é capaz de interagir com moléculas de água, quebrando a estrutura ordenada do solvente e, desta forma, contribuindo para a estabilização de grupos menos polares na superfície da proteína (Gekko & Timasheff, 1981).

Alguns açúcares também possuem propriedades similares àquela observada para o glicerol. A glicose é um destes açúcares conhecidos por aumentar a estabilidade de algumas enzimas (Leandro et al., 2001). O efeito da galactose sobre o aumento da atividade da enzima BaBgl pode ter origem em dois efeitos distintos. Primeiramente, através da quebra da rede de interações do solvente, em um mecanismo similar àquele empregado pelo glicerol. Um outro mecanismo de estabilidade devido à interação com o glicerol pode ser oriundo da interação direta entre a enzima e o monossacarídeo em um sítio distinto do sítio ativo, em um modelo de regulação alostérica. Interações como esta já foram observadas para a enzima  $\beta$ -manosidase da família 2, que é uma enzima com múltiplos domínios, tal como a BaBgl (Nascimento, Muniz, Aparício, Golubev, & Polikarpov, 2014). Para esta enzima, observou-se que interações com glucomanano eram capazes de estabilizar a enzima sem, contudo, competir com o substrato. Uma vez que a enzima BaBgl possui cavidades formadas entre os domínios (discutidas na seção abaixo), é possível que algumas destas cavidades sejam empregadas para a interação com reguladores e que esta interação culmine no aumento da estabilidade da enzima. Contudo, vale ressaltar que não foram observados aumentos significativos no  $T_M$  da BaBgl quando incubada com galactose em experimentos de DSF. O real papel da galactose, ainda permanece, portanto, por ser explorado.

#### 4.8. ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DA ENZIMA BaBgl

Os cristais, foram obtidos a partir do kit IndexHT, contendo 2,0 M NaCl; 0,1 M HEPES; pH 7,5; 25% PEG 3350 e testados na linha MX1, do Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS) – Campinas, Brasil. Assim, as condições foram otimizadas e novos cristais foram obtidos com 0,1M HEPES sódico; pH 8,0; 23% PEG 3000; 200 mM NaCl. Essa mesma condição foi testada utilizando um kit de aditivo com 30% de glicerol. O resultado foi o segundo cristal da figura 40 que difratou até 2.5 Å de resolução.

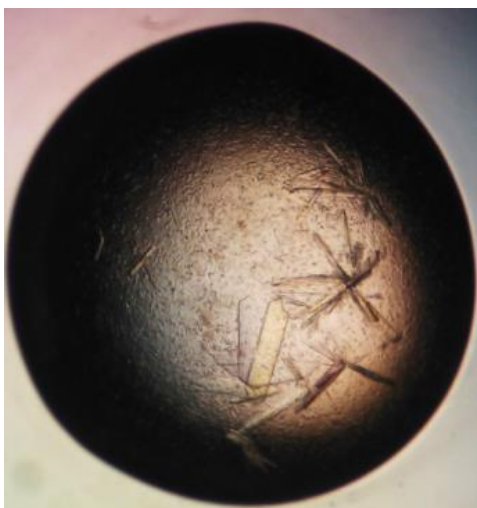


Figura 40: Cristal obtido para a proteína BaBgl.

##### 4.8.1 ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DA ENZIMA BaBgl

A estrutura cristalográfica da enzima BaBgl foi determinada através de substituição molecular, empregando como modelo de busca a estrutura da enzima de *T. neapolitana* (Pozzo et al., 2010). O modelo foi subsequentemente refinado até valores finais de  $R_{work}$  e  $R_{free}$  de 0,205 e 0,243, respectivamente. A tabela 7 mostra as estatísticas do processamento e do refinamento do modelo da enzima BaBgl. Este modelo compreende quatro moléculas da enzima na cela unitária/unidade assimétrica, uma vez que se trata de um cristal com simetria triclinica. Os aminoácidos 5 a 692 foram adequadamente modelados na densidade eletrônica, com

exceção dos *loops* envolvendo os aminoácidos 52 a 65 e 348 a 351, para os quais não havia densidade clara o suficiente para traçar o modelo tridimensional.

Tabela 7: : Estatísticas do processamento e refinamento da estrutura da BaBgl.

<b>Parâmetros</b>	<b>BaBgl</b>
Comprimento de onda (Å)	1,54
Resolução (Å)	38,51 - 2,511 (2,601 - 2,511)
Grupo espacial	P 1
Cela unitária (Å, <sup>o</sup> )	94,573 96,374 106,7 87,75 89,04 60,94
Número total de reflexões	428496 (38628)
Reflexões únicas	108290 (10133)
Multiplicidade	4,0 (3,8)
Completeza (%)	96,41 (89,97)
I/sigma(I) médio	10,63 (2,09)
B-fator de Wilson	27,21
R <sub>merge</sub>	0,1416 (0,6851)
R <sub>meas</sub>	0,1638
CC 1/2	0,988 (0,672)
CC*	0,997 (0,897)
R <sub>work</sub>	0,2046 (0,2698)
R <sub>free</sub>	0,2428 (0,3162)
Número de átomos	21579
Macromoléculas	20373
ligantes	6
Água	1200
Aminoácidos	2688
RMS <sub>ligações</sub> (Å)	0,002
RMS <sub>ângulos</sub> (°)	0,61
Regiões favoráveis de Ramachandran (%)	96
Regiões permitidas de Ramachandran (%)	3,85

Regiões proibidas de Ramachandran (%)	0,15
<i>Clashscore</i>	4,78
B-factor Médio (Å <sup>2</sup> )	28,70
Macromoléculas	28,70
Ligantes	47,20
solvente	29,50

A estrutura da enzima Babgl pode ser dividida em três domínios. Um domínio N-terminal (representado em azul na figura 41), enovelado como um barril TIM distorcido, mas que lembra o enovelamento típico das enzimas  $\beta$ -glicosidases da família GH 1, que são enzimas estruturadas em um único domínio com enovelamento TIM. Neste domínio N-terminal, que envolve os aminoácidos 5 a 301, encontra-se a maior parte do volume do sítio ativo. Fortuitamente, uma molécula de glicerol, presente na condição de cristalização, aparece ligada ao sítio ativo, mimetizando a interação da enzima com o produto. Os detalhes do sítio ativo e da interação com o glicerol serão descritos mais detalhadamente nas seções seguintes.

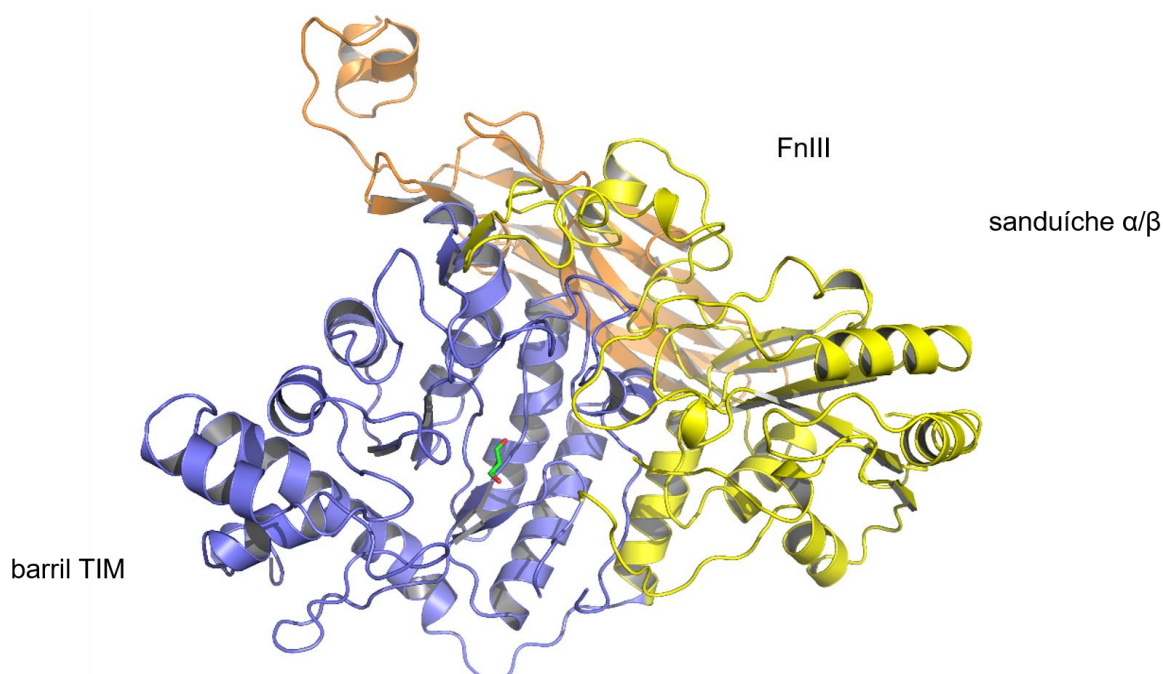


Figura 41. Estrutura cristalográfica da enzima Babgl. Os três domínios estão representados nas cores azul (N-terminal), amarelo (domínio  $\alpha/\beta$ ) e laranja (FnIII). Uma molécula de glicerol co-cristalizada no sítio ativo está mostrada em verde.

Um domínio intermediário enovelado na forma de um sanduíche  $\alpha/\beta$  é observado na sequência. Este domínio compreende os aminoácidos 302 a 545. Uma parte do *loop* ausente na estrutura (resíduos 348 a 351) além do *loop* envolvendo os resíduos 414 a 428 encontram-se bem próximos ao sítio ativo da enzima, sugerindo que, de alguma forma, este domínio  $\alpha/\beta$  pode ter uma participação no reconhecimento do substrato ou mesmo na regulação da cinética de acesso do substrato ao sítio catalítico. O domínio  $\alpha/\beta$  lembra o enovelamento conhecido como enovelamento Rossmann ou *Rossmann fold*, que é muito típico para enzimas com atividade redox. Nestas enzimas, é típica a presença de um sítio ativo no ponto de inversão das fitas de uma folha  $\beta$  (Branden & Tooze, 1999). Nesta região da estrutura da enzima BaBgl não foi observada densidade eletrônica para nenhum possível ligante. Contudo, o papel funcional deste domínio ainda precisa ser melhor avaliado.

Finalmente, um domínio C-terminal enovelado como um domínio Fibronectina do tipo III (FnIII) é observado na enzima BaBgl. Este domínio envolve os aminoácidos 547 a 692 e é constituído por duas folhas beta antiparalelas. O papel deste domínio não está completamente estabelecido, mas já foi proposto na literatura que ele pode estar envolvido na adesão a carboidratos da parede celular vegetal ou mesmo da parede celular dos microrganismos que as produzem. Uma proposta é que a adesão da enzima à parede do microrganismo (no caso de enzimas secretadas) facilitaria a absorção dos açúcares simples gerados a partir da hidrólise enzimática (Pozzo et al., 2010).

Uma análise da similaridade estrutural da enzima BaBgl através do servidor DALI (Holm & Rosenström, 2010) revela, como esperado, uma alta similaridade estrutural com enzimas  $\beta$ -glicosidase de *Kleuyvemocyces marxianus* [PDB 3ABZ (Yoshida et al., 2010)], *T. neapolitana* [PDB 2X42 (Pozzo et al., 2010)] e *Streptomyces venezuelae* (PDB 4I3G) (Zmudka, Thoden, & Holden, 2013). Outras enzimas seguem na lista do DALI, incluindo exo glicohidrolases,  $\beta$ -N-acetilglucosaminidases (NagZ) e exo 1-4/1-3  $\beta$ -glucanases. Todos estes resultados se referem a enzimas da família GH 3, como catalogado pelo CAZy e todos foram encontrados com valores de *Z-Score* maiores que 30 no servidor DALI. A lista segue com  $\beta$ -N-acetilhexosaminidases completando a lista de proteínas com similaridade estrutural e com *Z-Score* maior que 10.

