

**LORENA GUSMÃO ALVARENGA DE ANDRADE**

**$\beta$ -GLICOSIDASES DO FUNGO FITOPATÓGENO CHRYSOPORTHE  
CUBENSIS: PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO NA  
SACARIFICAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica Agrícola, para obtenção  
do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2014

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da  
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

A553b  
2014  
Andrade, Lorena Gusmão Alvarenga de, 1988-  
β-Glicosidases do fungo fitopatógeno *Chrysosporthe cubensis* :  
purificação, caracterização e aplicação na sacarificação do bagaço de  
cana-de-açúcar / Lorena Gusmão Alvarenga de Andrade. - Viçosa,  
MG, 2014.  
xii, 56f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Valéria Monteze Guimarães.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.50-56.

1. Fungo. 2. *Chrysosporthe cubensis*. 3. β-Glicosidases. 4.  
Bagaço de cana. 5. Purificação. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-  
graduação em Bioquímica Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 579.5

LORENA GUSMÃO ALVARENGA DE ANDRADE

**$\beta$ -GLICOSIDASES DO FUNGO FITOPATÓGENO *CHRYSOPORTHE CUBENSIS*: PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO NA SACARIFICAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica Agrícola para obtenção  
do título de Magister *Scientiae*.

Aprovado: 14 de Agosto de 2014.



Luciano Gomes Fietto



Wendel Batista da Silveira



Sebastião Tavares de Rezende



Valéria Monteze Guimarães  
(Orientadora)

## **AGRADECIMENTOS**

Sou muito grata a DEUS pelo dom da vida, cuidado e por mais esta conquista.

À minha querida mãe, Acyr Gusmão Alvarenga Lage e ao meu irmão, André Gusmão Alvarenga, pela confiança, suporte e por todo o esforço que fizeram para que eu pudesse seguir em frente com minhas escolhas.

Aos Rezende de Andrade, pela amizade, apoio e carinho ao longo dos anos.

Aos meus familiares, que mesmo distantes sei que torceram por mim.

Em especial ao meu marido Mateus Rezende de Andrade, pelo amor, companheirismo, amizade, paciência e compreensão. Por sempre acreditar em mim e permanecer comigo nos momentos de dificuldades.

À minha orientadora Valéria Monteze Guimarães, pelo apoio e confiança no meu trabalho durante os anos em que estive em seu grupo de pesquisa. Pelos conselhos e atenção dedicada a este trabalho.

Aos professores Sebastião Tavares de Rezende, Luciano Gomes Fietto e Wendel Batista da Silveira pela disponibilidade na avaliação e nas correções deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Análises Bioquímicas e Tecnologia Bioquímica Kamila Sousa Gomes, Rafaela Zandonade Ventorim, Tiago Ferreira Leal, Amanda Paniago, Rafaela Inês de Souza Ladeira, Larissa Mattos Trevizano, Daniel Luciano Falkoski, Maíra Nicolau de Almeida, pelas trocas de conhecimentos, experiências, convivência diária e por tornarem o trabalho mais descontraído.

À amiga Gabriela Píccolo Maitan-Alfenas, de maneira especial, pela amizade e por ter contribuído muito para o desenvolvimento deste trabalho. Pela disposição diária e atenção, mesmo nos momentos mais atarefados.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, especialmente ao secretário da Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, Eduardo Pereira Monteiro por ter sido sempre solícito e atencioso em todas as ocasiões e, a todos que de alguma forma contribuíram para que essa etapa fosse alcançada.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela oportunidade de realizar esse curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

## **BIOGRAFIA**

LORENA GUSMÃO ALVARENGA DE ANDRADE, filha Waldemar de Alvarenga Lage Neto e Acyr Gusmão Alvarenga Lage, nasceu na cidade de Governador Valadares, Minas Gerais, em 29 de março de 1988.

Em dezembro de 2005, concluiu o Ensino Médio no Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET - MG), Divinópolis, Minas Gerais.

Em setembro de 2012, graduou-se em Bioquímica pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Iniciou o Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, em 2012, em nível de Mestrado, na mesma Universidade, submetendo-se a defesa de dissertação em 14 de Agosto de 2014.

## SUMÁRIO

<b>ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....</b>	<b>vii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>4</b>
2.1.    Objetivos Gerais.....	4
2.2.    Objetivos Específicos.....	4
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>5</b>
3.1. $\beta$ -glicosidasas .....	5
3.2.    Mecanismo de ação de $\beta$ -glicosidasas.....	6
3.3.    Aplicações de $\beta$ -glicosidasas.....	8
3.4.    Sacarificação enzimática da biomassa lignocelulósica .....	9
3.5.    Considerações sobre o fungo <i>Chrysosporthe cubensis</i> LPF-1 .....	11
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
4.1.    Materiais e reagentes.....	13
4.2.    Micro-organismo e manutenção da cultura.....	13
4.3.    Preparo do inóculo .....	13
4.4.    Cultivo e crescimento de <i>C. cubensis</i> LPF-1 .....	14
4.5.    Obtenção do extrato enzimático.....	14
4.6.    Purificação enzimática .....	14
4.6.1.    Cromatografia de Troca Iônica .....	14
4.6.2.    Cromatografia de filtração em gel .....	15
4.7.    Determinação da atividade da $\beta$ -glicosidase .....	15
4.7.1.    Substratos sintéticos.....	15
4.7.2.    Açúcares redutores.....	16
4.7.3.    Com sacarose e Avicel <sup>®</sup> .....	16
4.8.    Dosagem de proteínas nos extratos enzimáticos .....	17
4.9.    Determinação do grau de pureza da enzima purificada .....	17
4.9.1.    Eletroforese .....	17
4.9.2.    Zimograma.....	18
4.10.   Determinação da massa molecular.....	19
4.11.   Caracterização enzimática.....	19
4.11.1.   Efeito do pH.....	19
4.11.2.   Efeito da temperatura.....	19
4.11.3.   Efeito do pH na estabilidade e atividade da enzima .....	19
4.11.5.   Cálculo da meia-vida da $\beta$ -glicosidase .....	20
4.11.6.   Efeitos de íons, açúcares e agentes redutores na atividade da $\beta$ -glicosidase .....	20

4.11.7.	Determinação da especificidade da $\beta$ -glicosidase para diversos substratos.....	20
4.11.8.	Determinação dos parâmetros cinéticos $K_M$ e $V_{max}$ .....	21
4.11.9.	Determinação de $K_i$ para a glicose.....	21
4.12.	Sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.....	21
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>23</b>
5.1.	Purificação das $\beta$ -glicosidases do fungo <i>Chrysosporthe cubensis</i> LPF-1 .....	23
5.2.	Zimograma .....	26
5.3.	Determinação da massa molecular.....	28
5.4.	Caracterização enzimática.....	30
5.4.1.	Efeito do pH.....	31
5.4.2.	Efeito da temperatura.....	33
5.4.3.	Análise de Termoestabilidade.....	33
5.4.4.	Determinação da meia-vida das $\beta$ -glicosidases .....	35
5.4.5.	Efeito de íons, açúcares e agentes desnaturantes na atividade das $\beta$ -glicosidases de <i>Chrysosporthe cubensis</i> LPF-1 .....	37
5.4.6.	Especificidade de substrato das $\beta$ -glicosidases de <i>Chrysosporthe cubensis</i> LPF-1 .....	39
5.4.7.	Constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) e velocidade máxima ( $V_{max}$ ).....	41
5.4.8.	Determinação da constante de inibição ( $K_i$ ) .....	43
5.5.	Sacarificação enzimática com bagaço de cana-de-açúcar.....	45
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>49</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>50</b>

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abs	Absorbância
BSA	Albumina sérica bovina
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
CaCO <sub>3</sub>	Carbonato de cálcio
CuSO <sub>4</sub>	Sulfato de cobre
DNS	Dinitrossalicilato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FeCl <sub>3</sub>	Cloreto férrico
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	Ácido bórico
HgCl <sub>2</sub>	Cloreto de mercúrio
HMF	Hidroximetilfurfural
HPLC	High Protein Liquid Chromatography
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monopotássico
K <sub>i</sub>	Constante de inibição
K <sub>M</sub>	Constante de Michaelis-Menten
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnésio
MM	Massa molecular
MnCl <sub>2</sub>	Cloreto de manganês
MnSO <sub>4</sub>	Sulfato de manganês
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µmol	Micromol
m-NP-αGal	m-nitrofenil-α-D-galactopiranosídeo
MUG	4-metilumbeliferil-β-D-glicopiranosídeo
NaCl	Cloreto de sódio
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de sódio
NaF	Fluoreto de sódio
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	Molibidato de sódio

Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de sódio
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Nitrato de amônio
nm	Nanômetro
o-NP-αGal	o-nitrofenil-α-D-galactopiranosídeo
o-NP-βGlc	o-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo
ρ-NP	ρ-nitrofenol
ρ-NP-αAra	ρ-nitrofenil-α-D-arabinopiranosídeo
ρ-NP-αGal	ρ-nitrofenil-α-D-galactopiranosídeo
ρ-NP-αGlc	ρ-nitrofenil-α-D-glicopiranosídeo
ρ-NP-αMan	ρ-nitrofenil-α-D-manopiranosídeo
ρ-NP-βGal	ρ-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo
ρ-NP-βGlc	ρ-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo
ρ-NP-βMan	ρ-nitrofenil-β-D-manopiranosídeo
ρ-NP-βXil	ρ-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PDA	Potato dextrose agar
pH	Potencial hidrogeniônico
p/p	Peso/peso
p/v	Peso/volume
ρ-NP-βXil	ρ-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo
rpm	Rotação por minuto
S	Substrato
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SSF	Fermentação no estado sólido
TCA	Ácido tricloroacético
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TEMED	Tetrametiletlenodiamina
U	Unidade de atividade enzimática
V	Volts
v/v	Volume/volume
V <sub>0</sub>	Velocidade inicial
V <sub>máx</sub>	Velocidade Máxima
ZnSO <sub>4</sub>	Sulfato de zinco

## RESUMO

ANDRADE, Lorena Gusmão Alvarenga de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Agosto de 2014.  **$\beta$ -Glicosidases do fungo fitopatogénico *Chrysosporthe cubensis*: purificação, caracterização e aplicação na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar.** Orientadora: Valéria Monteze Guimarães.

Neste trabalho, um complexo de  $\beta$ -glicosidases do fungo fitopatogénico *Chrysosporthe cubensis* LPF-1 foi purificado, caracterizado bioquímica e cineticamente e avaliado quanto ao seu potencial em aplicação no processo de sacarificação de bagaço de cana de açúcar. O fungo *C. cubensis* foi cultivado sob fermentação no estado sólido (SSF) contendo farelo de trigo como fonte de carbono e, após 5 dias de fermentação o extrato enzimático foi obtido. O conjunto de três  $\beta$ -glicosidases, foi purificado por cromatografias de troca iónica e filtração em gel e, ao final do processo, apresentou um fator de purificação de 2,05 vezes com um rendimento de 64,5 %. As massas moleculares das  $\beta$ -glicosidases foram de 85,43 e 74,17 kDa, para  $E_2$  e  $E_3$ , respectivamente, e de 63,09, 60,25 e 56,23 kDa para  $E_{1a}$ ,  $E_{1b}$  e  $E_{1c}$ , respectivamente, quando estimadas por SDS-PAGE. O complexo de  $\beta$ -glicosidases ( $E_c$ ) exibiu atividade máxima em pH 4,0 e na temperatura de 60°C.  $E_c$  foi estável na faixa de pH de 2,0-8,0 e apresentou alta termoestabilidade nas temperaturas de 50, 60 e 70 °C. Os valores de meia-vida para  $E_c$  foram de 52 horas e 39 minutos, 35 horas e 30 minutos e, 15,3 minutos, a 50, 60 e 70 °C, respectivamente. A atividade de  $\beta$ -glicosidase de  $E_c$  foi completamente inibida por  $HgCl_2$  e  $MnSO_4$ , na concentração de 10 mM e, o complexo de  $\beta$ -glicosidases apresentou especificidade absoluta para resíduos de glicose com ligações do tipo  $\beta$ . Os valores de  $K_M$  para  $E_c$  de 0,132 mM e 0,7816 mM e  $V_{m\acute{a}x}$  de 0,416  $\mu M \cdot min^{-1}$  e  $V_{m\acute{a}x}$  0,3414  $\mu M \cdot min^{-1}$ , foram obtidos utilizando os substratos  $\rho NP\beta Glc$  e celobiose, respectivamente.  $E_c$  apresentou inibição do tipo competitiva para a glicose com valor de  $K_i$  8,43 mM. As  $\beta$ -glicosidases foram utilizadas em experimentos de sacarificação do bagaço de cana, submetido previamente ao pré-tratamento alcalino.  $E_c$  foi utilizado para suplementação tanto do extrato proveniente do *C. cubensis* como também para um coquetel comercial de celulasas. Os resultados da sacarificação com as preparações suplementadas com as  $\beta$ -glicosidases foram comparados com aqueles obtidos utilizando somente o coquetel comercial e o extrato do *C. cubensis* e, a produção de glicose e xilose foi avaliada durante 72 horas de hidrólise.

A sacarificação realizada com o coquetel comercial suplementado com as  $\beta$ -glicosidases promoveu a liberação de 2,82 g/L de glicose e 0,98 g/L de xilose ao passo que, somente com o coquetel comercial foram liberados 1,78 g/L de glicose e 0,85 g/L de xilose. Por outro lado, a sacarificação com o extrato do *C. cubensis* liberou 1,69 g/L de glicose e 1,64 g/L de xilose enquanto, que o mesmo extrato suplementado com as  $\beta$ -glicosidases, promoveu a liberação de 2,62 g/L de glicose e 2,65 g/L de xilose. Dessa forma, estes resultados demonstram que as  $\beta$ -glicosidases do *C. cubensis* apresentam potencial para serem utilizadas como fonte de suplementação em outras preparações enzimáticas, visto que a eficiência de hidrólise observada foi superior à observada com o coquetel comercial de celulases bem como com o extrato de *C. cubensis*.

## ABSTRACT

ANDRADE, Lorena Gusmão Alvarenga de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2014.  **$\beta$ -Glucosidase of the phytopathogen fungus *Chrysosporthe cubensis* LPF-1: purification, characterization and application of sugarcane bagasse saccharification.** Adviser: Valéria Monteze Guimarães.

In this work, a  $\beta$ -glucosidases complex from the phytopathogen fungus *Chrysosporthe cubensis* LPF-1 was purified, biochemistry and kinetically characterized and evaluated for its potential application in the process of saccharification of sugarcane bagasse. *C. cubensis* was grown in solid state fermentation (SSF) containing wheat bran as carbon source and after five days of fermentation the enzymatic extract was obtained. A *Ec* complex containing three  $\beta$ -glucosidases was purified by ion exchange and gel filtration chromatographies and the end of the process the *Ec* showed a purification factor of 2.05 times with a yield of 64.5%. The molecular weight of the  $\beta$ -glucosidases was as 85,43 and 74,17 kDa for  $E_2$  and  $E_3$ , respectively, and for  $E_{1a}$ ,  $E_{1b}$ ,  $E_{1c}$  was 63,09, 60,25 e 56,23 kDa, respectively, when estimated by SDS-PAGE. The complex of  $\beta$ -glucosidases (*Ec*) exhibited maximum activity at pH 4.0 and 60 ° C. *Ec* was stable in the pH range of 2.0-8.0 and showed high thermal stability at temperatures of 50, 60 and 70 ° C. The *Ec* half-life values were 52 hours and 39 minutes, 35 hours and 30 minutes and 15.3 minutes at 50, 60 and 70 ° C, respectively. The *Ec* of  $\beta$ -glucosidase activity was completely inhibited by  $HgCl_2$  and  $MnSO_4$  at a concentration of 10 mM and the complex of  $\beta$ -glucosidases was specific for glucose residues in  $\beta$  position. The  $K_M$  values for *Ec* of 0.132 and 0.7816 mM and  $V_{max}$  of 0.416 and 0.3414  $\mu M \cdot min^{-1}$  were obtained using the  $pNP\beta Glc$  and cellobiose substrates, respectively. The *Ec* showed competitive inhibition of glucose to type with  $K_i$  value of 8.43 mM. The  $\beta$ -glucosidases were employed in saccharification of sugarcane bagasse, previously submitted to the alkaline pretreatment. *Ec* was used as a source of supplementation for both extract from *C. cubensis* as well as in a commercial cellulase cocktail. The saccharification results with the supplemented preparations with  $\beta$ -glucosidases were compared with those obtained employing a commercial cocktail and only the extract of *C. cubensis* and the production of glucose and xylose were evaluated for 72 hours of hydrolysis. Saccharification performed with commercial cocktail supplemented with the  $\beta$ -glucosidases promoted the release of 2.82 g / L of glucose and 0.98 g / L xylose whereas only with the commercial cocktail were

released 1.78 g / L of glucose and 0.85 g / L of xylose. On the other hand, the saccharification with the *C. cubensis* extract produced 1.69 g / L of glucose and 1.64 g / L xylose while the same fraction supplemented with  $\beta$ -glucosidases promoted the release of 2.62 g / L of glucose and 2.65 g / L of xylose. Thus, the results obtained suggests that the  $\beta$ -glucosidases of *C. cubensis* evaluated in this work have potential to be used as a source of supplemental other enzyme preparations, since the hydrolysis efficiency was higher than that observed in commercial cocktail of cellulase as well as extract of *C. cubensis*.

## 1. INTRODUÇÃO

As  $\beta$ -glicosidases são enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas do tipo  $\beta$  e possuem várias funções. Em especial, são componentes de um sistema de celulasas no qual três grupos de enzimas, endoglicanases (endo-1,4- $\beta$ -D-glicanases, EC 3.2.1.4), exo-glicanases (1,4- $\beta$ -D-glican-celobiohidrolases, EC 3.2.1.91) e  $\beta$ -glicosidases ( $\beta$ -D-glicohidrolases, celobiase, EC 3.2.1.21), agem de maneira sinérgica para catalisar a conversão de celulose em glicose e outros intermediários (Almeida et al., 2011; Brijwani et al., 2010; I-Son Ng et al., 2010).

Estas enzimas são alvo de grande interesse para a bioquímica, medicina e biotecnologia. As funções fisiológicas postuladas para as  $\beta$ -glicosidases são diversas como catabolismo do glicosídeo ceramida em tecidos humanos, metabolismo de cianoglicosídeos, síntese de diversos oligossacarídeos e glicoconjugados, hidrólise dos isoflavonóides glicosídeos em soja produzindo isoflavonas agliconas (Xue et al., 2009), defesa de plantas contra patógenos (Khan e Akhtar, 2010), produção de etanol a partir da bioconversão da celulose, gerando combustíveis renováveis (Bhatia et al., 2002; Howard et al., 2003; Pal et al., 2010; Almeida et al., 2011; Wongwisansri et al., 2013), aprimoramento do flavor de alguns alimentos e bebidas (Ducret et al., 2002), entre outras.

As  $\beta$ -glicosidases podem ser obtidas de micro-organismos, plantas (Maitan-Alfenas et al., 2014; Geerlings et al., 2000; Bhatia et al., 2002), insetos (Terra e Ferreira, 1994) e humanos (Hays et al., 1996). A demanda para tais enzimas é elevada porque as mesmas são específicas e não produzem resíduos tóxicos (Tortora et al., 2005). Dentre os produtores de  $\beta$ -glicosidases os micro-organismos apresentam grande vantagem, uma vez que são bons produtores de enzimas. As  $\beta$ -glicosidases têm sido obtidas a partir de fungos (Falkoski et al., 2013; Ramani et al., 2012), bactérias (Pei et al., 2012) e leveduras (Maitan-Alfenas et al., 2014; González-Pombo et al., 2008).

A utilização de enzimas em processos industriais tem aumentado ao longo dos anos, entretanto, o alto custo de produção dessas enzimas representa uma grande barreira para aplicações em processos industriais como, por exemplo, para a comercialização do bioetanol (Almeida et al., 2011; I-Son Ng et al., 2010; Singhania et al., 2010, 2013; Soccol et al., 2010).

Nesse sentido, os fungos filamentosos têm sido mais estudados para aplicação industrial. Fungos pertencentes aos gêneros *Trichoderma*, *Penicilium*, *Fusarium*, dentre outros são conhecidos como produtores de uma gama de celulases e hemicelulases, entretanto, os coquetéis enzimáticos, em geral, apresentam baixas quantidades de  $\beta$ -glicosidases, as quais são fundamentais para a hidrólise completa da celulose (Maitan-Alfenas et al., 2014; Singhanian et al., 2010).

Desse modo, várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o intuito de se obter grandes quantidades de celulases para aplicação biotecnológica e com custos mais baixos. Em especial, as  $\beta$ -glicosidases têm sido de grande interesse, principalmente na sua aplicação para a hidrólise de celulose (Almeida et al., 2011; Bhatia et al., 2002; I-Son Ng et al., 2010).

Falkoski e colaboradores (2011; 2013) realizaram um estudo com o fungo fitopatogênico *Chrysosporthe cubensis* LPF-1 e mostraram que ele foi capaz de secretar de forma expressiva um conjunto de celulases e hemicelulases. E ainda, o coquetel enzimático do *C. cubensis* foi mais eficiente no processo de hidrólise do que um coquetel comercial, quando utilizado o bagaço de cana como biomassa (Falkoski et al., 2012).

Além disso, Visser e colaboradores (2013) produziram um coquetel enzimático com a mistura dos extratos provenientes dos fungos *C. cubensis* e *P. pinophilum* e avaliaram a eficiência de hidrólise dessa preparação através da sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar. De acordo com os autores, a liberação de glicose e xilose foi aumentada devido à mistura dos extratos fúngicos e a conversão máxima foi obtida nas condições de 8% de biomassa e 20 FPU/g de carga enzimática.

Dessa forma, estudos feitos por Falkoski et al. (2011, 2013) e Visser et al. (2013), demonstraram que o fungo *Chrysosporthe cubensis* LPF-1 possui potencial para a produção de enzimas, principalmente celulases, as quais podem ser utilizadas nos processos biotecnológicos como a sacarificação da biomassa lignocelulósica.

Assim, há grande interesse no estudo das enzimas secretadas por esse fungo, especialmente enzimas com baixa atividade na maioria dos coquetéis comerciais, o que poderia colaborar para o entendimento da eficiência superior desse coquetel. Esse estudo teve por objetivo a purificação e caracterização de  $\beta$ -glicosidases de

*Chrysoporthe cubensis* LPF-1 e sua aplicação na suplementação de misturas enzimáticas visando à sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivos Gerais

Purificar e caracterizar bioquímica e cineticamente  $\beta$ -glicosidases secretadas pelo fungo *Chrysosporthe cubensis* (LPF-1), bem como avaliar o potencial de aplicação da enzima na suplementação de misturas enzimáticas para hidrólise de bagaço de cana de açúcar.

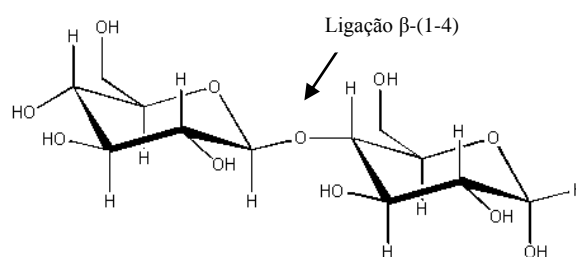
### 2.2. Objetivos Específicos

- Identificar as enzimas hidrolíticas produzidas;
- Purificar as  $\beta$ -glicosidases;
- Determinar a massa molecular das enzimas obtidas;
- Caracterizar bioquímica e cineticamente as enzimas purificadas: efeitos de pH, temperatura, estabilidade em pH, termoestabilidade, meia-vida, efeito de açúcares, íons e agentes redutores, especificidade das  $\beta$ -glicosidases para substratos sintéticos e naturais, valores de  $K_M$  e  $V_{max}$  com substratos diferentes e,  $K_i$  para a glicose;
- Avaliar o potencial de hidrólise das  $\beta$ -glicosidases na suplementação de misturas enzimáticas para a sacarificação do bagaço de cana de açúcar.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. $\beta$ -glicosidases

As  $\beta$ -glicosidases ou  $\beta$ -D-glicosídeo glicohidrolases (EC 3.2.1.21) são enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas do tipo  $\beta$  (Figura 1), possuem funções variadas e se encontram amplamente difundidas na natureza. O interesse inicial no estudo das  $\beta$ -glicosidases surgiu na década de 1950, devido ao seu envolvimento na conversão biológica da celulose (Singhania et al., 2013).