A figura 42 mostra a superposição das estruturas cristalográficas das  $\beta$ -glicosidases de *B. adolescentis* (BaBgl), *K. marxianus*, *T. neapolitana*, *S. venezuelae* e *Trichoderma reesei* (PDB 3ZZ1). As estruturas de *K. marxianus* e *S. venezuelae* possuem o domínio adicional PA14, ausente em BaBgl (mostrado na parte inferior direita da figura). Quanto ao arranjo dos demais domínios, a figura mostra uma boa conservação estrutural e das posições relativas entre os domínios.

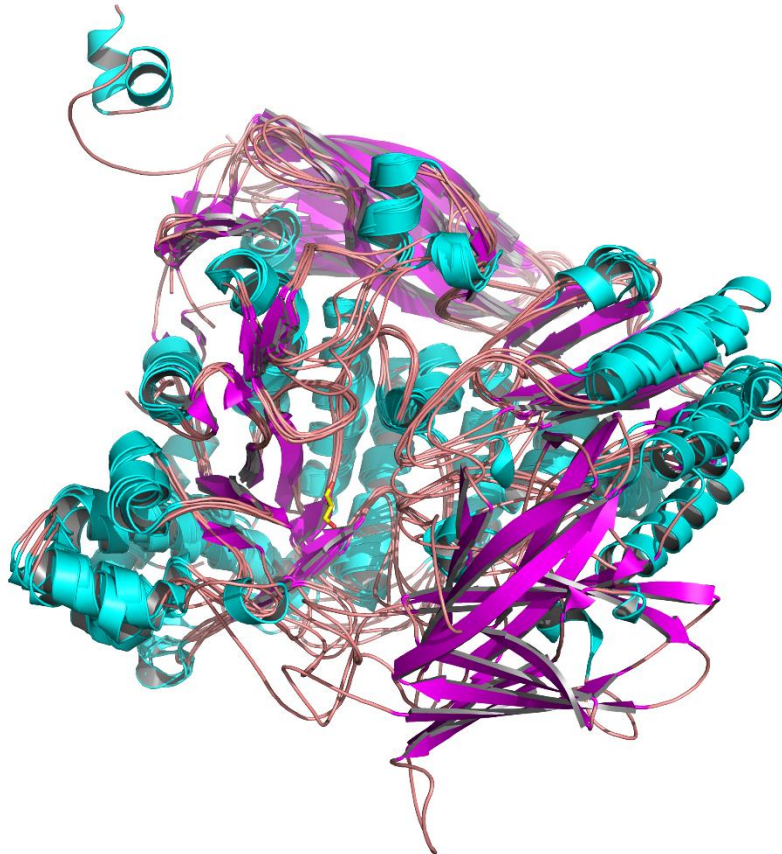


Figure 42. Superposição das estruturas cristalográficas das  $\beta$ -glicosidases de *B. adolescentis* (Babgl), *K. marxianus* (3ABZ), *S. venezuelae* (4I3G), *T. neapolitana* (2X42), e *T. reesei* (3ZZ1). O domínio catalítico é mostrado na porção esquerda da figura com a molécula de glicerol (co-cristalizada com Bablg) mostrada em sticks amarelo. O domínio  $\alpha/\beta$  está na porção direita ao fundo. O domínio FN3 está mostrado na porção superior e o domínio adicional PA14, presente em algumas estruturas está mostrado na porção direita à frente. As estruturas estão coloridas por elemento de estrutura secundária. As estruturas dos loops foram suavizadas para facilitar a visualização.

A comparação com enzimas de outras funções catalíticas também revela uma grande similaridade quanto ao arranjo dos domínios, como mostrado na figura 43. Nesta figura, a estrutura da enzima BaBgl está superposta com as estruturas de  $\beta$ -D-glucano glicohidrolase (PDB 1IEW) (Hrmova et al., 2001) de *Hordeum vulgare*, NagZ de *Bacillus subtilis* (PDB 4GYJ) e  $\beta$ -N-acetil-hexosaminidase

de *Beuternergia cavernae* (PDB 5BU9). Vale destacar que todas estas enzimas possuem apenas dois domínios: N-terminal (TIM distorcido) e o domínio  $\alpha/\beta$ , sem um domínio FN3, portanto.

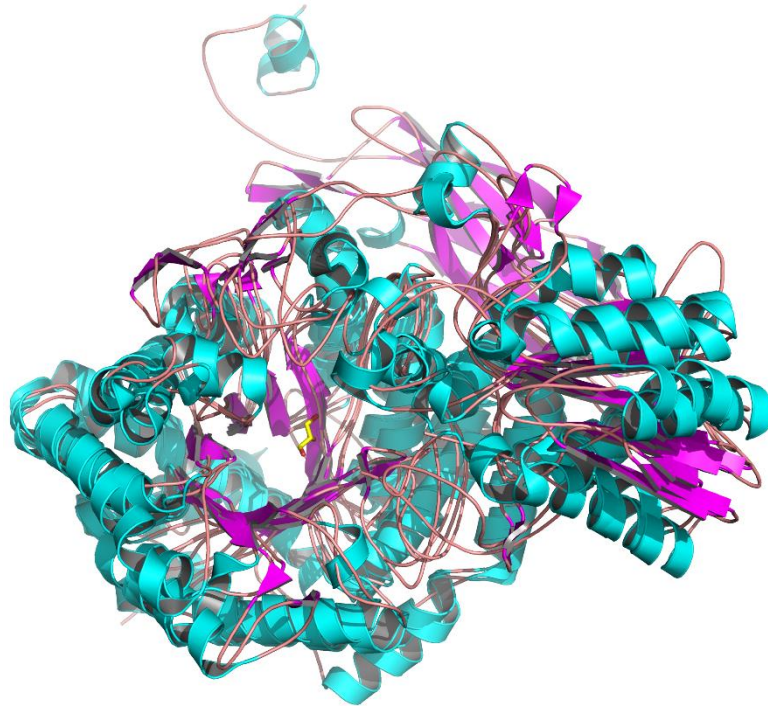


Figure 43. Comparação da BaBgl com enzimas de funções diversas, como  $\beta$ -D-glucano glicohidrolase (PDB 1IEW), *Hordeum vulgare*, NagZ de *Bacillus subtilis* (PDB 4GYJ) e  $\beta$ -N-acetil-hexosaminidase de *Beuternergia cavernae* (PDB 5BU9).

Finalmente, a comparação da estrutura da enzima BaBgl com a enzima exo 1,3/1,4  $\beta$ -glucanase (exoP) de *Pseudoalteromonas sp.* (PDB 3UT0) (Nakatani et al., 2012) revela também similaridade estrutural com os domínios N-terminal e  $\alpha/\beta$ . No entanto, no lugar de um domínio FN3, a enzima exoP apresenta um domínio C-terminal enovelado na forma de uma hélice  $\beta$  (figura 44).



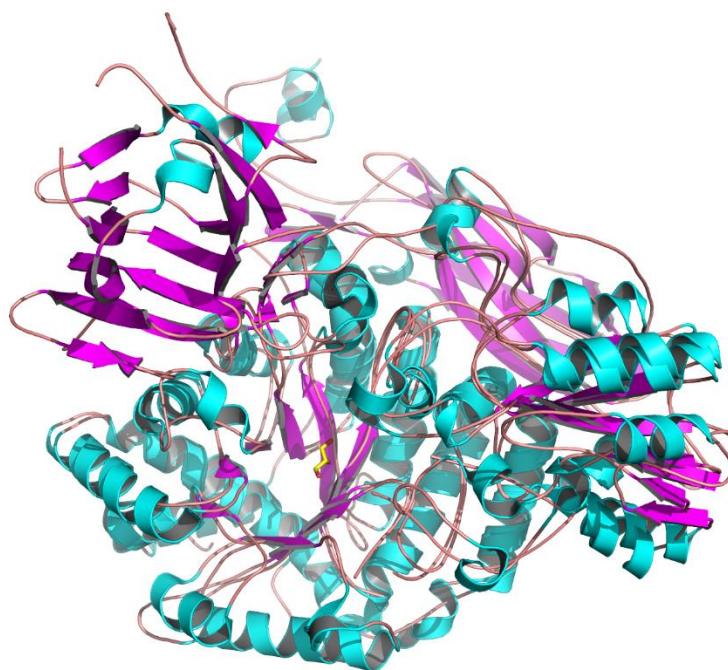


Figura 44. Comparação estrutural da enzima Babgl com a enzima exoP de *Pseudoalteromonas* sp.

#### 4.8.2. SÍTIO ATIVO

A região do sítio ativo da enzima BaBgl pôde ser deduzida baseado na similaridade estrutural com a enzima de *T. neapolitana* (PDBs 2X42 e 2X41) (Pozzo et al., 2010). Esta enzima foi cristalizada com uma molécula de glicose no sítio ativo (sub-sítio glicona) e a comparação destas estruturas revela uma potencial rede de ligações de hidrogênio responsável pela interação do substrato no subsítio glicona. Nesta região, a His154 interage com a hidroxila OH2 através do NE (3,2 Å de distância). Esta mesma hidroxila interage também com a Arg120 (3,5 Å até o NH1) e com o Asp232 (2,7 Å até o OD2). A hidroxila OH3 da glicose interage com o grupo NH2 da Arg120 (3,2 Å) e com o nitrogênio NZ da lisina 153 (2,9 Å). A hidroxila OH4 interage com o oxigênio OD1 do Asp44 (2,5 Å) enquanto o oxigênio OD2 do mesmo resíduo interage com a hidroxila OH6 (2,3 Å). Finalmente, a hidroxila OH1 da glicose interage com o oxigênio OD1 do Asp232 (3,6 Å) (figura 45).