**Figura 1:** Ação hidrolítica de uma  $\beta$ -glicosidase sobre a celobiose (Cairns e Esen, 2010).

As  $\beta$ -glicosidases constituem um grupo majoritário entre as glicosil hidrolases. São enzimas bem caracterizadas, biológica e industrialmente importantes, e atualmente têm sido objeto de vários estudos, devido à possibilidade de sua utilização em um grande número de processos biotecnológicos (Almeida et al., 2011; I-Son Ng et al., 2010; Maitan-Alfenas et al., 2014; Singhania et al., 2013).

Em geral, dois sistemas de classificação são descritos na literatura, sendo baseados na especificidade de substrato e na identidade da sequência de aminoácidos (Singhania et al., 2013). Na classificação baseada na especificidade de substrato, as  $\beta$ -glicosidases são divididas em três grupos: aril  $\beta$ -glicosidases, que agem em aril-glicosídeos; celobiasas verdadeiras, que são capazes de hidrolisar celobiose; e  $\beta$ -glicosidases com ampla especificidade de substrato. Dados da literatura demonstram que a grande maioria das  $\beta$ -glicosidases já caracterizadas pertence a esta última categoria (Singhania et al., 2013).

Entre as classificações que foram propostas para a identificação das  $\beta$ -glicosidases baseada na identidade de sequência de aminoácidos, a mais aceita é aquela baseada tanto na similaridade das sequências de aminoácidos quanto nos padrões de

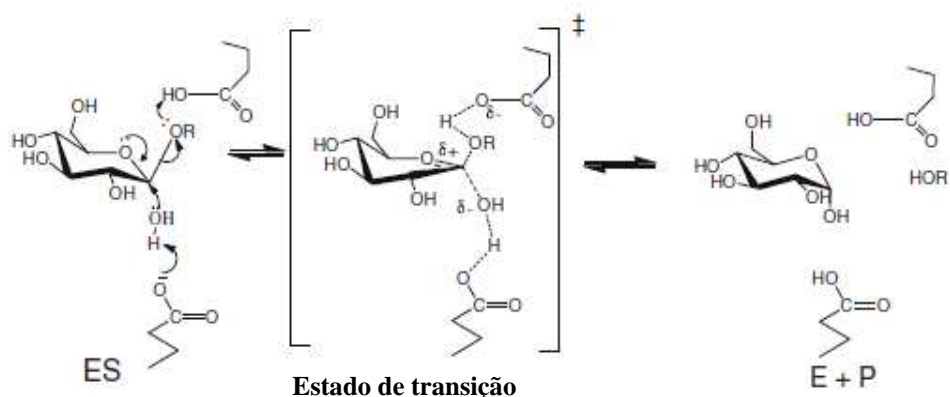
enovelamento destas enzimas (Bhatia et al., 2002; Singhanian et al., 2013). Nesta classificação, as glicosil hidrolases são classificadas em 88 famílias e as  $\beta$ -glicosidases, que representam um grupo importante entre as glicosil hidrolases, estão reunidas nas famílias 1 e 3. A família 1 inclui  $\beta$ -glicosidases originárias de arqueas, plantas e mamíferos; a estrutura tridimensional de várias destas enzimas já foi resolvida, revelando um padrão comum de disposição de  $\alpha$ -hélices e folhas  $\beta$ , além da presença de vários resíduos altamente conservados, localizados nas proximidades do sítio ativo. Na família 3 estão classificadas 44  $\beta$ -glicosidases, originárias de bactérias, fungos e leveduras, sendo o estudo desta família mais restrito (Bhatia et al., 2002; Dyk et al., 2012).

### **3.2. Mecanismo de ação de $\beta$ -glicosidases**

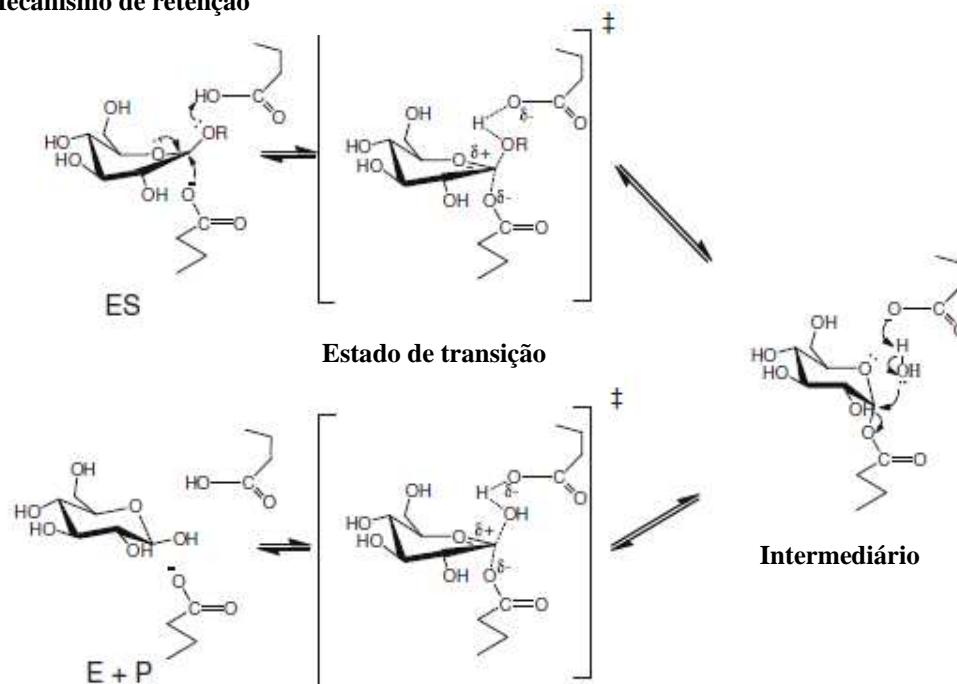
A hidrólise enzimática de ligações glicosídicas geralmente inclui a catálise ácida envolvendo pelo menos dois resíduos principais: um resíduo deve ser doador de próton e o outro deve ser um resíduo nucleófilo. A hidrólise pode ocorrer via dois mecanismos principais, nos quais haverá inversão ou retenção da configuração do carbono anomérico (Figura 2). O mecanismo pelo qual a reação ocorre depende da distância entre os resíduos de aminoácidos envolvidos na catálise. Nas enzimas que catalisam a reação por meio do mecanismo de retenção, estes resíduos apresentam uma distância média de 5,5 Å, enquanto que naquelas que atuam por meio do mecanismo de inversão, a distância média é de 10 Å (Cairns e Esen, 2010).

No mecanismo de inversão, uma molécula de água ativada é responsável pelo ataque nucleofílico direto do carbono anomérico, para deslocar a porção aglicona em um único passo (Figura 2A). A base catalítica extrai um próton da molécula de água enquanto o ácido catalítico protona o grupo aglicona liberado. Em contrapartida, a maioria das  $\beta$ -glicosidases caracterizadas são enzimas retentoras e realizam a catálise em dois passos, glicosilação e deglicosilação (Figura 2B).

(A) Mecanismo de inversão



(B) Mecanismo de retenção



**Figura 2:** Mecanismos de hidrólise enzimática de ligações glicosídicas catalisado pelas  $\beta$ -glicosidases. (A) Mecanismo de inversão; (B) mecanismo de retenção (Cairns e Esen, 2010).

Durante a glicosilação, a porção aglicona se afasta concomitante à doação de próton do sítio catalítico ácido/base e ao ataque nucleofílico da base catalítica ao carbono anomérico, gerando um intermediário enzima-açúcar, ligado covalentemente. No passo de deglicosilação o processo é revertido e a molécula de água ataca para

deslocar o nucleófilo catalítico da glicose. Os dois passos, de glicosilação e de deglicosilação, apresentam um estado de transição (Cairns e Esen, 2010).

### **3.3. Aplicações de $\beta$ -glicosidases**

Juntamente com outras enzimas, as  $\beta$ -glicosidases têm sido aplicadas, por exemplo, na indústria de alimentos como no processamento de frutas para melhorar a qualidade do sabor, coloração, aroma, clarificação e viscosidade de sucos (Daenen et al., 2008).

A indústria vinícola também tem feito uso de  $\beta$ -glicosidases para melhorar a qualidade de vinhos (Tate e Reynolds, 2006). A atividade de  $\beta$ -glicosidases produzidas por algumas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (Hérendez et al., 2003), *Aspergillus* (Decker et al., 2000), *Oenococcus oeni* (Barbagallo et al., 2004), entre outros, levam à hidrólise de compostos não voláteis a terpenos voláteis, contribuindo para aumentar a produção de aroma durante a fabricação de vinhos.

Além disso, as  $\beta$ -glicosidases têm sido utilizadas na hidrólise das formas  $\beta$ -glicosídicas das isoflavonas presentes em produtos de soja às formas agliconas e à glicose (Bhatia et al., 2002; Maitan-Alfenas et al., 2014; Xue et al., 2009). O interesse em soja e produtos a base da mesma tem crescido significativamente nas últimas décadas devido aos seus benefícios nutricionais e promotores da saúde (Marazza et al., 2009).

Outro motivo pelo grande interesse por  $\beta$ -glicosidases é a sua aplicação para a hidrólise de celulose (Bhatia et al., 2002; Falkoski et al., 2011, 2013). A celulose é o polímero mais abundante na natureza e a maior fonte de energia renovável na terra e a sua conversão em açúcares solúveis é de grande interesse biotecnológico. As  $\beta$ -glicosidases são componentes de um sistema de celulasas no qual três categorias de enzimas, endoglucanases (EC 3.2.1.4), celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) e  $\beta$ -glicosidases (EC 3.2.1.21), agem sinergisticamente para catalisar a conversão de celulose em glicose e outros intermediários (Falkoski et al., 2011, 2013; Pal et al., 2010). As  $\beta$ -glicosidases podem ser aplicadas na indústria de combustíveis para a produção de etanol a partir da celulose, permitindo a produção de combustíveis a partir de fontes renováveis (Almeida et al., 2011; Falkoski et al., 2011, 2013, Visser et al.; 2013).

Além disso, as  $\beta$ -glicosidases apresentam importantes funções biológicas em tecidos de plantas, relacionadas à resistência a fitopatógenos e síntese de  $\beta$ -glucanas durante o desenvolvimento da parede celular (Khan e Akhtar, 2010).

Em humanos e outros mamíferos, a  $\beta$ -glicosidase está envolvida na hidrólise de glicocerebrosídeos. A deficiência desta enzima leva à doença de Gaucher, uma doença genética e progressiva resultante do acúmulo de glicocerebrosídeos nos lisossomos (Khan e Akhtar, 2010). Além disso, a lisozima, uma enzima secretada nas lágrimas para prevenir infecções bacterianas dos olhos, também é uma  $\beta$ -glicosidase que cliva ligações  $\beta$ -(1,4) entre os açúcares ácido N-acetil glicosamina e ácido N-acetil murâmico, localizados na parede celular de bactérias gram-negativas (Khan e Akhtar, 2010). Por fim, as  $\beta$ -glicosidases também podem ser utilizadas na síntese de diversos oligossacarídeos, glicoconjugados, alquil e amino-glicosídeos (Khan e Akhtar, 2010).

### **3.4. Sacarificação enzimática da biomassa lignocelulósica**

A biomassa lignocelulósica consiste de carboidratos como celulose e hemicelulose, bem como lignina e outros componentes (Almeida et al., 2011; Dyk et al.; 2012; Falkoski et al.; 2013; Visser et al.; 2013). A hidrólise enzimática ou sacarificação se baseia na conversão enzimática dos polissacarídeos presentes na biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis, como glicose e xilose, por exemplo.

Entretanto, antes da etapa de sacarificação, a biomassa é submetida ao pré-tratamento, o qual é decisivo para a hidrólise enzimática, uma vez que tem por objetivo reduzir o teor de lignina e facilitar o acesso das enzimas à celulose e hemicelulose. Vários tipos de pré-tratamentos são descritos, dentre eles os mais utilizados tem sido os tratamentos ácido e alcalino. Os tratamentos alcalinos agem especialmente na redução da lignina, ao passo que os ácidos atuam principalmente na remoção da hemicelulose (Falkoski et al.; 2013).

Devido à heterogeneidade e complexidade da biomassa, a sua conversão requer atividades de múltiplas enzimas de forma que as celulases são centrais no processamento da biomassa para a produção de bioetanol e seus subprodutos (Brijwani et al.; 2010; Visser et al.; 2013).

A degradação da celulose requer a ação sinérgica de um grupo de celulases que atuam nas ligações  $\beta$ -1,4 da celulose e promovem a hidrólise completa com liberação de glicose. Para a hidrólise da celulose, são necessárias, pelo menos, três

classe de enzimas celulolíticas, incluindo as endoglicanases (EC 3.2.1.4), as quais hidrolisam as ligações internas da celulose liberando celo-oligossacarídeos e glicose. A segunda classe de enzimas são as exoglicanases ou exocelulases (EC 3.2.1.91), também conhecidas como celobiohidrolases. Esta classe promove a hidrólise da celulose por meio da liberação de celobiose dos terminais redutores e não redutores. As  $\beta$ -glicosidases (EC 3.2.1.21) correspondem à terceira classe de celulases e atuam na hidrólise da celobiose e celooligossacarídeos, liberando monômeros de glicose (Almeida et al., 2011; Brijwani et al., 2010; Falkoski et al.; 2013; I-Son Ng et al., 2010). A  $\beta$ -glicosidase é muito importante para a hidrólise completa da celulose, visto que a celobiose age como inibidor de atividade da exocelulases (Almeida et al., 2011).

Após o processo de sacarificação da biomassa lignocelulósica, os açúcares fermentáveis podem ser utilizados para a produção de bioetanol, também conhecido como etanol de segunda geração. O bioetanol tem sido uma das principais alternativas para a substituição de combustíveis fósseis; estudos estimam que uma mistura de 10% de bioetanol com gasolina poderia promover a redução de 3% a 6% a emissão de dióxido de carbono (Soccol et al.; 2010).

De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab 2011) o Brasil é o segundo maior produtor mundial de bioetanol, tendo a cana-de-açúcar como principal matéria-prima. Desse modo, a utilização de bioetanol a partir da biomassa lignocelulósica promoveria diminuição nas áreas de cultivo de cana-de-açúcar, uma vez que são utilizados os resíduos agrícolas e florestais (Singhania et al.; 2010).

Além disso, a produção de etanol lignocelulósico requer a ação de enzimas que atuam em conjunto na hidrólise da biomassa, principalmente sobre a hemicelulose e celulose, como já mencionadas anteriormente.

Existe uma grande variedade de micro-organismos que são conhecidos como produtores de celulases e hemicelulases, sendo que os fungos filamentosos têm sido mais estudados para aplicação industrial. Fungos pertencentes aos gêneros *Trichoderma*, *Penicilium*, *Fusarium*, dentre outros são conhecidos como produtores de uma gama de celulases e hemicelulases, entretanto, os coquetéis enzimáticos, em geral, apresentam baixas quantidades de  $\beta$ -glicosidases, as quais, como supracitado, são fundamentais para a hidrólise completa da celulose (Singhania et al.; 2010).

Dessa forma, a obtenção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica torna-se uma alternativa promissora e atrativa. Entretanto, a limitação principal desse processo é que o desenvolvimento de tecnologia enzimática requer altos custos e o rendimento é baixo (Singhania et al.; 2010). Segundo I-Son Ng e colaboradores (2010), a redução no custo da produção de celulases, o aumento na eficiência das enzimas e nos rendimentos de açúcar são vitais para reduzir os custos do processo em biorefinarias.

Portanto, faz-se necessário o estudo de fungos que são capazes de expressar e secretar altas quantidades de  $\beta$ -glicosidases, a fim de que elas possam servir como fonte suplementar para os coquetéis deficientes, além de possivelmente tornar o processo economicamente viável.

### **3.5. Considerações sobre o fungo *Chrysosporthe cubensis* LPF-1**

*Chrysosporthe cubensis* é conhecido com um dos patógenos mais importantes do eucalipto, sendo responsável por causar a doença do cancro no eucalipto (*Eucalyptus* – Myrtaceae, Myrtales), como relatada por Hodges (1979) e Gryzenhout (2010).

De acordo com Merwe e colaboradores (Merwe et al., 2010; Gryzenhout et al., 2010), este fungo pertence à família Cryphonectriaceae e é considerado nativo da América Central e do Sul e também do sudeste da Ásia. O fungo apresenta crescimento rápido, cerca de sete dias em temperatura de 30 °C contém o micélio branco com manchas escuras ao redor e mais claras nas bordas (Hodges et al., 1979).

Falkoski e colaboradores (2011, 2013) realizaram um estudo com *Chrysosporthe cubensis* LPF-1 e mostraram que esse fungo foi capaz de secretar de forma expressiva um conjunto de celulases e hemicelulases. Quando cultivado sob fermentação no estado sólido (SSF) utilizando farelo de trigo como fonte de carbono, *Chrysosporthe cubensis* foi capaz de produzir FPase (2,52 U g<sup>-1</sup>), endoglucanase (33,84 U g<sup>-1</sup>), xilanase (362,38 U g<sup>-1</sup>),  $\beta$ -glicosidase (21,55 U g<sup>-1</sup>) de forma bem expressiva comparado com a produção por outros fungos.

Além disso, o coquetel enzimático do *Chrysosporthe cubensis* foi mais eficiente no processo de hidrólise do que um coquetel comercial, quando utilizado o bagaço de cana como biomassa (Falkoski et al., 2013).

Visser et al. (2013) também demonstraram o grande potencial do fungo *C. cubensis* quanto a produção de celulases e hemicelulases bem como no processo de sacarificação enzimática. Através da mistura dos extratos enzimáticos de *C. cubensis* e

*P. pinophilum*, a hidrólise do bagaço de cana foi mais eficiente e com altas taxas de liberação de glicose e xilose.

E ainda, apesar de alguns trabalhos relatarem a capacidade de fungos fitopatógenos em produzir enzimas hidrolíticas de interesse biotecnológico, há poucas informações sobre as possibilidades destes organismos serem utilizados para a produção dessas enzimas em larga escala. Apesar dos resultados significativos sobre o fungo *Chrysosporthe cubensis* LPF-1 (Falkoski et al.; 2013; Visser et al.; 2013), novas pesquisas devem ser conduzidas para avaliar o potencial deste fungo para secretar outras enzimas.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios de Análises Bioquímicas, Tecnologia Bioquímica e Enzimologia Aplicada, da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

### 4.1. Materiais e reagentes

Os reagentes,  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo ( $\rho$ NP $\beta$ Glc),  $\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo ( $\rho$ NP $\alpha$ Glc),  $o$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo ( $o$ NP $\beta$ Glc),  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo ( $\rho$ NP $\beta$ Gal),  $\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo ( $\rho$ NP $\alpha$ Gal),  $o$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo ( $o$ NP $\alpha$ Gal),  $m$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo ( $m$ NP $\alpha$ Gal),  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-manopiranosídeo ( $\rho$ NP $\beta$ Man),  $\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo ( $\rho$ NP $\alpha$ Man),  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo ( $\rho$ NP $\beta$ Xil),  $\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-arabinopiranosídeo ( $\rho$ NP $\alpha$ Ara), celobiose, lactose, maltose, melibiose e gentiobiose foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA).

As resinas Q-Sepharose e Sephacryl S-200 foram obtidas da GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Os reagentes como acetato de sódio, carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), ágar (PDA), extrato de levedura e os demais reagentes utilizados para a execução deste trabalho apresentavam grau de pureza analítica.

### 4.2. Micro-organismo e manutenção da cultura

O fungo *Chrysosporthe cubensis* LPF-1 pertence à coleção de cultura de fungos do Laboratório de Patologia Florestal – Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) – UFV. O fungo foi mantido em placas de PDA, incubadas em câmara de crescimento a 28 ° C por 5 dias. As placas foram mantidas a 4 ° C e subcultivadas periodicamente.

### 4.3. Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado por meio do cultivo do fungo sob fermentação submersa em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio com a seguinte composição, em g/L: glucose, 10,0;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 1,0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,0,  $\text{MgSO}_4$  0,5 e extrato de levedura, 2,0. Cada frasco foi inoculado com 10 discos de ágar cortados de uma placa de *C. Cubensis* LPF-1, cultivada por 5 dias, em placas de BDA (batata, dextrose e ágar) e foram incubados em um Shaker Series 25 D New Brunswick a 180 rpm, por 5 dias a

28 ° C. A cultura obtida foi homogeneizada, de forma asséptica, com Polytron® e imediatamente inoculada em frascos contendo os meios de cultura sólidos.

#### **4.4. Cultivo e crescimento de *C. cubensis* LPF-1**

*Chrysosporthe cubensis* LPF-1 foi cultivado sob fermentação em estado sólido (SSF) utilizando farelo de trigo como fonte de carbono, como descrito por Falkoski e colaboradores (2012) com algumas alterações. A fermentação foi realizada em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 5 g (peso seco) de farelo de trigo misturado com 12 mL do meio de cultura (umidade final de 70%) com a seguinte composição, em g/L:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 1,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,5;  $\text{MgSO}_4$ , 0,5;  $\text{CuSO}_4$ , 0,25 e extrato de levedura, 2. Além disso,  $\text{MnCl}_2$  (0,1 mg L<sup>-1</sup>),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (0,075 mg L<sup>-1</sup>),  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  (0,02 mg L<sup>-1</sup>),  $\text{FeCl}_3$  (1,0 mg L<sup>-1</sup>) e  $\text{ZnSO}_4$  (3,5 mg L<sup>-1</sup>) foram adicionados ao meio como elementos traços.

Os frascos foram esterelizados a 121 °C por 20 minutos e, em seguida, foram adicionados 3 mL do inóculo obtido, como descrito anteriormente. Os frascos foram mantidos em uma câmara de crescimento com temperatura a 30 ° C durante 5 dias de fermentação.

#### **4.5. Obtenção do extrato enzimático**

O extrato enzimático foi produzido a partir da cultura em SSF, extraído com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5, a uma proporção de 10:1 (tampão / substrato seco), sob agitação de 180 rpm por 60 min à temperatura ambiente. A porção sólida foi separada por filtração através de filtro de nylon, seguida por centrifugação a 15000 xg durante 10 min, e o sobrenadante, denominado extrato bruto, foi congelado e armazenado para subseqüentes análises.

#### **4.6. Purificação enzimática**

A  $\beta$ -glicosidase foi purificada por cromatografias com colunas de troca-iônica de Q-Sepharose e exclusão molecular de Sephacryl S-200. As etapas estão descritas nas seções 4.6.1. e 4.6.2.

##### **4.6.1. Cromatografia de Troca Iônica**

O extrato bruto (obtido conforme item 4.5) foi submetido à cromatografia de troca iônica em FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) em uma coluna (1,6 x 2,5 cm) de Q-Sepharose previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão, seguido por um gradiente salino crescente formado por tampão acetato de sódio, 50 mM, pH 5,0, e o mesmo tampão

contendo NaCl 1M. O processo foi realizado com fluxo de 240 mL/h. Frações de 2,5 mL foram coletadas e aquelas que apresentaram atividade de  $\beta$ -glicosidase foram reunidas.

#### **4.6.2. Cromatografia de filtração em gel**

A amostra proveniente da cromatografia de troca iônica foi submetida à cromatografia de filtração em gel em FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) em uma coluna (1,6 x 60 cm) de Sephacryl S-200 previamente equilibrada com tampão acetato de sódio, 25 mM, pH 5,0. As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão com fluxo contínuo de 60 mL/h e foram coletadas frações de 3,0 mL. As frações com atividade de  $\beta$ -glicosidase foram reunidas formando um pool e armazenadas sob refrigeração para posterior caracterização.

### **4.7. Determinação da atividade da $\beta$ -glicosidase**

#### **4.7.1. Substratos sintéticos**

O ensaio de atividade da  $\beta$ -glicosidase foi feito utilizando o substrato sintético  $\rho$ NP $\beta$ Glc (4-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo). A reação continha 375  $\mu$ L de tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 4,0, 125  $\mu$ L de solução  $\rho$ NP $\beta$ Glc 4mM e 100  $\mu$ L do extrato enzimático. A reação foi realizada por 15 minutos, em banho-maria a 60 °C e, interrompida pela adição de 500  $\mu$ L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,5 M). A produção de  $\rho$ NP foi quantificada espectrofotometricamente a 410 nm. Os valores de absorbância obtidos foram convertidos em  $\mu$ moles de  $\rho$ NP utilizando uma curva padrão construída com 0 – 0,2  $\mu$ moles de  $\rho$ NP.