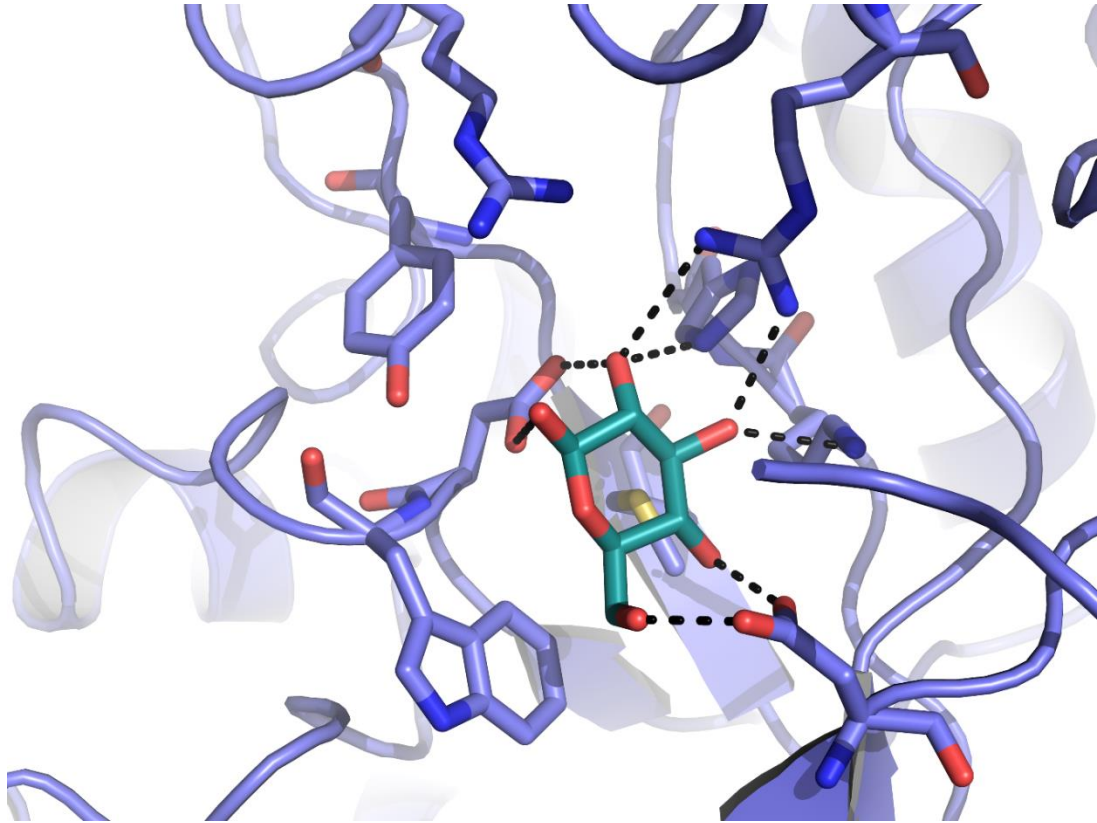


Figure 45: Configurações de uma molécula de glicose no sítio ativo.

De acordo com a posição do carbono C1 da glicose, é possível sugerir possíveis interações do açúcar aglicona com os aminoácidos Arg164 e Tyr200. No entanto, como não há estruturas cristalográficas de uma  $\beta$ -glicosidase GH 3 ligada ao substrato, não é possível confirmar estas interações. Por outro lado, fica evidente que, como também ocorre para as  $\beta$ -glicosidases da família GH 1, as interações do subsítio aglicona com a enzima são mais fracas do que aquelas envolvendo o sítio glicona.

As interações mostradas na figura 45 também indicam a razão pela qual a enzima BaBgl apresenta maior seletividade por pNPG em detrimento a pNP-xilopiranosídeo. Neste segundo substrato, o grupo hidroximetil ligado ao carbono C5 do anel piranosídico é perdido e, com este, a interação com o aminoácido Asp44. A perda desta interação deve acarretar em uma interação muito menos eficiente do substrato com a enzima, o que explicaria a menor seletividade para BaBgl, como observado na figura 31.

A análise comparativa do sítio ativo também revela os aminoácidos catalíticos presentes. Na enzima BaBgl, o Asp232 é o nucleófilo da reação, enquanto o Glu417 faz o papel de ácido/base geral. Na enzima de *T. neapolitana*, foi observado ainda que o Asp58 (Asp44 em BaBgl) é importante para a catálise, possivelmente através da fixação do substrato na posição correta para que haja a reação, uma vez que a mutação deste aminoácido altera o  $K_m$  da reação (Pozzo et al., 2010). Na figura 46, os aminoácidos com papel na catálise estão identificados. Em magenta, o nucleófilo Asp232, em amarelo o ácido/base geral Glu417 e em laranja o aminoácido acessório Asp44.

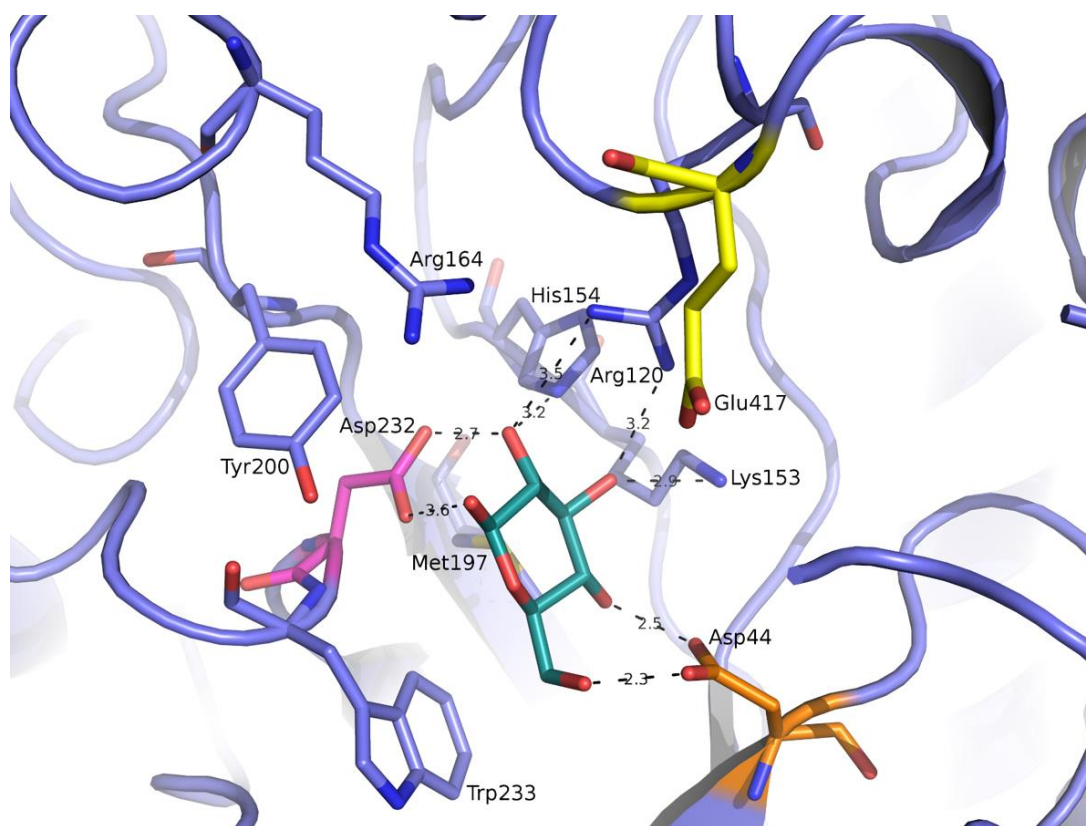


Figura 46: Aminoácidos responsáveis pelo mecanismo de catálise da BaBgl.

É interessante observar a presença de um triptofano no sítio ativo (Trp233). Este aminoácido foi apontado na  $\beta$ -glicosidase de *Aspergillus niger* (GH 3) como sendo importante para determinar a ocorrência de transglicosilação (Seidle et al., 2005). Curiosamente, a mutação deste aminoácido na enzima de *T. neapolitana* não alterou significativamente a alta taxa de transglicosilação em relação à hidrólise (Pozzo et al., 2010). A estrutura cristalográfica combinada com a análise dos dados da literatura (Seidle et al., 2005) são claras em revelar um papel relevante deste

aminoácido no reconhecimento do sítio glicona do substrato. No entanto, seu papel na determinação da ocorrência de transglicosilação ainda não é claro.

#### 4.8.3. INTERAÇÃO COM O GLICEROL

Na condição de cristalização empregada, foi utilizado como aditivo o glicerol em concentração final de 3%. Durante o refinamento do modelo, observou-se uma densidade eletrônica no sítio ativo consistente com uma molécula de glicerol. A modelagem desta molécula na densidade eletrônica resultou na estrutura mostrada na figura 47. A análise do ajuste com a densidade eletrônica (correlação no espaço real) indica uma correlação superior a 80%, como calculado pelo programa PHENIX. Adicionalmente, o fator de temperatura médio para a molécula de glicerol é de 45 Å<sup>2</sup> e, para os aminoácidos na vizinhança, o fator de temperatura médio oscila entre 25 e 35 Å<sup>2</sup>.

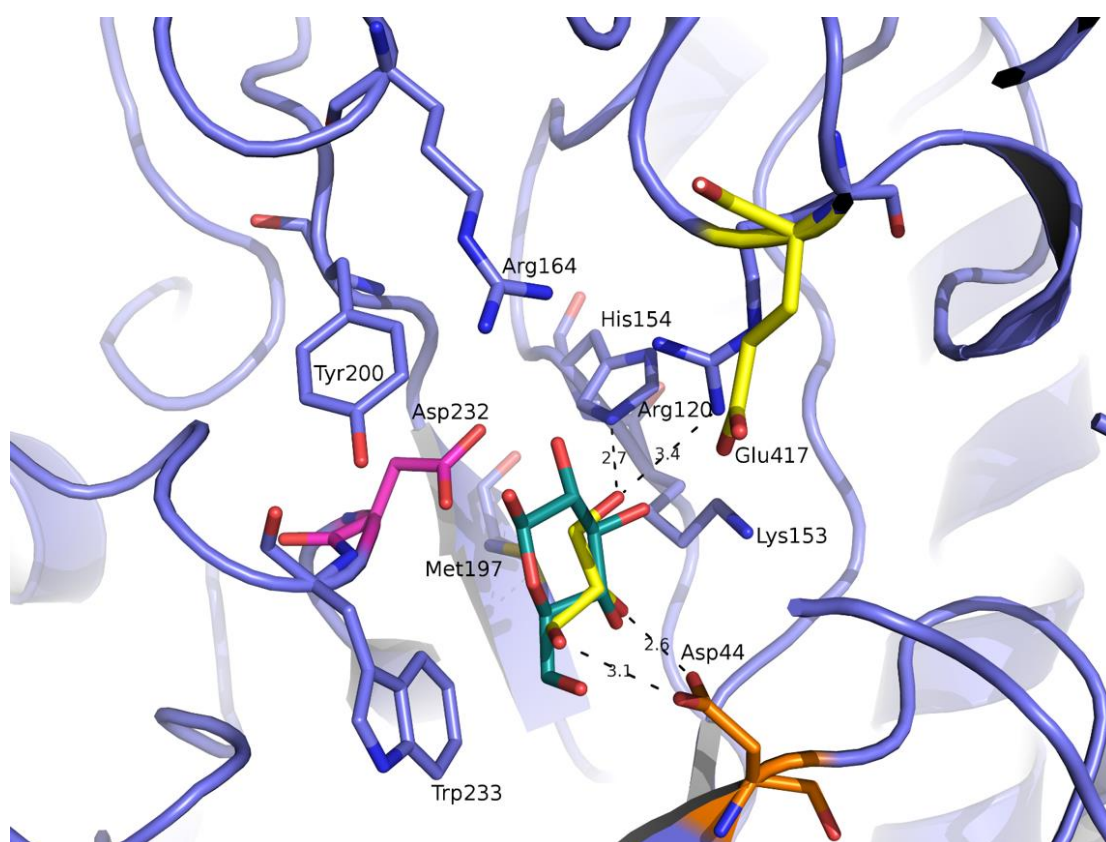


Figura 47: Análise de uma molécula de glicerol na estrutura da BaBgl.

É interessante observar que a molécula de glicerol mimetiza muitas das interações observadas para a molécula de glicose quando a estrutura da BaBgl é comparada com a estrutura da enzima de *T. neapolitana*. Aqui, observamos interações entre as hidroxilas do glicerol e a His154 NE2 (2,7 Å), Arg120 NH2 (3,4 Å), Asp44 OD1 (2,6 Å) e Asp44 OD2 (3,1 Å).