Outros substratos sintéticos como  $\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo ( $\rho$ NP $\alpha$ Glc), o-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (oNP $\beta$ Glc),  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo ( $\rho$ NP $\beta$ Gal),  $\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo ( $\rho$ NP $\alpha$ Gal), o-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo (oNP $\alpha$ Gal), m-nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo (mNP $\alpha$ Gal),  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-manopiranosídeo ( $\rho$ NP $\beta$ Man),  $\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo ( $\rho$ NP $\alpha$ Man),  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo ( $\rho$ NP $\beta$ Xil),  $\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-arabinopiranosídeo ( $\rho$ NP $\alpha$ Ara), foram utilizados e o ensaios realizados conforme descrito anteriormente.

Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu$ mol de produto ( $\rho$ NP) por minuto, nas condições de ensaio.

#### **4.7.2. Açúcares redutores**

Para os ensaios de atividade da  $\beta$ -glicosidase com os substratos celobiose, lactose, maltose, melibiose e gentiobiose, a glicose liberada na reação enzimática foi determinada pelo método da glicose oxidase (Sternberg et al., 1977).

A reação continha 450  $\mu$ L de solução de substrato 8,0 mM em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,0 e 50  $\mu$ L de extrato enzimático. O ensaio foi realizado a 50 °C por 30 minutos e em seguida as amostras foram fervidas por 5 minutos. Os tubos foram, então, colocados em água à temperatura ambiente por 5 minutos e, foi adicionado 500  $\mu$ L do reativo de glicose oxidase e a mistura foi novamente incubada a 37 °C por 15 minutos. A concentração de glicose formada foi estimada em espectrofotômetro a 510 nm, por meio de uma curva padrão construída com 0-1,0  $\mu$ moles de glicose, utilizando-se uma solução estoque de concentração 1 mg/mL.

Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu$ mol de glicose por minuto, nas condições de ensaio.

#### **4.7.3. Com sacarose e Avicel®**

O ensaio de atividade da  $\beta$ -glicosidase utilizando a sacarose como substrato foi feito pelo método de Miller (1956), no qual utiliza o reagente dinitrossalicilato (DNS) para medir a quantidade de açúcar redutor liberada. A mistura de reação continha 450  $\mu$ L de solução do substrato sacarose 8 mM em tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 4,0 e 50  $\mu$ L de extrato enzimático. O ensaio foi realizado a 60 °C por 30 minutos. Após este período, foi adicionado 500  $\mu$ L do reagente DNS. As amostras foram fervidas por 5 minutos e, em seguida foi adicionado 1 mL de água destilada aos tubos os quais permaneceram em repouso à temperatura ambiente até esfriar. Os valores de absorvância obtidos a 540 nm foram transformados em  $\mu$ moles de glicose, por meio de uma curva padrão construída com 0-2  $\mu$ moles de glicose, a partir de uma solução estoque de concentração 1 mg/mL.

Para o ensaio de atividade da  $\beta$ -glicosidase com o polímero celulose (Avicel®), as condições foram as mesmas como descrito acima, sendo que as concentrações de celulose utilizadas foram de 0,1 e 1,0 % (p/v).

Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu$ mol de açúcar redutor por minuto, nas condições de ensaio.

#### **4.8. Dosagem de proteínas nos extratos enzimáticos**

O método de Bradford (1976) foi utilizado para determinar a concentração de proteínas nos extratos enzimáticos, a fim de calcular os valores de atividade específica e determinar o grau de pureza da  $\beta$ -glicosidase para montagem da tabela de purificação.

O reagente de Bradford continha 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250, 100 mL de ácido fosfórico 85% (v/v) e 50 mL de etanol 95% (v/v), solubilizados em 200 mL de solução. Após a solubilização, a solução permaneceu em agitação por 30 minutos e em seguida foi filtrada em papel Whatman n° 1.

O ensaio para a determinação da concentração proteica foi realizado a partir da mistura de 10-500 $\mu$ L do extrato protéico, 0-800 $\mu$ L de água destilada e 200 $\mu$ L do reagente de Bradford. Os tubos foram agitados em vórtex e mantidos por 15 minutos a temperatura ambiente. As leituras foram efetuadas em espectrofotômetro a 595 nm e os valores de absorbância foram convertidos em valores de massa protéica através de uma curva padrão obtida com BSA.

#### **4.9. Determinação do grau de pureza da enzima purificada**

##### **4.9.1. Eletroforese**

A eletroforese em gel de poliacrilamida (12,0 %), contendo SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol foi realizada conforme descrito por Laemmli (1970). Os mini-géis foram preparados a partir de solução estoque de acrilamida/N,N-metileno bisacrilamida (bis) 30 % (p/v), tampão Tris/HCl 1,5 M, pH 8,8, para o gel separador e tampão Tris/HCl 0,5 M, pH 6,8, para o gel empilhador, persulfato de amônio 10 % (p/v), dodecil sulfato de sódio (SDS) 10 % (p/v) e, N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamino de sódio (TEMED). As amostras submetidas à eletroforese foram adicionadas ao tampão de amostra desnaturante 3 vezes concentrado (0,19 M Tris/HCl, pH 6,8, 2,3 % p/v de SDS, 1 % v/v de glicerol, 5 % v/v de  $\beta$ -mercaptoetanol e azul de bromofenol), fervidas durante 4 minutos e aplicadas no gel (Laemmli, 1970). As corridas eletroforéticas foram realizadas à temperatura ambiente, a 85 V, em placas do Sistema Mini-Gel da Sigma Chemical Company. Coloração e revelação dos géis de eletroforese

As proteínas presentes no gel foram reveladas com nitrato de prata, conforme procedimento descrito por Blum et al.(1987). Após a corrida eletroforética, o gel foi colocado em 10 mL de solução fixadora, metanol, ácido acético glacial e água, na proporção de 50:12:38 em volume, por no mínimo 2 h, seguido de 3 lavagens de 10

minutos com solução de etanol 50 % (p/v). O gel foi lavado, por 1 minuto, em solução de tiosulfato de sódio 0,02 % (p/v). Em seguida, o gel foi rapidamente lavado com água destilada e incubado, por 20 minutos, em solução de nitrato de prata 0,2 % (p/v), contendo 37  $\mu$ L de formaldeído 37 % (v/v) e lavado 3 vezes, por 20 segundos, com água destilada. Posteriormente, o gel foi tratado com a solução reveladora (carbonato de sódio 4 %, contendo 2 mL de solução de tiosulfato de sódio 0,02 % e 50  $\mu$ L de formaldeído 37 %), até a visualização das bandas proteicas. A reação foi interrompida pela adição de ácido acético.

#### **4.9.2. Zimograma**

Para a detecção da atividade de  $\beta$ -glicosidase em gel foi feita a análise por zimografia. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (10 %) e foi realizada conforme descrito no item 4.9.1., exceto que não foi adicionado SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol, por se tratar de um gel não desnaturante. As corridas eletroforéticas foram realizadas à temperatura ambiente, a 80 V, em placas do Sistema Mini-Gel da Sigma Chemical Company.

Após a corrida de eletroforese, o gel foi dividido em duas partes. Uma parte do gel foi colocada em uma placa de Petri e incubada com tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 4,0 por 10 minutos. Em seguida, o gel foi coberto lentamente com solução tamponada (tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 4,0) de pNP $\beta$ Glc (4-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo) 3mg/mL. A banda protéica correspondente à enzima  $\beta$ -glicosidase pode ser evidenciada devido ao surgimento de uma banda de coloração amarela na posição à qual a enzima se encontrava no momento em que a eletroforese foi interrompida. A outra parte do gel foi acondicionada em tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 4,0 por 5 minutos. Posteriormente, foi adicionada ao gel uma solução de 0,5 mM de 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (MUG – Sigma Aldrich), em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,0, por 20 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o gel foi colocado sob luz ultravioleta e a presença do produto fluorescente, oriundo da reação enzimática, foi visualizada, o gel foi fotografado sob luz UV e denominado MUG-PAGE.

Com o intuito de determinar a massa molecular, a parte do gel nativo revelada com o 4-MUG foi extraída do gel. Essa faixa de gel foi acondicionada em tubo de polipropileno (tipo Falcon) contendo 1mL de tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 4,0

e triturada no gelo utilizando um bastão de vidro, até que o gel estivesse em pequenos fragmentos. Para que ocorresse a difusão da enzima do gel para a solução tampão, o tubo ficou no gelo por 2 h. Em seguida, foi feita centrifugação (10000 g / 10 min / 4 °C) e o sobrenadante foi coletado e utilizado para análise em SDS-PAGE (item 4.9).

#### **4.10. Determinação da massa molecular**

Para ao cálculo da massa molecular da  $\beta$ -glicosidase secretada pelo *Chrysosporthe cubensis* LPF-1, foi utilizada a eletroforese em gel de poliacrilamida (12,0 %) em condições desnaturantes (item 4.9.1.) e o gel foi corado com nitrato de prata. Os marcadores de massa molecular utilizados foram os da Thermo Scientific, uma mistura de 14 proteínas altamente purificadas, com suas massas moleculares pré-definidas (200-10 kDa). A massa molecular da  $\beta$ -glicosidase foi estimada correlacionando-se, por meio de uma curva padrão, os perfis de migração das proteínas padrão (distância percorrida no gel, em centímetros) com o logaritmo das massas moleculares.

#### **4.11. Caracterização enzimática**

##### **4.11.1. Efeito do pH**

Para determinar o efeito do pH na atividade da  $\beta$ -glicosidase as condições de ensaio foram as mesmas descritas no item 4.7.1, porém o ensaio foi realizado em diferentes valores de pH (2.0-8.0) utilizando tampões McIlvaine. (McIlvaine, 1921).

##### **4.11.2. Efeito da temperatura**

Para o estudo do efeito da temperatura na atividade da  $\beta$ -glicosidase os ensaios enzimáticos foram realizados como descritos no item 4.7.1, exceto que as condições de ensaio foram em diferentes valores de temperatura, na faixa de 30 a 80 °C.

##### **4.11.3. Efeito do pH na estabilidade e atividade da enzima**

O efeito do pH na estabilidade e atividade da  $\beta$ -glicosidase foi analisado por meio da pré-incubação da solução da enzima na faixa de pH de 2,0 a 8,0, no gelo por 30 minutos. Após o período de pré-incubação, o ensaio de atividade enzimática foi conduzido como descrito no item 4.7.1.

##### **4.11.4. Análise de termoestabilidade**

Alíquotas da enzima purificada (0–100  $\mu$ L) foram pré-incubadas, em solução tampão acetato de sódio, 100 mM, pH 4,0, nas temperaturas de 50, 60 e 70 °C por 96 h.

Em diferentes intervalos de tempo, alíquotas foram retiradas e a atividade residual de  $\beta$ -glicosidase foi medida conforme descrito no item 4.7.1.

#### **4.11.5. Cálculo da meia-vida da $\beta$ -glicosidase**

Para determinar a meia-vida da enzima o ensaio foi feito nas mesmas condições do item 4.11.4. As curvas de meia-vida foram construídas pelo programa Sigma Plot 10.0, versão para Windows.

#### **4.11.6. Efeitos de íons, açúcares e agentes redutores na atividade da $\beta$ -glicosidase**

Para determinar o efeito de íons, agentes redutores e açúcares na atividade da enzima, os ensaios enzimáticos foram realizados conforme descrito no item 4.7.1, porém foram adicionadas soluções dos seguintes compostos efetores: cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ), cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2$ ), cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ), sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ ), cloreto de manganês ( $\text{MnCl}_2$ ), sulfato de manganês ( $\text{MnSO}_4$ ), cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ), fluoreto de sódio ( $\text{NaF}$ ), sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), cloreto de potássio ( $\text{KCl}$ ), iodeto de potássio ( $\text{KI}$ ), cloreto de zinco ( $\text{ZnCl}_2$ ), duodecil sulfato de sódio (SDS), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), Uréia, Etanol,  $\beta$ -mercaptoetanol, Furfural, Hidroximetilfurfural (HMF), glicose e galactose, com concentrações finais de 1 e 10 mM, e Triton X-100 1% e 5%. As atividades determinadas com os efetores foram então comparadas com a atividade na ausência desses.