Nas últimas semanas de trabalho experimental neste projeto, foi obtido um cristal de um possível complexo da enzima BaBgl associada ao produto, glicose. Um conjunto de dados foi coletado novamente no anodo rotatório disponível no grupo de biotecnologia molecular e este conjunto de dados ainda está sendo analisado para determinar a presença da molécula de glicose no sítio ativo. As estatísticas do conjunto de dados coletado estão resumidas na tabela 8.

Tabela 8: : Estatísticas do processamento e refinamento da estrutura da enzima BaBgl com glicose.

<b>Parâmetros</b>	<b>BaBgl com glicose</b>
Comprimento de onda (Å)	1,54
Resolução (Å)	48,3 - 2,9 (3,004 - 2,9)
Grupo Espacial	P 1
Cela Unitária (Å, °)	95,02 96,527 106,52 91,56 90,96 119,35
Número Total de Reflexões	158662 (15779)
Rflexões Únicas	71250 (7049)
Multiplicidade	2,2 (2,2)
Completeza (%)	97,53 (96,17)
I/sigma(I) Médio	6,43 (1,73)
B-fator de Wilson (Å <sup>2</sup> )	34,70
R <sub>merge</sub>	0,1426 (0,5236)
R <sub>meas</sub>	0,1915
CC 1/2	0,965 (0,668)
CC*	0,991 (0,895)

$R_{work}$	0,2318 (0,3009)
$R_{free}$	0,2604 (0,3533)
Número de átomos não-hidrogênio	20178
Macromolécula	20130
Ligante	48
Água	0
Resíduos de Proteína	2693
RMS ligação (Å)	0,002
RMS ângulos (°)	0,70
Regiões Favoráveis de Ramachandran(%)	96
Regiões Permitidas de Ramachandran(%)	3,62
Regiões Proibidas de Ramachandran(%)	0,38
<i>Clashscore</i>	4,22
B-fator Médio (Å <sup>2</sup> )	31,70
Macromoléculas	31,60
Ligantes	51,60

#### 4.9. AVALIAÇÃO EXPLORATÓRIA DA FUNÇÃO DO DOMÍNIO DE FIBRONECTINA

Os resultados preliminares apresentados nessa seção, são referentes à dependência da BaBgl com o domínio FnIII.

##### 4.9.1. CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS DOMÍNIOS SEPARADOS DA BaBgl

A purificação do domínio catalítico (CCD), definido como o arranjo dos domínios TIM distorcido e domínio  $\alpha/\beta$ , e do domínio do tipo fibronectina III (FnIII),

apresentou rendimento final de 3 mg/L de solução e 14 mg/L solução. Através do programa online Protparam, foi possível estimar a massa molecular dos domínios CCD e FnIII, resultando em 59 kDa (sequência de aminoácido de 1 a 547) e 13,2 kDa (sequência de aminoácido de 548 a 671).

O gel da figura 48, apresenta as etapas de purificação do CCD. Coluna 1: marcador de baixo peso molecular de 97 a 14 kDa. Coluna 2: *flow through*. Coluna 3, 4, 5 e 6 : lavagem com 5, 10, 25 e 50 mM de imidazol. Coluna 7, 8 e 9: eluição com: 100, 130 e 200 mM de imidazol.

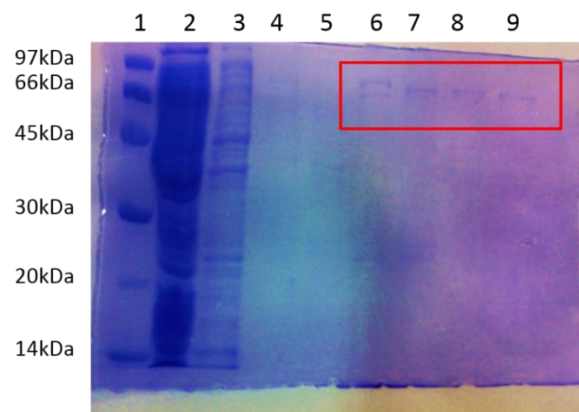


Figura 48: Gel SDS-PAGE da purificação do domínio catalítico (CCD) da Babgl. Coluna 1: marcador de baixo peso molecular de 97 a 14 kDa. Coluna 2: *flow through*. Coluna 3, 4, 5 e 6: lavagem com 5, 10, 25 e 50 mM de imidazol. Coluna 7, 8 e 9: eluição com: 100, 130 e 200 mM de imidazol.

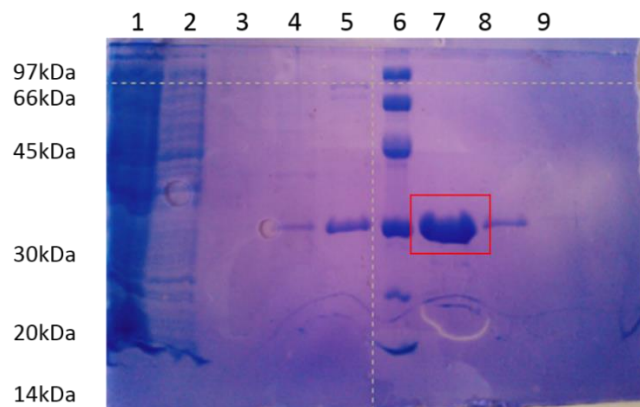


Figura 49: Gel SDS-PAGE da purificação do domínio de fibronectina tipo III (FnIII) da Babgl. Coluna 1: *flow through*. Coluna 2, 3, 4 e 5: lavagem com 5, 10, 25 e 50 mM de imidazol. Coluna 6: marcador de baixo peso molecular de 97 a 14 kDa. Coluna 7, 8 e 9: eluição com: 100, 130 e 200 mM de imidazol.

A figura 49 apresenta um gel com os passos de purificação do domínio de FnIII. Coluna 1: *flow through*. Coluna 2, 3, 4 e 5: lavagem com 5, 10, 25 e 50 mM

de imidazol. Coluna 6: marcador de baixo peso molecular de 97 a 14 kDa. Coluna 7, 8 e 9: eluição com: 100, 130 e 200 mM de imidazol. O peso molecular estimado no gel é para as enzimas com TRX e cauda de histidina, resultando aproximadamente 14 kDa a mais do peso molecular dos domínios.

#### 4.9.2. TESTES DE PULL DOWN

Estes testes foram feitos para testar a adsorção da enzima em lignina, avicel e papel filtro. Neste experimento, a proteína inteira e seus domínios foram incubados com diferentes polissacarídeos comerciais e com amostras de lignina gentilmente cedidas pelo CTBE. Dentre os polissacarídeos testados estão o Avicel, que é uma amostra cristalina de celulose, e o papel filtro, que é constituído quase integralmente por celulose amorfa. Como estes polissacarídeos têm alto peso molecular e são insolúveis, a interação da enzima inteira ou de seus domínios com as amostras resulta na precipitação da proteína, ou seja, na imobilização na fração insolúvel. Caso a interação seja *reversível*, lavagens sucessivas deveriam restabelecer quantidades detectáveis de proteína novamente na fração solúvel.

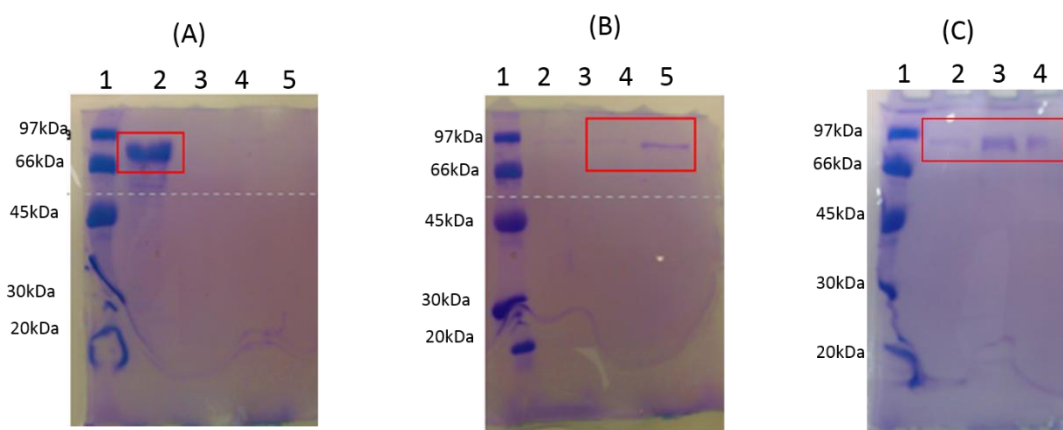


Figura 50: Gel SDS-PAGE dos testes de pull down da Babgl inteira. **A) reação com lignina:** Coluna1) marcador de baixo peso molecular (97 a 14 kDa). Coluna 2: Babgl antes da reação com os três substratos. Coluna3: sobrenadante da reação. Colunas 4 e 5: sobrenadante das lavagens da lignina. **B) reação com Avicel.** Coluna1) marcador de baixo peso molecular (97 a 14 kDa). Coluna 2: sobrenadante da reação. Colunas 3, 4 e 5: sobrenadante das lavagens do Avicel. **C) reação com papel filtro.** Coluna1) marcador de baixo peso molecular (97 a 14 kDa). Coluna 2: sobrenadante da reação. Colunas 3, 4 e 5: sobrenadante das lavagens do papel filtro.



A figura 50, mostra o gel resultado do experimento da BaBgl inteira com os substratos citados. Na figura 50 a, reação com lignina, é possível perceber que não há BaBgl no sobrenadante nem nas lavagens, indicando que a BaBgl inteira está insolúvel e fortemente adsorvida na superfície da lignina. Na reação com Avicel, figura 50 b, nota-se que não há presença de BaBgl no sobrenadante, contudo nas colunas 4 e 5, referente às lavagens, há pequenas frações da enzima, indicando que a BaBgl se liga fracamente à superfície do Avicel. De maneira similar, na reação com papel filtro, figura 50 c, nota-se frações da enzima no sobrenadante e que vai aumentando nas lavagens.

As reações feitas utilizando apenas o domínio catalítico (CCD) da BaBgl estão apresentadas nos géis da figura 51. Na figura 51 a, na reação do CCD com lignina, observa-se que uma parte do CCD sai no sobrenadante (coluna 3), porém um pouco da enzima é adsorvida na superfície da lignina não saindo nas lavagens (colunas 4 e 5). Já nas reações com Avicel e papel filtro, figuras 51 b e c, observa-se que o CCD não fica adsorvido na superfície dos substratos, pois todo ele sai no sobrenadante (colunas 2 a e 2 b).