#### **4.11.7. Determinação da especificidade da $\beta$ -glicosidase para diversos substratos**

Para determinar a especificidade da enzima os ensaios enzimáticos foram realizados com diversos substratos sintéticos, naturais e polímeros.

Os ensaios com os substratos sintéticos  $\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo ( $\rho\text{NP}\alpha\text{Glc}$ ),  $o$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo ( $o\text{NP}\beta\text{Glc}$ ),  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo ( $\rho\text{NP}\beta\text{Gal}$ ),  $\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo ( $\rho\text{NP}\alpha\text{Gal}$ ),  $o$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo ( $o\text{NP}\alpha\text{Gal}$ ),  $m$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo ( $m\text{NP}\alpha\text{Gal}$ ),  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-manopiranosídeo ( $\rho\text{NP}\beta\text{Man}$ ),  $\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo ( $\rho\text{NP}\alpha\text{Man}$ ),  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo ( $\rho\text{NP}\beta\text{Xil}$ ),  $\rho$ -nitrofenil- $\alpha$ -D-arabinopiranosídeo ( $\rho\text{NP}\alpha\text{Ara}$ ), foram conduzidos conforme descrito no item 4.7.2.

As atividades da  $\beta$ -glicosidase foram estimadas com os açúcares redutores celobiose, lactose, maltose, melibiose, gentiobiose, como descrito no item 4.7.3, com a

sacarose, que é um açúcar não redutor e com o polímero celulose (Avicel®), conforme descrito no item 4.7.4.

#### **4.11.8. Determinação dos parâmetros cinéticos $K_M$ e $V_{max}$**

Para a determinação dos valores de  $K_M$  e  $V_{max}$  os ensaios enzimáticos foram realizados utilizando concentrações crescentes do substrato sintético  $\rho\text{NP}\beta\text{Glc}$  e do substrato natural celobiose. As condições do ensaio foram conforme descritas no item 4.7.1, exceto que foram utilizadas concentrações de 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,40; 0,50; 0,70; 0,80 e 1,0 mM para o  $\rho\text{NP}\beta\text{Glc}$  e as concentrações de 0,05; 0,10; 0,15; 0,25; 0,50; 0,70; 0,80; 0,90; 1,0; 1,5; 2,0; 5,0 e 8,0 mM para a celobiose.

Os valores de  $K_M$  e  $V_{max}$  foram calculados através da curva de Michaelis-Menten, curva da concentração do substrato em função da velocidade enzimática, pelo programa Curve Expert, versão 1.4 para Windows.

#### **4.11.9. Determinação de $K_i$ para a glicose**

Para a obtenção do valor de  $K_i$  para a glicose, os ensaios de atividade enzimática foram realizados como descrito no item 4.7.1, porém, utilizando-se concentrações de 1, 5 e 10 mM para a glicose e de 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,40; 0,50; 0,70; 0,80 e 1,0 mM para  $\rho\text{NP}\beta\text{Glc}$ .

O valor de  $K_i$  foi calculado através do gráfico duplo-recíproco (Lineweaver-Burk) e do gráfico da concentração do inibidor (glicose) versus a inclinação do gráfico do duplo recíproco de cada uma das concentrações, pelo programa Sigma Plot 10.0, versão para Windows.

#### **4.12. Sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**

O bagaço de cana-de-açúcar proveniente da usina de Jatiboca, na cidade de Urucânia, Minas Gerais, submetido ao pré-tratamento alcalino, conforme descrito por Falkoski et al. (2013), foi utilizado para a sacarificação enzimática.

A sacarificação foi realizada em frascos Erlenmeyers de 125 mL na concentração de 2% (p/v) de bagaço em 15 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. A fim de inibir a contaminação por outros micro-organismos foram adicionadas à mistura de reação tetraciclina (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e azida 10 mM.

As reações de sacarificação enzimática foram padronizadas para 15 U de FPase de cada mistura enzimática por grama de bagaço e conduzidas utilizando o coquetel comercial Multifect® CL (CL), o extrato do fungo *C. cubensis* (CC) e essas misturas

enzimáticas suplementadas com 15 U de  $\beta$ -glicosidases, os quais foram designados CLS e CCS, respectivamente.

As reações foram conduzidas em Shaker Series 25 D New Brunswick a 50° C e 250 rpm durante 72 horas. Alíquotas de 1,0 mL foram coletadas em diferentes intervalos de tempo pré-determinados e submetidas à centrifugação por 5 minutos a 10000 g. O sobrenadante foi recolhido e imediatamente congelado para análises.

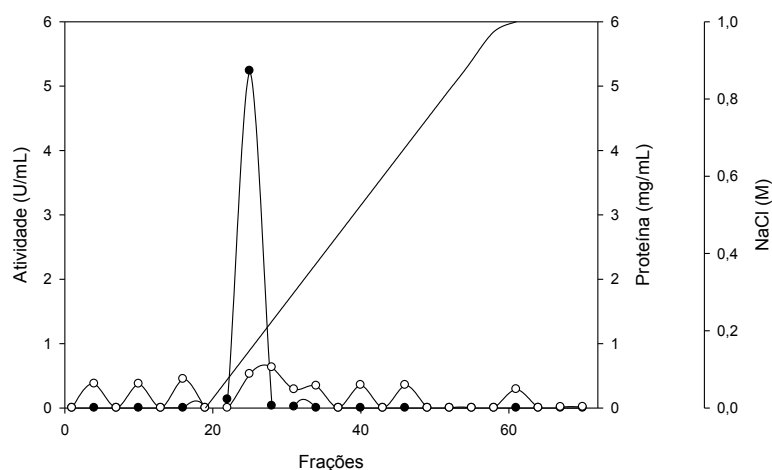
Os açúcares glicose e xilose foram quantificados utilizando um sistema HPLC (High Protein Liquid Chromatography) com um detector de índice de refração (Shimadzu, Kioto, Japão) em coluna Aminex HPX-87 P (300 x 7,8 mm) a 80 °C e o fluxo foi de 0.6 mL.min<sup>-1</sup> com água como eluente.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Purificação das $\beta$ -glicosidases do fungo *Chrysosporthe cubensis* LPF-1

No processo de purificação enzimática o extrato bruto foi submetido à cromatografia de troca iônica em coluna de Q-Sepharose e, posteriormente a fração de maior atividade enzimática foi submetida à cromatografia de filtração em gel em coluna Sephacryl S-200.

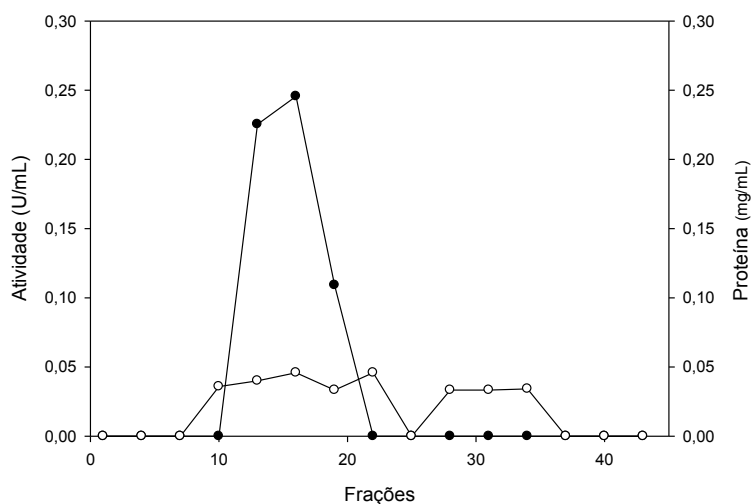
O perfil de eluição da cromatografia em coluna de troca iônica (Fig. 3) mostrou a presença de apenas um pico com atividade da  $\beta$ -glicosidase, a qual foi eluída logo no início do gradiente de NaCl. Com isso, pode-se inferir que o conjunto de  $\beta$ -glicosidases, nas condições estabelecidas da cromatografia, apresenta carga negativa, uma vez que a coluna Q-Sepharose é trocadora de ânions ( $--CH_2-N^+(CH_3)_3$ ). E ainda, a amostra proteica apresenta carga negativa pequena, pois aderiu à resina, mas foi eluído facilmente, o que sugere um valor de pI pouco menor do que o valor de pH 4,0. O restante das proteínas foi eluído ao longo da cromatografia, de maneira que alguns picos foram observados no início do processo e outros durante o gradiente salino, sendo que estes picos não apresentaram atividade de  $\beta$ -glicosidase.



**Figura 3:** Perfil cromatográfico da amostra de  $\beta$ -glicosidases provenientes do extrato bruto de *Chrysosporthe cubensis* LPF-1, em cromatografia de troca iônica em coluna de Q-Sepharose. Atividade de  $\beta$ -glicosidase (●); proteína (○); gradiente de NaCl de 0 a 1,0 M (-).

As frações contendo atividade enzimática foram reunidas e submetidas à cromatografia de filtração em gel, em coluna Sephacryl S-200, como descrito no item 4.6.2.

O perfil de eluição da cromatografia de filtração em gel (Fig. 4) revelou um pico mais amplo de frações protéicas com atividade de  $\beta$ -glicosidase. Por se tratar de uma coluna de exclusão molecular, pode-se perceber que o pico que apresentou atividade enzimática foi eluído no início da cromatografia e corresponde a moléculas de maior peso molecular, as quais passam mais rápidas pela coluna e não ficam retidas nos poros, enquanto que os picos proteicos eluídos mais tarde se tratam de proteínas de menor tamanho. A amplitude do pico sugere a presença de proteínas de massas moleculares diferentes com atividade de  $\beta$ -glicosidases.



**Figura 4:** Perfil cromatográfico da fração enzimática proveniente da cromatografia de troca iônica contendo  $\beta$ -glicosidases de *Chrysosporthe cubensis* LPF-1, em cromatografia de filtração em gel, em coluna Sephacryl S-200. Atividade de  $\beta$ -glicosidase (●) e proteína (○).

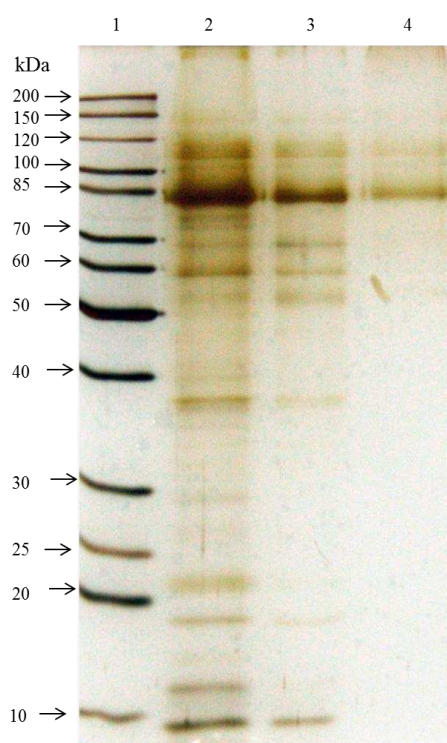
Com essa etapa foi observado que a concentração de proteínas em relação ao passo anterior reduziu quase na metade, o fator de purificação praticamente dobrou e a atividade específica aumentou, como mostrado na tabela 1.

Ao final do processo de purificação pode-se perceber que a fração proteica com atividade de  $\beta$ -glicosidases de *C. cubensis* LPF-1 apresentou um fator de purificação de 2,05 vezes com um rendimento de 64,5 % (Tabela 1).

**Tabela 1:** Resumo das etapas de purificação das  $\beta$ -glicosidases (Ec) de *Chrysosporthe cubensis* LPF-1, cultivado em SSF contendo farelo de como fonte de carbono.

Etapa	Atividade (U)	Proteína (mg)	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação (X)	Rendimento (%)
Extrato bruto	9570,0	2005,0	4,77	1,00	100,0
Q-Sepharose	8010,0	1177,5	6,80	1,43	83,7
Sephacryl S-200	6174,0	630,0	9,80	2,05	64,5

As frações ativas que foram eluídas a cada etapa do processo de purificação foram submetidas à eletroforese (SDS-PAGE, 12,0%).