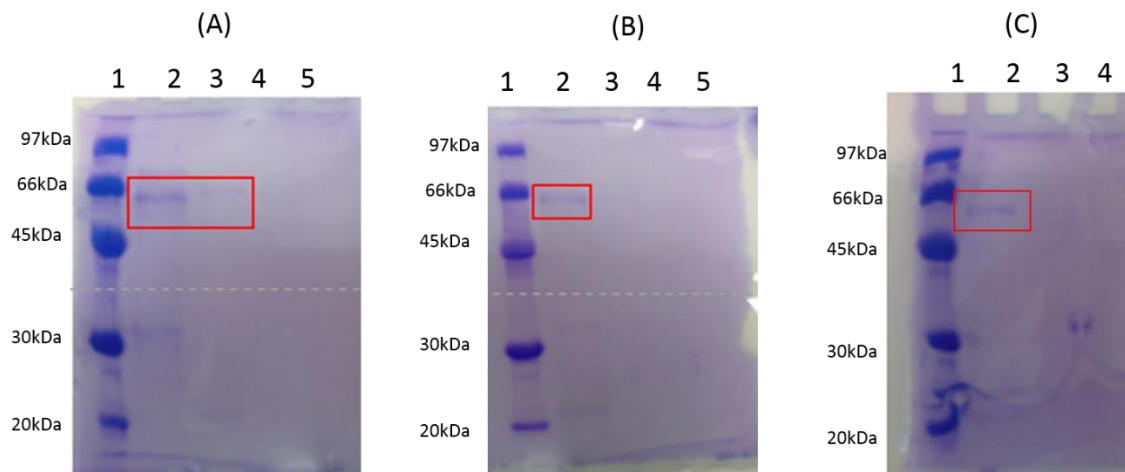


Figura 51: Gel SDS-PAGE dos testes de pull down do domínio catalítico (CCD) da Babgl. **A) reação com lignina:** Coluna1) marcador de baixo peso molecular (97 a 14 kDa). Coluna 2: CCD antes da reação com os tres substratos. Coluna3: sobrenadante da reação. Colunas 4 e 5: sobrenadante das lavagens da lignina. **B) reação com Avicel.** Coluna1) marcador de baixo peso molecular (97 a 14 kDa). Coluna 2: sobrenadante da reação. Colunas 3, 4 e 5: sobrenadante das lavagens do Avicel. **C) reação com papel filtro.** Coluna1) marcador de baixo peso molecular (97 a 14 kDa). Coluna 2: sobrenadante da reação. Colunas 3 e 4: sobrenadante das lavagens do papel filtro.

Como apenas os testes com lignina apresentaram adsorção com o CCD, foi realizado um teste de *pull down* do domínio FnIII com lignina. O resultado no

gel da figura 52, mostra que o domínio FnIII não fica adsorvido na superfície da lignina (coluna 3). Além disso, todas as lavagens possuem uma pequena porção da FnIII (coluna 4 e 5).

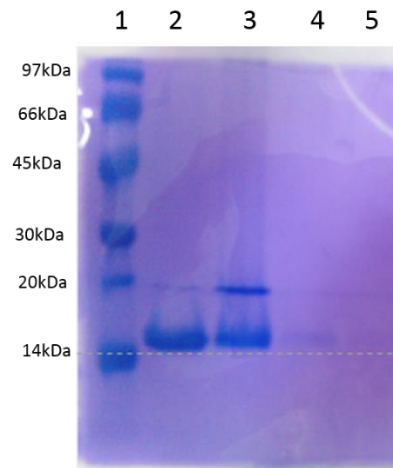


Figura 52: Gel SDS-PAGE dos testes de pull down do domínio de fibronectina III (FnIII) da Babgl na reação com lignina. Coluna1) marcador de baixo peso molecular (97 a 14 kDa). Coluna 2: FnIII antes da reação com lignina. Coluna3: sobrenadante da reação. Colunas 4 e 5: sobrenadante das lavagens da lignina.

Os testes de *pull down* mostraram que a enzima inteira liga-se fortemente à lignina, porém o CCD não, indicando que a interação da BaBgl depende da presença do domínio FnIII, mas não está restrita a uma interação deste domínio com a lignina.

Estes resultados complementam a proposta de Lima e colaboradores (Lima et al., 2013). Naquele trabalho, os autores propuseram que o papel do domínio FnIII poderia estar relacionado à interação observada entre a enzima e polissacarídeos ou à lignina. Os resultados desta tese, com os domínios isolados demonstram, no entanto, que o domínio FnIII é sim necessário para a interação, mas que esta interação depende do arranjo deste domínio com o domínio CCD.

#### 4.9.3. ENSAIOS ENZIMÁTICOS COMPARATIVOS ENTRE A BaBgl INTEIRA E O DOMÍNIO CCD

Os ensaios de atividade da BaBgl e do CCD da enzima foram realizados em pNPG e celobiose e estão mostrados na figura 53. As atividades relativas mostram que em pNPG, o CCD praticamente não possui atividade, e em celobiose a atividade cai em quase 90% sem o domínio FnIII.

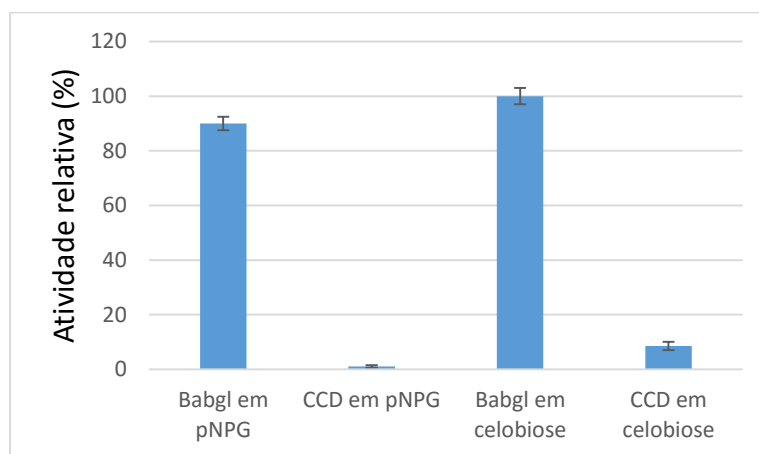


Figura 53: Atividade relativa da Babgl inteira e do CCD contra pNPG e celobiose.

Em resumo, os resultados das análises preliminares da dependência da atividade da BaBgl com o domínio FnIII mostraram que a FnIII tem papel fundamental na atividade da BaBgl com substratos natural e sintético.

## 4.10 REFINAMENTO E ANÁLISE ESTRUTURAL DE DUAS $\beta$ -GLICOSIDASES DA FAMÍLIA GH 1.

### 4.10.1. $\beta$ -GLICOSIDASES DA FAMÍLIA GH 1

Como dito na introdução desta tese, as duas famílias mais importantes em número de membros de  $\beta$ -glicosidases são as famílias GH 1 e GH 3. As enzimas da família GH 1 já foram melhor caracterizadas e, de acordo com a base de dados CAZy (V Lombard, Golaconda Ramulu, Drula, Coutinho, & Henrissat, 2014), há 29 estruturas cristalográficas de  $\beta$ -glicosidases conhecidas nesta família, com 213

enzimas já caracterizadas através de ensaios bioquímicos. Para fins de comparação, na família GH 3 há 10 estruturas de  $\beta$ -glicosidases, com 186 enzimas caracterizadas.

As  $\beta$ -glicosidases da família GH 1 são tipicamente enoveladas na forma de um único domínio com enovelamento do tipo barril TIM ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>. Estas enzimas utilizam dois ácidos glutâmicos como aminoácidos catalíticos em um mecanismo que envolve a manutenção da configuração do carbono anomérico (Dale, Ensley, Kern, Sastry, & Byers, 1985).

Em condições específicas, algumas  $\beta$ -glicosidases podem catalisar a reação inversa, resultando na síntese de oligo ou polissacarídeos (Faijes & Planas, 2007). Perturbando o equilíbrio, a reação de hidrólise pode ser conduzida no sentido invertido. Alternativamente, a alteração nas rotas de reação, i.e., através de um controle cinético distinto, a reação de transglicosilação pode ser catalisada por algumas  $\beta$ -glicosidases (Frutuoso & Marana, 2013). O balanço entre hidrólise e transglicosilação pode ter aplicações bastante interessantes. No contexto da sacarificação da biomassa, a transglicosilação resulta no decréscimo do rendimento de açúcares fermentáveis produzidos. Por outro lado, a produção enzimática de oligossacarídeos pode ser interessante, uma vez que quantidades relativamente altas de açúcares são produzidos com uma estereoquímica e regioquímica bem definidos, especialmente se comparados com os métodos clássicos de síntese orgânica (Faijes & Planas, 2007).

O grupo de Biotecnologia Molecular do Instituto de Física de São Carlos tem estudado algumas  $\beta$ -glicosidases da família GH 1. Especificamente, a então mestranda do grupo Hêmily S. Mutti caracterizou o perfil bioquímico de duas  $\beta$ -glicosidases da família GH 1 oriundas do fungo filamentoso *Trichoderma harzianum*, ThBgl1 e ThBgl2. Estas enzimas apresentam um perfil bioquímico bastante distinto e, mais curiosamente, apresentam um balanço de hidrólise/transglicosilação distinto. A enzima ThBgl1 tem uma forte tendência à transglicosilação em concentrações mais altas de substrato enquanto a enzima ThBgl2 é predominantemente uma enzima que catalisa a hidrólise. Os mecanismos estruturais envolvidos na seletividade de ação destas enzimas foram estudados como parte do trabalho apresentado nesta tese e estão descritos nas seções seguintes.

#### 4.10.2. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS ENZIMAS ThBgl1 e ThBgl2 e MECANISMOS DE TRANSGLICOSILAÇÃO

Para compreender os mecanismos estruturais envolvidos na seletividade das enzimas quanto ao balanço hidrólise/transglicosilação, as estruturas das duas enzimas foram determinadas por substituição molecular empregando como modelo a enzima de *Trichoderma reesei* (TrBgl2). As estatísticas do processamento dos conjuntos de dados de difração e do refinamento dos modelos das enzimas ThBgl1 e ThBgl2 estão mostrados na tabela 9.

Tabela 9: Estatísticas do processamento e refinamento das estruturas das enzimas ThBgl1 e ThBgl2.

<b>Parâmetros</b>	<b>ThBgl1</b>	<b>ThBgl2</b>
Comprimento de onda (Å)	1,46	1,54
Resolução (Å)	71,92 – 2,59 (2,69 – 2,59)	61,64 – 1,97 (2,04 – 1,97)
Grupo espacial	P 21 21 21	P 21 21 21
Cela unitária	94,9	57,5
	97,7	78,1
	106,2	100,3
Reflexões totais	31201 (3016)	32663 (3212)
Multiplicidade	2,2	4,5
Completeza (%)	99,7 (97,5)	100,0 (100,00)
I/sigma médio	8,3 (2,2)	8,7 (3,1)
B-fator de Wilson (Å <sup>2</sup> )	17,46	9,26
R <sub>merge</sub>	0,54	0,50
R <sub>work</sub>	0,2280	0,2025
R <sub>free</sub>	0,2770	0,2231
Número de átomos	7574	4619
Macromoléculas	7448	3798
Água	126	821

Aminoácidos	930	475
RMS (ligações) (Å)	0,016	0,002
RMS (ângulos) (°)	1,55	0,68
Regiões favorecidas de Ramachandran	97	97
Regiões fora de Ramachandran	0	0
<i>Clashscore</i>	6,08	4,49
B-fator médio	18,50	9,6
solvente	6,9	17,6

As estruturas cristalográficas demonstram um enovelamento típico para as  $\beta$ -glicosidases da família GH 1, com o enovelamento na forma de um barril TIM  $(\alpha/\beta)_8$  e com similaridades importantes entre as estruturas. A superposição entre as estruturas resulta em um desvio posicional quadrático médio (RMSD) de 0,7 Å, calculado para 397 átomos C $\alpha$ . Em termos da estrutura geral, apenas mudanças sutis são observadas entre as estruturas das enzimas ThBgl1 e ThBgl2, sendo que a diferença no tamanho do *loop* conectando as duas hélices alfa entre as fitas  $\beta_4$  e  $\beta_5$  se mostrou a principal diferença, como mostrado na figura 54. Na enzima ThBgl1 o *loop* é mais curto, envolvendo os aminoácidos 185 a 187, enquanto na enzima ThBgl2 o *loop* é mais longo e envolve os aminoácidos 191 a 202. Contudo, o *loop* é exposto ao solvente e parece ser intrinsecamente flexível e não parece ser relevante para determinar o balanço entre hidrólise e transglicosilação.

A comparação das estruturas das enzimas ThBgl1 e ThBgl2 com a enzima de *Neotermes koshunensis* (PDB 3AI0 (Jeng et al., 2011)) inequivocamente revela a região do sítio ativo e os aminoácidos catalíticos para as duas enzimas. Baseado na superposição das estruturas das enzimas ThBgl1 e ThBgl2 com a enzima de *N. koshunensis* ligada à glicose, as interações potenciais do sítio glicona com a enzima podem também ser avaliadas (Figura 55). O aminoácido nucleófilo E367/E384 (numeração ThBgl1/ThBgl2) encontra-se a uma distância de 3,5 Å do carbono C1 do açúcar glicona enquanto o ácido/base geral E166/172 encontra-se a uma distância de 3,7 Å do mesmo átomo. O ácido/base geral interage ainda com a hidroxila OH2 (2,5 Å de distância) enquanto a glutamina Gln17/22 e o Glu424/441 interagem com

as hidroxilas nas posições 3 (2,2 Å) e 4 (2,1 Å). O triptofano Trp425/442 também interage com o grupo hidroxila na posição 3 (2,7 Å) através do NE1.

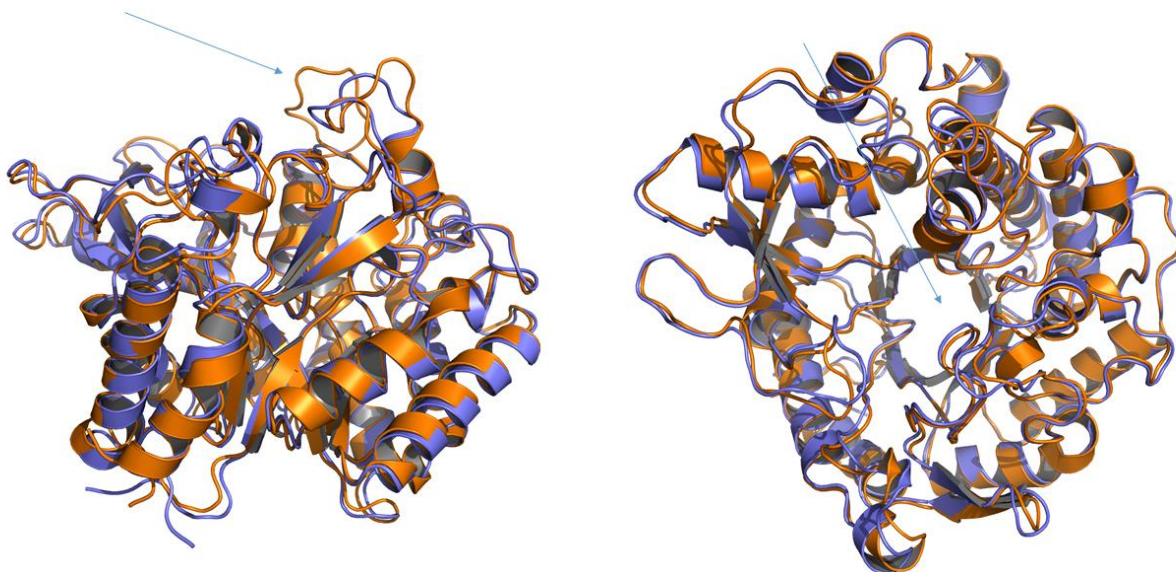


Figura 54. Estrutura cristalográfica da enzima ThBgl1 (azul) e ThBgl2 (laranja) superpostas pelos seus C $\alpha$ . A seta na figura à esquerda indica a inserção do loop envolvendo os aminoácidos 198-202 na enzima ThBgl2. A seta na figura à direita indica a região do sítio ativo.

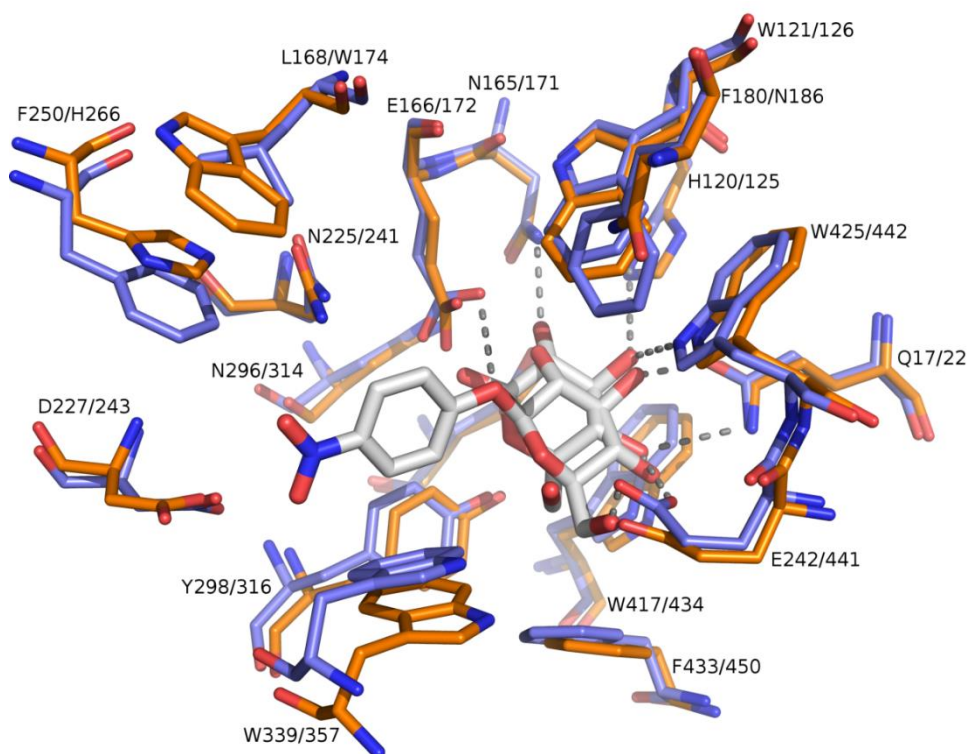


Figura 55: Interações do sítio glicona com a estrutura das enzimas ThBgl1 e ThBgl2.

A julgar pela superposição da estrutura cristalográfica da enzima de *N. koshunensis* ligada ao substrato sintético pNPG, o açúcar no sítio aglicona aparenta estar mais fracamente ligado, com apenas duas ligações de hidrogênio sendo observadas entre o grupo hidroxila OH6 com o Glu166/172 e a hidroxila na posição OH1 interagindo com o Asp227/243, de acordo com o modelo da superposição.

Quando comparadas as estruturas das enzimas ThBgl1 e ThBgl2, as substituições mais importantes na região do sítio ativo são observadas para F180/N186 e F250/H266. Ambas as substituições tornam o bolsão catalítico da enzima ThBgl2 mais polar do que o bolsão catalítico da enzima ThBgl1. De fato, o potencial eletrostático calculado no vácuo com o programa PyMol (Schrödinger, 2010) para as duas enzimas mostra uma distribuição de cargas bastante dissimilar, como mostra a figura 56. O potencial eletrostático calculado para a superfície das enzimas revela não somente um sítio ativo mais polar para a enzima ThBgl2, como revela também um canal de acesso para o substrato e para o solvente mais exposto do que aquele observado para a enzima ThBgl1.

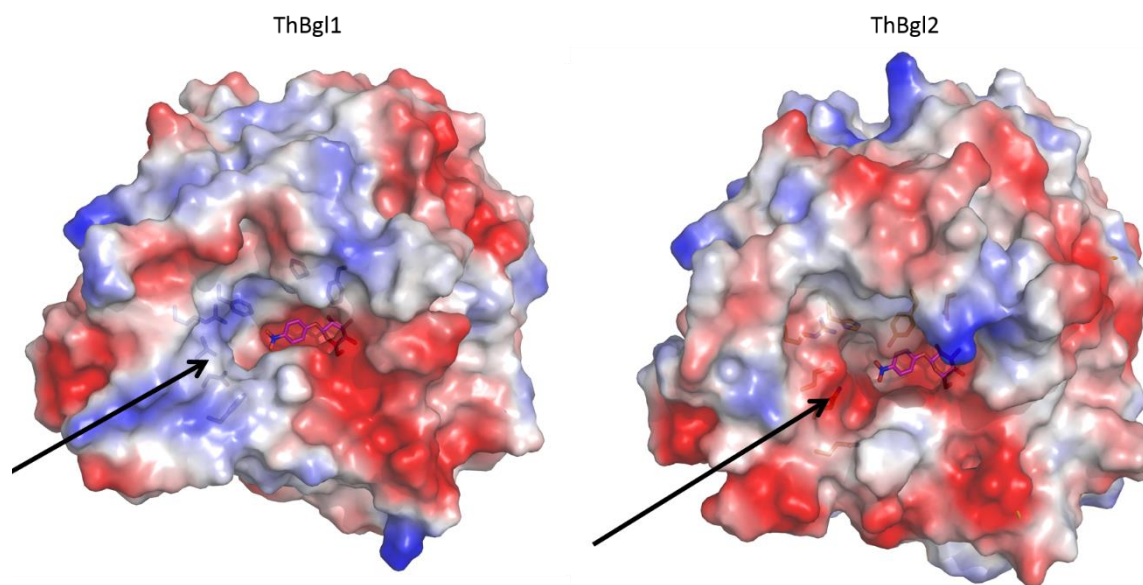


Figura 56: Potencial eletrostático (no vácuo) para a superfície das enzimas ThBgl1 (esquerda) e ThBgl2 (direita). As cores variam de azul a vermelho indicando um potencial com maior densidade de cargas positivas e negativas, respectivamente.

Como estas diferenças estruturais alteram o balanço hidrólise/transglicosilação nestas  $\beta$ -glicosidases GH 1? Já foi proposto na literatura



um modelo mecanístico onde a disponibilidade de moléculas do solvente regula a rota de reação. De acordo com esta proposta, uma disponibilidade maior de moléculas de água na região do sítio ativo direcionaria a reação para o mecanismo de hidrólise (como mostrado na figura 14). Por outro lado, uma região com menor disponibilidade de moléculas do solvente direcionaria o controle cinético da reação para a transglicosilação.

As estruturas cristalográficas das enzimas ThBgl1 e ThBgl2 parecem corroborar este modelo previamente proposto. A enzima ThBgl2, que é a enzima que apresenta marcadamente o mecanismo de hidrólise como o mecanismo principal, mesmo em altas concentrações de substrato, apresenta um sítio ativo mais exposto ao solvente e mais polar, sendo mais propício, portanto, à presença de moléculas de água no bolsão catalítico. De maneira análoga, a substituição de aminoácidos polares por aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos em ThBgl1 somada a um sítio ativo mais fechado dificulta a presença de moléculas água na região para a catálise, direcionando, portanto, o controle cinético da reação para a transglicosilação.