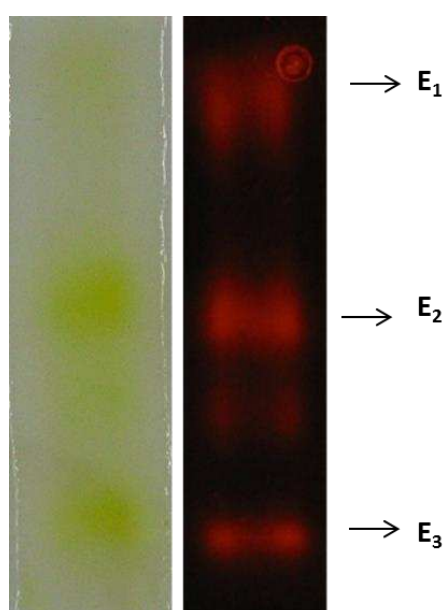


**Figura 5:** Eletroforese desnaturante (SDS-PAGE 12,0 %) de amostras contendo  $\beta$ -glicosidase do *Chrysosporthe cubensis* LPF-1, corado com prata. **1-** marcadores de massa molecular, **2-** extrato bruto, **3-** fração enzimática proveniente cromatografia de troca iônica, **4-** fração enzimática proveniente cromatografia de filtração em gel.

A partir do gel SDS-PAGE obtido, pode ser observado que o número de bandas protéicas diminuiu de forma considerável ao longo das etapas de purificação. Além disso, a análise eletroforética da amostra proteica com atividade de  $\beta$ -glicosidases proveniente da cromatografia de exclusão molecular revelou a presença de uma banda protéica forte, a qual foi também bem evidente no extrato bruto, entretanto outras bandas estavam presentes (Figura 5). Para identificar as bandas referentes às possíveis  $\beta$ -glicosidases, foi realizada a atividade enzimática em gel, utilizando a técnica de zimografia.

## 5.2. Zimograma

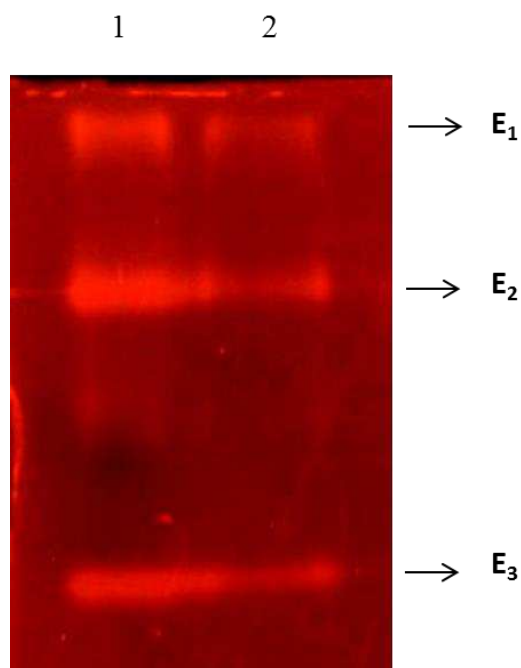
A análise por zimograma foi realizada para detectar a atividade de  $\beta$ -glicosidase em gel, conforme descrito no item 4.10.2 e, os resultados obtidos podem ser observados na figura 6.



**Figura 6:** Zimograma para atividade de  $\beta$ -glicosidase. À esquerda revelação do gel nativo com adição de solução tamponada pNP $\beta$ Glc e à direita com solução tamponada de 4-MUG, evidenciando a localização de  $\beta$ -glicosidase.

De acordo com os resultados, pode-se perceber a presença de três bandas fortes que correspondem a  $\beta$ -glicosidases ativas, reveladas com os dois substratos. Isso demonstra que o fungo *C. cubensis* LPF-1 foi capaz de secretar um conjunto de  $\beta$ -glicosidases que permaneceram juntas mesmo após o processo de purificação. A fim de

validar esse resultado foi realizado o zimograma (4.10.2) com amostras provenientes da cromatografia de troca iônica e de filtração em gel, para comparação (figura 7). Esse procedimento revelou o mesmo perfil de bandas observado tanto na fração enzimática proveniente da cromatografia de troca iônica, primeira etapa cromatográfica do processo de purificação, quanto na cromatografia de gel filtração, etapa final da purificação.

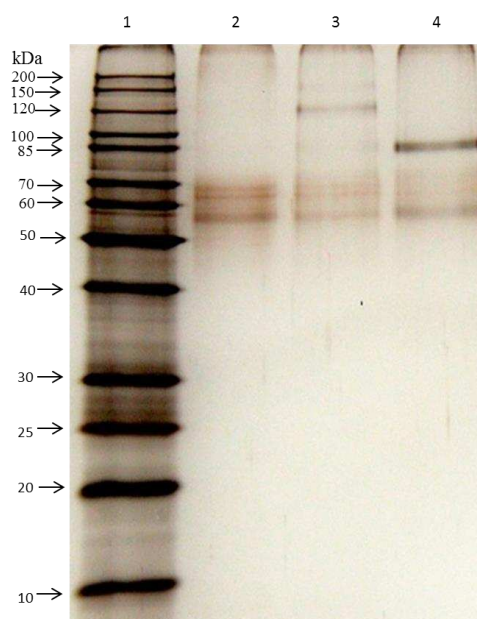


**Figura7:** Zimograma para atividade de  $\beta$ -glicosidase. Revelação do gel nativo com adição de solução tamponada de 4-MUG, evidenciando a localização de  $\beta$ -glicosidase. **1-** fração enzimática proveniente da cromatografia de troca iônica, **2-** fração enzimática oriunda da cromatografia de filtração em gel.

Assim, a utilização da técnica do gel nativo e zimografia tornaram-se importante para o processo de análise enzimática, pois ele permitiu que as enzimas estivessem em suas conformações nativas e atividades catalíticas. A partir dos resultados, as  $\beta$ -glicosidases evidenciadas nos zimogramas foram nomeadas E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> e E<sub>3</sub>, e esse conjunto de  $\beta$ -glicosidases foi denominado Ec, conforme mostrado nas figuras 6 e 7.

### 5.3. Determinação da massa molecular

Para o cálculo da massa molecular, as bandas correspondentes a E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> e E<sub>3</sub>, provenientes da cromatografia de filtração em gel, foram excisadas do gel nativo, as enzimas foram eluídas (item 4.10.2) e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (12,0 %), conforme descrito por Laemmli (1970) e, os resultados podem ser visualizados na figura 8.



**Figura 8:** SDS-PAGE (12,0 %). **1-** Marcadores de massa molecular; **2-** fração E<sub>1</sub>; **3-** fração E<sub>2</sub>; **4-** fração E<sub>3</sub>.

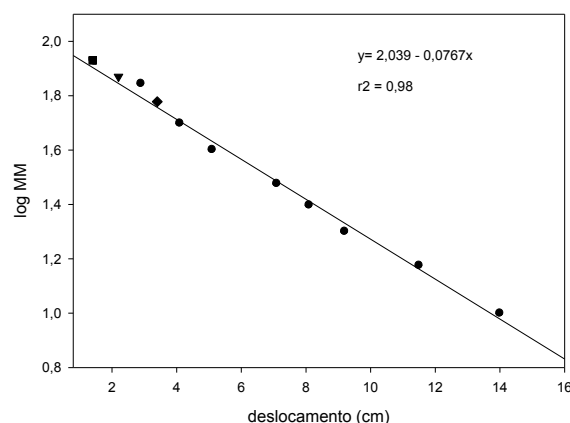
De acordo com a figura 8, pode-se perceber que a fração denominada E<sub>1</sub> ( $\beta$ -glicosidase E<sub>1</sub> do gel nativo) após desnaturação, apresenta pelo menos três subunidades proteicas com massas moleculares entre 50 e 70 kDa (denominadas E<sub>1a</sub>, E<sub>1b</sub> e E<sub>1c</sub> na ordem decrescente de massa molecular), sugerindo que E<sub>1</sub> é uma proteína oligomérica de alta massa molecular. As bandas proteicas observadas após desnaturação de E<sub>1</sub> foram vistas também nas canaletas contendo E<sub>2</sub> e E<sub>3</sub> desnaturadas. Isto sugere que as  $\beta$ -glicosidases E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> e E<sub>3</sub> poderiam ser formadas de subunidades proteicas com massas moleculares semelhantes e que se organizam de diferentes formas para compor as enzimas ativas.

Outra hipótese seria a de que E<sub>1</sub> não se separou de maneira eficientemente de E<sub>2</sub> e E<sub>3</sub> no gel nativo e, quando estas foram transferidas para o SDS-PAGE, E<sub>1</sub> permaneceu nas amostras excisadas. A amostra E<sub>2</sub> após desnaturação, além dos traços de

subunidades proteicas com massas moleculares referentes à  $E_1$ , mostrou-se com uma banda única com massa molecular superior. Do mesmo modo,  $E_3$  após desnaturação, além dos traços de proteínas referentes à  $E_1$ , mostrou-se com uma única banda bem forte e evidente, à qual corresponde à banda mais forte observada na fração da cromatografia de filtração em gel, mostrada na figura 5. A presença das frações proteicas referentes à  $E_1$  em  $E_2$  e  $E_3$ , bem como a não separação de  $E_1$ ,  $E_2$  e  $E_3$  mesmo após duas etapas cromatográficas, sugere que as  $\beta$ -glicosidases de *C. cubensis* LPF-1 podem se apresentar como um complexo proteico, estando de alguma forma associadas.

Alguns trabalhos têm mostrado que enzimas, mesmo após processos de purificação, permaneceram unidas. Almeida et al. (2013), purificou um complexo multienzimático contendo duas endoglicanases (GH3 e GH10), uma celobiohidrolase (GH7) e uma xilanase (GH10), proveniente do fungo endofítico *Fusarium verticillioides*. E ainda, as pesquisas de Costa (2013), mostraram que o fungo *Penicillium chrysogenum* foi capaz de secretar duas  $\beta$ -glicosidases com massas moleculares bem distantes (95 e 241 kDa), o que possibilitou a separação destas por cromatografia de filtração em gel.

Desse modo, as massas moleculares das  $\beta$ -glicosidases de *C. cubensis* LPF-1 foram estimadas por meio da regressão linear da curva construída com o logaritmo das massas moleculares de proteínas padrão com a distância, em centímetros, percorrida no SDS-PAGE (figura 9).



**Figura 9:** Determinação das massas moleculares das  $\beta$ -glicosidases de *Chrysosporthe cubensis* LPF-1. Distâncias percorridas pelos padrões protéicos (●) e pelas  $\beta$ -glicosidases  $E_1$ (◆),  $E_2$ (■) e  $E_3$ (▼).

Assim, as massas moleculares das  $\beta$ -glicosidases  $E_2$  e  $E_3$ , estimadas através da análise eletroforética em SDS-PAGE, foram de 85,43 e 74,17 kDa, respectivamente (figura 8).  $E_1$  apresentou pelo menos três subunidade proteicas com massas moleculares de 63,09, 60,25 e 56,23 kDa para  $E_{1a}$ ,  $E_{1b}$  e  $E_{1c}$ , respectivamente.

Dados da literatura mostram que tanto o extrato comercial bem como o extrato bruto de *Trichoderma* e *Aspergillus* sp apresentam  $\beta$ -glicosidases com massa molecular em torno de 80 kDa (Brijwani et al.; 2010). Li et al.(2013), avaliaram as características bioquímicas e cinéticas de uma  $\beta$ -glicosidase recombinante, cujo gene é proveniente de *T. pendens* e a massa molecular estimada por SDS-PAGE para a  $\beta$ -glicosidase foi de 77,8 kDa.

Além disso, Brijwani e colaboradores obtiveram uma  $\beta$ -glicosidase com massa molecular de 80 kDa, proveniente de um cultivo misto dos fungos *Trichoderma reesei* e *Aspergillus oryzae* e, esta enzima apresentou o mesmo tamanho de uma  $\beta$ -glicosidase comercial de *A. niger*, utilizada para fins de comparação.

Okamoto e colaboradores purificaram e caracterizaram duas  $\beta$ -glicosidases acídicas de *Fomitopsis palustris*. As massas moleculares estimadas por SDS-PAGE foram de 130 e 213 kDa para a BGI e BGII, respectivamente. Segundo os autores, um grande número de estudos tem descritos  $\beta$ -glicosidases de basidiomicetos purificadas e caracterizadas com massas moleculares que variam de 53 a 320 kDa (Okamoto et al.; 2011).