Vale a pena destacar o papel da substituição F180/N186. A mutação K201F na  $\beta$ -glicosidase de *Spodoptera frugiperda*, em posição similar à da Phe180 em ThBgl1 e Asn186 em ThBgl2, mostrou-se capaz de aumentar a fração de reações seguindo a rota de transglicosilação de 30 para 56% (Frutuoso & Marana, 2013), revelando que a presença de um aminoácido apolar nesta posição tem um papel importante para determinar a ocorrência da reação de transglicosilação. Efetivamente, Frutuoso e Marana também atribuem o efeito a alterações no canal de “águas catalíticas”, ou seja, no canal responsável pela chegada de moléculas de água ao sítio ativo da enzima. Desta forma, os dados estruturais mostrados neste trabalho proveem uma base estrutural para a seletividade nos mecanismos de transglicosilação observados para as enzimas ThBgl1 e ThBgl2.



## Capítulo 5

### Conclusões e perspectivas

---

O presente trabalho determinou as características bioquímicas e estruturais de uma  $\beta$ -glicosidase de *Bifidobacterium adolescentis*. A BaBgl possui aproximadamente 80 kDa de peso molecular e um domínio catalítico e um domínio do tipo FnIII. A caracterização bioquímica da Babgl foi realizada através de ensaios de atividade e cálculos de parâmetros cinéticos. A enzima é monomérica em solução e possui atividade máxima em pH próximo a neutralidade (entre 6,0 e 6,5) e temperatura ótima a 45 °C. Esse valor de pH é condizente com o valor encontrado nos testes de DSF para estabilidade da enzima. Os parâmetros cinéticos medidos,  $K_M$  e  $V_{m\acute{a}x}$ , foram de  $0,32\pm 0,03$  mM e  $0,37\pm 0,01$  nmol/min respectivamente indicando alta afinidade com o pNPG. Além disso, a BaBgl é fortemente inibida por glicose enquanto a maioria das  $\beta$ -glicosidases são fracamente inibidas por esse monossacarídeo.

No tampão Bis tris a 30 °C o tempo de meia vida da enzima aumenta consideravelmente chegando a 120 minutos. Em temperaturas mais altas, como a temperatura ótima de 45 °C, a enzima apresentou um baixo tempo de meia vida. Indicando a provável desnaturação da enzima nessa temperatura. A enzima possui duas temperaturas de transição de desnaturação, em 45 °C e 80 °C, provavelmente ocasionado por diferentes temperaturas de desenovelamento de cada um dos seus domínios.

A adição de sais contendo íons metálicos inibiu significativamente a atividade da enzima sobre o substrato pNPG, enquanto que o EDTA aumentou em quase 20% a atividade da enzima indicando que a enzima sofre com a ação de íons metálicos pois o EDTA é um agente quelante capaz de formar complexos extremamente estáveis com íons metálicos.

A alta especificidade da enzima por pNPG indica que a atividade enzimática da BaBgl não depende apenas da existência de ligações O-glicosídicas, mas principalmente da posição do monossacarídeo, a posição da ligação e o comprimento da cadeia a ser hidrolisada. Prova disso, é que a análise do sítio ativo da enzima com glicose indica interação do grupo hidroximetil do carbono C5 da molécula com o ASP44, o que não ocorre na ligação com a xilose do pNP-xilopiranosídeo. Isso aponta para uma interação muito menos eficiente do substrato com a enzima, o que explicaria a menor seletividade para BaBgl.

A atividade da BaBgl aumentou significativamente na presença de alguns monossacarídeos como galactose e xilose e também na presença de glicerol. O glicerol causa o efeito de hidrofobicidade estabilizando os grupos menos polares na superfície da proteína. Já a galactose e a xilose, podem ter aumentado a atividade devido a efeitos de hidrofobicidade semelhantes ao glicerol ou por um efeito de regulação alostérica. De qualquer forma é importante salientar que nenhum dos ligantes testados na atividade da Babgl alterou significativamente o  $T_M$  da enzima.

A BaBgl não realiza reações de transglicosilação embora o Trp233, apontado na  $\beta$ -glicosidase de *A. niger* como crucial na determinação da transglicosilação, esteja presente no sítio ativo da enzima. O Trp 233 possui papel relevante no reconhecimento do sítio glicona do substrato, porém seu papel na determinação da ocorrência de transglicosilação ainda não é claro.

A análise qualitativa do domínio FnIII da BaBgl não permitiu definir qual sua função na estrutura da enzima, porém é possível afirmar que este domínio é essencial para a atividade da enzima mas não determina a ligação com a lignina.

Os resultados das análises das estruturas da ThBgl1 e ThBgl 2 juntamente com os resultados dos testes de transglicosilação dessas enzimas, mostram que a enzima ThBgl2 tem maior potencial de hidrólise do que de transglicosilação ao contrário da ThBgl1. A explicação foi feita através da análise de moléculas de água no sítio ativo dessas enzimas: a presença de aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos em ThBgl1 somada a um sítio ativo mais fechado, dificulta a presença de moléculas água na região para a catálise, favorecendo a transglicosilação, enquanto que na ThBgl2 possui um sítio ativo mais exposto e polar, permitindo com maior facilidade a entrada de moléculas de água.

Os resultados apresentados contribuem para elucidar as funções estruturais e funcionais das  $\beta$ -glicosidases estudadas. Como perspectivas futuras, pretende-se refinar as estruturas já cristalizadas da BaBgl com glicose além de testar mecanismos de transglicosilação utilizando aceptores álcoois como foi analisado em outras  $\beta$ -glicosidases da família GH 3. Pretende-se também, explorar mais detalhadamente a função do domínio de FnIII presente na estrutura da BaBgl.



# Referências Bibliográficas

---

- Afonine, P. V., Grosse-Kunstleve, R. W., Echols, N., Headd, J. J., Moriarty, N. W., Mustyakimov, M., ... Adams, P. D. (2012). Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 68, 352–367. <http://doi.org/10.1107/s0907444912001308>
- Alves, R. E. (2011). Caracterização de fibras lignocelulósicas pré-tratadas por meio de técnicas espectroscópicas e microscópicas ópticas de alta resolução, 115. <http://doi.org/http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/88/88131/tde-11082011-143629/pt-br.php>
- Aslanidis, C., & de Jong, P. J. (1990). Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Research*, 18(20), 6069–6074. <http://doi.org/10.1093/nar/18.20.6069>
- Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 52(2), 858–875. <http://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.08.013>
- Bhat, S. Bhat, K. M. (1997). Food Macromolecular Science Department, Institute of Food Research Reading Laboratory, Earley Gate, Whiteknights Road, Reading, RG6 6BZ, United Kingdom. *Biotechnology Advances*, 15, 583–620. [http://doi.org/10.1016/S0734-9750\(97\)00006-2](http://doi.org/10.1016/S0734-9750(97)00006-2)
- Bidlack, J., Malone, M., & Benson, R. (1992). Molecular Structure and components integration of secondary cell walls in plants. *Proc.Okla.Acad.Sci.*, 75 , 51–56.
- Bowers, E. M., Ragland, L. O., & Byers, L. D. (2007). Salt effects on  $\beta$ -glucosidase: pH-profile narrowing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1774(12), 1500–1507. <http://doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.10.007>
- Branden, C., & Tooze, J. (1999). *Introduction to Protein Structure* (2nd ed.). Nova Iorque: Garland Publishing.

Cairns, J. R. K., & Esen, A. (2010).  $\beta$ -Glucosidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(20), 3389–3405. <http://doi.org/10.1007/s00018-010-0399-2>

(CAMILO, C. M.; POLIKARPOV, IGOR . High-throughput cloning, expression and purification of glycoside hydrolases using Ligation-Independent Cloning (LIC). *Protein Expression and Purification (Print)*, v. 26, p. 35-42, 2014.)

Cardona, C. a., Quintero, J. a., & Paz, I. C. (2010). Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresource Technology*, 101(13), 4754–4766. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.097>

Chen, V. B., Arendall III, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., ... Richardson, D. C. (2010). MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 66, 12–21. <http://doi.org/10.1107/s0907444909042073>

Chundawat, S. P. S., Beckham, G. T., Himmel, M. E., & Dale, B. E. (2011). Deconstruction of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2(1), 121–145. <http://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061010-114205>

Czjzek, M., Cicek, M., Zamboni, V., Burmeister, W. P., Bevan, D. R., Henrissat, B., & Esen, A. (2001). Crystal structure of a monocotyledon (maize ZMGluc1)  $\beta$ -glucosidase and a model of its complex with p-nitrophenyl  $\beta$ -D-thioglucoside. *Biochemical Journal*, 46(354), 37–46.

Dalby, P. a. (2007). Engineering enzymes for biocatalysis. *Recent Patents on Biotechnology*, 1, 1–9. <http://doi.org/10.2174/187220807779813929>

Dale, M. P., Ensley, H. E., Kern, K., Sastry, K. a, & Byers, L. D. (1985). Reversible inhibitors of beta-glucosidase. *Biochemistry*, 24(14), 3530–3539. <http://doi.org/10.1021/bi00335a022>



- Dan, S., Marton, I., Dekel, M., Bravdo, B., He, S., Withers, S. G., & Shoseyov, O. (2000). Identification of Family 3  $\beta$ -Glucosidase from *Aspergillus niger*. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(7), 4973–4980.
- Desrochers, M., Jurasek, L., & Paice, M. G. (1981). High Production of beta-Glucosidase in *Schizophyllum commune*: Isolation of the Enzyme and Effect of the Culture Filtrate on Cellulose Hydrolysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 41(1), 222–228.
- Diogo, A., Cota, J., Corre, T. L. R., Hoffmam, Z. B., Garcia, W., Oliveira, L. C., ... Squina, F. M. (2015). Comparative analysis of three hyperthermophilic GH1 and GH3 family members with industrial potential. *Journal of Biotechnology*, 3(1), 13–20. <http://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.07.009>
- Dodd, D.; Cann, I. K. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *GCB Bioenergy*, [S. l.], v. 1, p. 2–17, 2009.
- Emsley, P., & Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 60(Pt 12 Pt 1), 2126–32. <http://doi.org/10.1107/S0907444904019158>
- Evans, P. R. (2011). An introduction to data reduction: space-group determination, scaling and intensity statistics. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 67, 282–292. <http://doi.org/10.1107/s090744491003982x>
- Faijes, M., & Planas, A. (2007). In vitro synthesis of artificial polysaccharides by glycosidases and glycosynthases. *Carbohydrate Research*, 342(12-13), 1581–1594. <http://doi.org/10.1016/j.carres.2007.06.015>
- Feng, H.-Y. (2005). Converting a  $\beta$ -Glucosidase into a  $\beta$ -Transglycosidase by Directed Evolution. *Journal of Biological Chemistry*, 280(44), 37088–37097. <http://doi.org/10.1074/jbc.M502873200>
- Frutuoso, M. a, & Marana, S. R. (2013). A single amino acid residue determines the ratio of hydrolysis to transglycosylation catalyzed by  $\beta$ -glucosidases. *Protein and*

Peptide Letters, 20(1), 102–6. Retrieved from  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22670763>

GE Healthcare. (2006). Gel Filtration Calibration Kit, 4.

Gekko, K., & Timasheff, S. N. (1981). Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures. *Biochemistry*, 20(16), 4667–4676. <http://doi.org/10.1021/bi00519a023>

Henrissat, B., Vegetales, M., & Grenoble, F. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based sequence similarities amino acid. *Biochemical Journal*, 280((Pt 2)), 309–316. <http://doi.org/10.1007/s007920050009>

Holm, L., & Rosenström, P. (2010). Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res*, 38, W545–9. <http://doi.org/10.1093/nar/gkq366>

Hrmova, M., Varghese, J. N., De Gori, R., Smith, B. J., Driguez, H., & Fincher, G. B. (2001). Catalytic Mechanisms and Reaction Intermediates along the Hydrolytic Pathway of a Plant  $\beta$ -D-glucan Glucohydrolase. *Structure*, 9(11), 1005–1016. [http://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00673-6](http://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00673-6)

Jeng, W. Y., Wang, N. C., Lin, M. H., Lin, C. T., Liaw, Y. C., Chang, W. J., ... Wang, A. H. J. (2011). Structural and functional analysis of three  $\beta$ -glucosidases from bacterium *Clostridium cellulovorans*, fungus *Trichoderma reesei* and termite *Neotermes koshunensis*. *Journal of Structural Biology*, 173(1), 46–56. <http://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.07.008>

Joner Daroit, D. (2007). Caracterizacao de uma Beta-Glicosidase de *Monascus purpureus*, 137.

Kabsch, W. (2010). XDS. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 66(2), 125–132. <http://doi.org/10.1107/S0907444909047337>

Kataeva, I. a., Seidel, R. D., Shah, A., West, L. T., Li, X. L., & Ljungdahl, L. G. (2002). The fibronectin type 3-like repeat from the *Clostridium thermocellum* cellobiohydrolase CbHa promotes hydrolysis of cellulose by modifying its surface.

Applied and Environmental Microbiology, 68(9), 4292–4300.  
<http://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4292-4300.2002>

Kim, Y., Dementieva, I., Zhou, M., Wu, R., Lezondra, L., Quartey, P., ... Joachimiak, A. (2004). Automation of protein purification for structural genomics. *Journal of Structural and Functional Genomics*, 5(1-2), 111–118.  
<http://doi.org/10.1023/B:JSFG.0000029206.07778.fc>

Kittl, R., & Withers, S. G. (2010). New approaches to enzymatic glycoside synthesis through directed evolution. *Carbohydrate Research*, 345(10), 1272–1279.  
<http://doi.org/10.1016/j.carres.2010.04.002>

KUNST, A.; DRAEGER, B.; ZIEGENHORN, J. (1984) Colorimetric methods with glucose oxidase and peroxidase. In: BERGMEYER, H. U. et al (Ed.). *Methods of enzymatic analysis*. Deerfield Beach, Fla: Verlag Chemie, p.178-185.

Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hågerdal, B., Tengborg, C., Stenberg, K., Zacchi, G., & Nilvebrant, N.-O. (1999). The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and Microbial Technology*, 24(3-4), 151–159. [http://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00101-X](http://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00101-X)

Leandro, P., Lechner, M. C., Tavares de Almeida, I., & Konecki, D. (2001). Glycerol increases the yield and activity of human phenylalanine hydroxylase mutant enzymes produced in a prokaryotic expression system. *Molecular Genetics and Metabolism*, 73(2), 173–178. <http://doi.org/10.1006/mgme.2001.3172>

Levasseur, A., Drula, E., Lombard, V., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2013). Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnol Biofuels*, 6, 41. <http://doi.org/10.1186/1754-6834-6-41>

Lima, M. a., Oliveira-Neto, M., Kadowaki, M. a. S., Rosseto, F. R., Prates, E. T., Squina, F. M., ... Polikarpov, I. (2013). *Aspergillus niger* -Glucosidase Has a Cellulase-like Tadpole Molecular Shape: INSIGHTS INTO GLYCOSIDE HYDROLASE FAMILY 3 (GH3) -GLUCOSIDASE STRUCTURE AND

- FUNCTION. *Journal of Biological Chemistry*, 288(46), 32991–33005. <http://doi.org/10.1074/jbc.M113.479279>
- Litzinger, S., Fischer, S., Polzer, P., Diederichs, K., Welte, W., & Mayer, C. (2010). Structural and kinetic analysis of *Bacillus subtilis* N-acetylglucosaminidase reveals a unique Asp-His dyad mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(46), 35675–35684. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.131037>
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), 490–495. <http://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res*, 42, D490–5. <http://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>
- Mackenzie, L. F., Wang, Q., Warren, R. A. J., & Withers, S. G. (1998). Glycosynthases: Mutant Glycosidases for Oligosaccharide Synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 120(16), 5583–5584. <http://doi.org/10.1021/ja980833d>
- MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. *Bioquímica básica*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
- McCarter, J. D., & Withers, S. G. (1994). Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Current Opinion in Structural Biology*, 4, 885–892. [http://doi.org/10.1016/0959-440X\(94\)90271-2](http://doi.org/10.1016/0959-440X(94)90271-2)
- McCoy, A. J. (2007). Solving structures of protein complexes by molecular replacement with Phaser. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 63(Pt 1), 32–41. <http://doi.org/10.1107/S0907444906045975>
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., & Read, R. J. (2007). Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr*, 40, 658–674. <http://doi.org/10.1107/S0021889807021206>

- Morais, S. A. L. De, Nascimento, E. A. Do, & Melo, D. C. De. (2005). Análise da madeira de *Pinus oocarpa* parte I: estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. *Revista Árvore*, 29(3), 461–470. <http://doi.org/10.1590/S0100-67622005000300014>
- Mosier, N. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96(6), 673–686. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.025>
- Mutti, S. H. (2014). Estudos estruturais e funcionais de duas  $\beta$ -glicosidases de *Trichoderma harzianum*, 109. Disponível em: [http://www.btdt.ufscar.br/htdocs/tedeSimplificado//tde\\_busca/arquivo.php?codArquivo=8172](http://www.btdt.ufscar.br/htdocs/tedeSimplificado//tde_busca/arquivo.php?codArquivo=8172)
- Nakatani, Y., Cutfield, S. M., Cowieson, N. P., & Cutfield, J. F. (2012). Structure and activity of exo-1,3/1,4- $\beta$ -glucanase from marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. BB1 showing a novel C-terminal domain. *FEBS Journal*, 279(3), 464–478. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08439.x>
- Nascimento, A. S., Muniz, J. R. C., Aparício, R., Golubev, A. M., & Polikarpov, I. (2014). Insights into the structure and function of fungal  $\beta$ -mannosidases from glycoside hydrolase family 2 based on multiple crystal structures of the *Trichoderma harzianum* enzyme. *The FEBS Journal*, 281(18), 4165–78. <http://doi.org/10.1111/febs.12894>
- Niesen, F. H.; Berglund, H.; Vedadi, M. (2007). The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nature Protocols* 2, 2212 – 2221. doi:10.1038/nprot.2007.321.
- Paal, K., Ito, M., & Withers, S. G. (2004). *Paenibacillus* sp. TS12 glucosylceramidase: kinetic studies of a novel sub-family of family 3 glycosidases and identification of the catalytic residues. *The Biochemical Journal*, 378(Pt 1), 141–9. <http://doi.org/10.1042/BJ20031028>

- Payne, C. M., Knott, B. C., Mayes, H. B., Hansson, H., Himmel, M. E., Sandgren, M., ... Beckham, G. T. (2015). Fungal Cellulases. *Chemical Reviews*, 115(3), 1308–1448. <http://doi.org/10.1021/cr500351c>
- Phitsuwan, P., Laohakunjit, N., Kerdchoechuen, O., Kyu, K. L., & Ratanakhanokchai, K. (2013). Present and potential applications of cellulases in agriculture, biotechnology, and bioenergy. *Folia Microbiologica*, 58(2), 163–176. <http://doi.org/10.1007/s12223-012-0184-8>
- Popper, Z. a. (2008). Evolution and diversity of green plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(3), 286–292. <http://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.02.012>
- Pozzo, T., Pasten, J. L., Karlsson, E. N., & Logan, D. T. (2010). Structural and Functional Analyses of ??-Glucosidase 3B from *Thermotoga neapolitana*: A Thermostable Three-Domain Representative of Glycoside Hydrolase 3. *Journal of Molecular Biology*, 397(3), 724–739. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.01.072>
- Rabelo, S. C. (2010). Avaliação E Otimização De Pré-Tratamentos E Hidrólise Enzimática Do Bagaço De Cana-De-Açúcar Para a Produção De Etanol De Segunda Geração, 447.
- 1 RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHCHORN, S. E. *Biologia vegetal*. 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- Rubin, E. M. (2008). Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, 454(7206), 841–845. <http://doi.org/10.1038/nature07190>
- Schrödinger, L. (2010). The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1.
- Seidle, H. F., McKenzie, K., Marten, I., Shoseyov, O., & Huber, R. E. (2005). Trp-262 is a key residue for the hydrolytic and transglucosidic reactivity of the *Aspergillus niger* family 3 ??-glucosidase: Substitution results in enzymes with mainly transglucosidic activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444, 66–75. <http://doi.org/10.1016/j.abb.2005.09.013>

- Sternberg, D., Vuayakumar, P., & Reese, E. T. (1977).  $\beta$ -Glucosidase: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. *Canadian Journal of Microbiology*, 23(2), 139–147. <http://doi.org/10.1139/m77-020>
- Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41(1), 207–234. <http://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>
- Teugjas, H., & Våljamäe, P. (2013). Selecting  $\beta$ -glucosidases to support cellulases in cellulose saccharification. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 105. <http://doi.org/10.1186/1754-6834-6-105>
- Tsuchida, J., Rezende, C., de Oliveira-Silva, R., Lima, M., D'Eurydice, M., Polikarpov, I., & Bonagamba, T. (2014).  $^1\text{H}$  NMR investigation of water accessibility in cellulose of pretreated sugarcane bagasse. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 127. <http://doi.org/10.1186/PREACCEPT-1868043550122633>
- Ueno, H., & Miyashita, K. (1990). Purification and some properties of extracellular chitinases from *Streptomyces* sp. S-84. *Journal of General and ...*, 392(December), 377–392. <http://doi.org/10.1080/00021369.1986.10867829>
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., & Boerjan, W. (2010). Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiology*, 153(3), 895–905. <http://doi.org/10.1104/pp.110.155119>
- Várnai, A., Siika-Aho, M., & Viikari, L. (2013). Carbohydrate-binding modules (CBMs) revisited: reduced amount of water counterbalances the need for CBMs. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 30. <http://doi.org/10.1186/1754-6834-6-30>
- Wolosowska, S., & Synowiecki, J. (2004). Thermostable  $\beta$ -glucosidase with a broad substrate specificity suitable for processing of lactose-containing products. *Food Chemistry*, 85(2), 181–187. [http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00104-3](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00104-3)
- Yoshida, E., Hidaka, M., Fushinobu, S., Koyanagi, T., Minami, H., Tamaki, H., ... Kumagai, H. (2010). Role of a PA14 domain in determining substrate specificity

of a glycoside hydrolase family 3  $\beta$ -glucosidase from *Kluyveromyces marxianus*.  
The Biochemical Journal, 431(1), 39–49. <http://doi.org/10.1042/BJ20100351>

Zmudka, M. W., Thoden, J. B., & Holden, H. M. (2013). The structure of DesR from *Streptomyces venezuelae*, a  $\beta$ -glucosidase involved in macrolide activation. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 22(7), 883–92. <http://doi.org/10.1002/pro.2204>