Dessa forma, os valores de massas moleculares estimados para a três  $\beta$ -glicosidases de *C. cubensis* são similares aos valores descritos na literatura. Esses resultados mostram que *C. cubensis* LPF-1 quando cultivado nas condições descritas neste trabalho, secretam pelo menos três  $\beta$ -glicosidases que podem estar associadas formando um complexo enzimático, o que poderia conferir vantagens no que se refere a estabilidade e atividade catalítica.

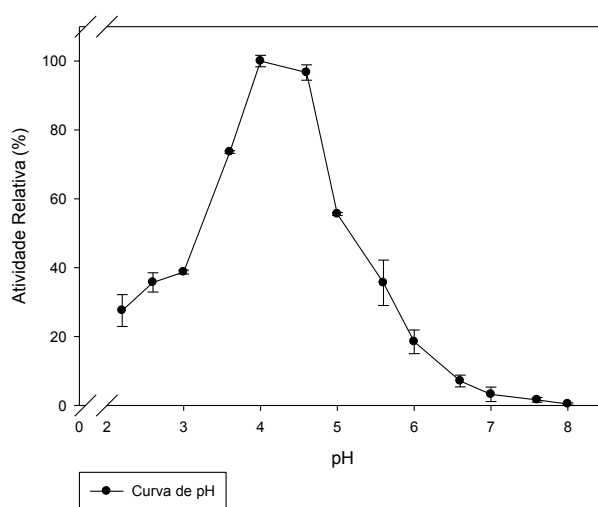
#### **5.4. Caracterização enzimática**

Uma vez que o extrato bruto de *C. cubensis* LPF-1 é utilizado para sacarificação de biomassa lignocelulósica, ou seja, as  $\beta$ -glicosidases estarão exercendo as atividades conjuntamente e, que mesmo após o processo de purificação as  $\beta$ -glicosidases não se separaram. A caracterização enzimática descrita a seguir foi realizada na fração obtida

após a cromatografia de filtração em gel, contendo atividades conjuntas de E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> e E<sub>3</sub>, referida como complexo de  $\beta$ -glicosidases (Ec).

#### 5.4.1. Efeito do pH

Valores de atividades acima de 73 % foram observados na faixa de pH entre 3,5 e 4,5 e a atividade máxima foi em pH 4,0. Atividades menores foram observadas em pH 3,0 (38 % da atividade) e 6,0 (18,5 %). E ainda, nos valores de pH 6,0 e 6,5 a atividade reduziu drasticamente e entre os valores de pH 7 e 8 a atividade de Ec foi praticamente nula (Figura 10). Os resultados mostram que as  $\beta$ -glicosidases de *C. cubensis* são enzimas ácidas.

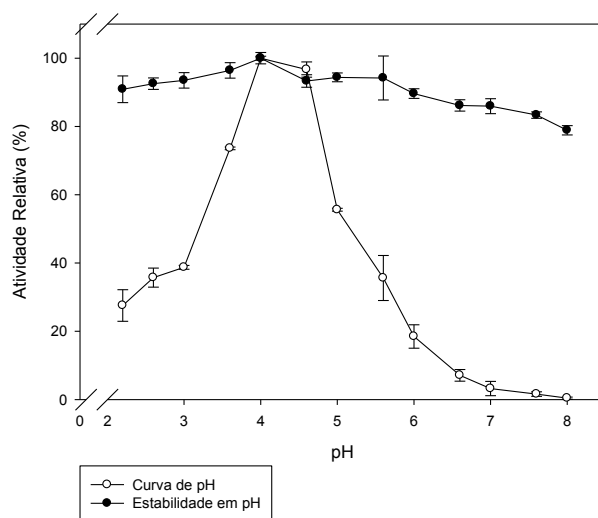


**Figura 10:** Efeito do pH na atividade das  $\beta$ -glicosidases de *Chrysosporthe cubensis* LPF-1 na temperatura de 50 °C

Valores próximos foram relatados para  $\beta$ -glicosidases de outros fungos. O fitopatógeno *Pycnoporus sanguineus* foi capaz de secretar uma  $\beta$ -glicosidase que exibiu atividade máxima em pH 4,5 (Falkoski et al., 2012), o mesmo valor foi obtido para a  $\beta$ -glicosidase de *Phoma* sp. (Choi et al., 2011). Choi e colaboradores, observaram que em pH 4,0 e 5,0 a atividade enzimática foi aproximadamente 97% e 81% do valor máximo obtido, respectivamente e, ainda nos valores de pH abaixo de 3,0 e acima de 7,0 a  $\beta$ -glicosidase não apresentou atividade. Por outro lado, a  $\beta$ -glicosidase de *T. pendens* apresentou atividade máxima no valor de pH 3,5. Na faixa de pH de 3,5 a 4,0 a atividade foi de 80 % enquanto que 60% de atividade foi observado nos valores de pH de 4,5 a 6,0 (Li et al.; 2013).

Em geral,  $\beta$ -glicosidasas produzidas por fungos apresentam valores de pH ótimos na faixa de 4,0 a 6,5 (Choi et al., 2011). Outros trabalhos mostraram um valor de pH 5,0 para a  $\beta$ -glicosidase do fungo *Termitomyces clypeatus* (Pal et al., 2010), de forma semelhante, a  $\beta$ -glicosidase de *Penicillium citrinum* YS40-5 apresentou maior atividade também nesse valor pH (I-Son et al., 2010).

Além disso, foi avaliado o efeito do pH sobre a estabilidade e atividade de Ec, como mostrado na figura 11. Após a incubação de Ec em soluções de pH na faixa de 2,0 a 8,0, no gelo por 1 hora, o ensaio de atividade enzimática foi conduzido (item 4.7.1).

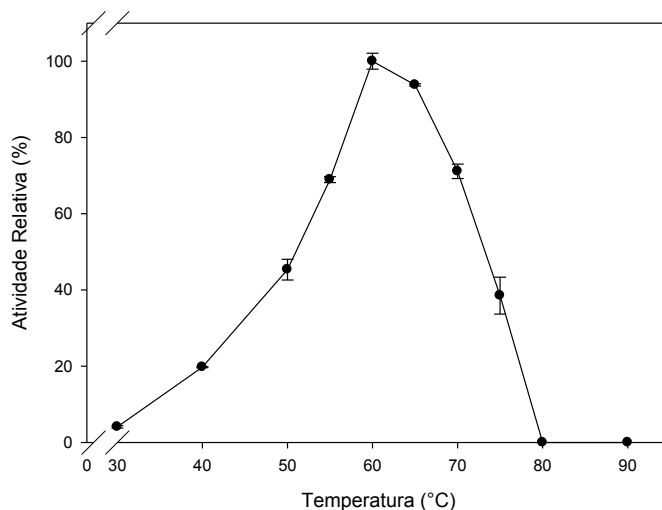


**Figura 11:** Efeito do pH sobre a estabilidade das  $\beta$ -glicosidasas de *Chrysosporthe cubensis* LPF-1. Curva de pH (○) e curva de estabilidade (●).

De acordo com os resultados obtidos pode-se observar que após Ec ter sido incubado nos valores de pH de 2,0 a 8,0, as enzimas conseguiram manter atividade alta quando retornadas ao pH ótimo. Para as  $\beta$ -glicosidasas de *C. cubensis*, valores de atividade acima de 90% foram observados após pré-incubação na faixa de pH entre 2,0 e 6,0, sendo que em pH 8,0 a atividade residual foi de 78%. Estes resultados mostram que mesmo após pré-incubação de Ec em valores de pH abaixo de 3,0 e acima de 5,5, nos quais EC perdeu mais de 50% de sua atividade, quando ensaiadas no pH ótimo, a atividade foi recuperada, indicando uma possível renaturação das enzimas. Estudos mostraram que a  $\beta$ -glicosidase de *T. clypeatus* na faixa de pH 6,0 a 7,0, após 1 hora de incubação a temperatura ambiente, manteve 95 % de sua atividade (Pal et al., 2010).

### 5.4.2. Efeito da temperatura

O efeito na temperatura na atividade enzimática foi avaliado na faixa de 30-90 °C (figura 12).



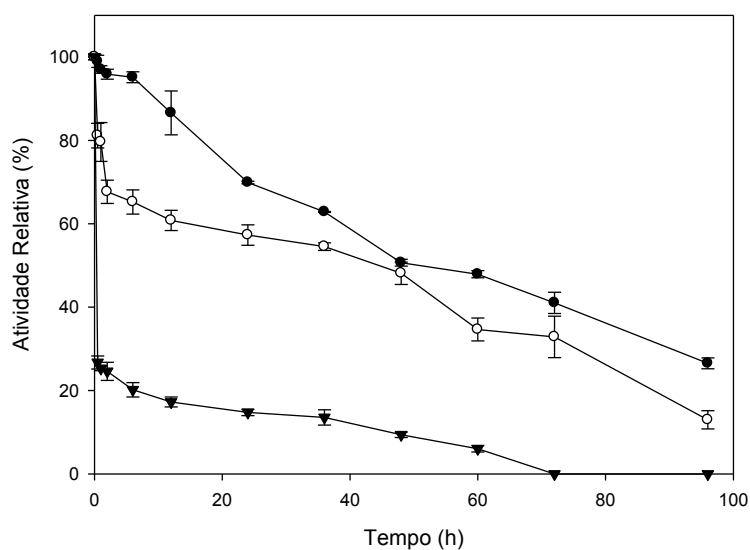
**Figura 12:** Efeito da temperatura na atividade das β-glicosidases de *Chrysosporthe cubensis* LPF-1 em pH 4,0.

O complexo de β-glicosidases de *C. cubensis* LPF-1 apresentou maior atividade na temperatura de 60 °C. Diminuições drásticas de atividade foram observadas em valores de temperatura acima de 75 °C. Entretanto a atividade residual de 71% foi obtida quando a reação foi conduzida a 70°C e de 38,5 % a 75°C.

Valores próximos foram obtidos para as β-glicosidases de *Phoma* sp. e *P. citrinum*, as quais exibiram atividade máxima nas temperaturas de 65 °C e 70 °C, respectivamente (Choi et al., 2011; I-Son et al., 2010). De acordo com os relatos de Choi, nos valores de 60 °C e 70°C a β-glicosidase de *Phoma* sp. apresentou 99% e 22% da atividade máxima obtida, respectivamente. Além disso, Pal et al. (2010) encontraram valor de temperatura ótima de 45 °C para β-glicosidase de *T. clypeatus*, enquanto que para *P. sanguineus* a enzima foi mais ativa na temperatura de 50 °C.

### 5.4.3. Análise de Termoestabilidade

A análise de estabilidade térmica de Ec foi realizada nas temperaturas de 50°C, 60°C e 70°C por 96 horas e, os perfis de atividade relativa obtidos durante o experimento estão na figura 13.



**Figura 13:** Análise de termoestabilidade das  $\beta$ -glicosidases de *Chrysosporthe cubensis* LPF-1. As amostras enzimáticas foram pré-incubadas nas temperaturas de 50 °C (●), 60 °C (○) e 70 °C (▼). As atividades foram calculadas considerando-se como 100% a atividade sem pré-incubação.

Nas temperaturas de 50°C e 60 °C a atividade residual foi de 86% e 60%, respectivamente, após 12 horas de pré-incubação. A 70 °C Ec foi razoavelmente termoestável, sendo que após 30 minutos a atividade foi apenas 29% da atividade máxima. A partir dos resultados obtidos, pode-se perceber que Ec foi altamente termoestável, considerando que o *C. cubensis* é um fungo fitopatogênico.

I-Son e colaboradores (2010) relataram que a  $\beta$ -glicosidase de *Penicillium citrinum* foi estável na faixa de temperatura de 45 a 75°C, retendo cerca de 80% da atividade máxima, entretanto a estabilidade da enzima diminuiu drasticamente em temperaturas acima de 60 °C, resultando em menos de 20% de atividade residual.

Além disso, o complexo de  $\beta$ -glicosidases de *C. cubensis* após 96 horas de pré-incubação, reteve 26% e 12% da atividade máxima nas temperaturas de 50 °C e 60 °C, respectivamente, sendo que a 70 °C após 60 horas de pré-incubação a atividade residual foi de apenas 6% da atividade máxima.

Dessa forma, o complexo de  $\beta$ -glicosidases de *C. cubensis* LPF-1 se mostrou muito mais termoestável do que relatado para a maioria de outras  $\beta$ -glicosidases fúngicas.

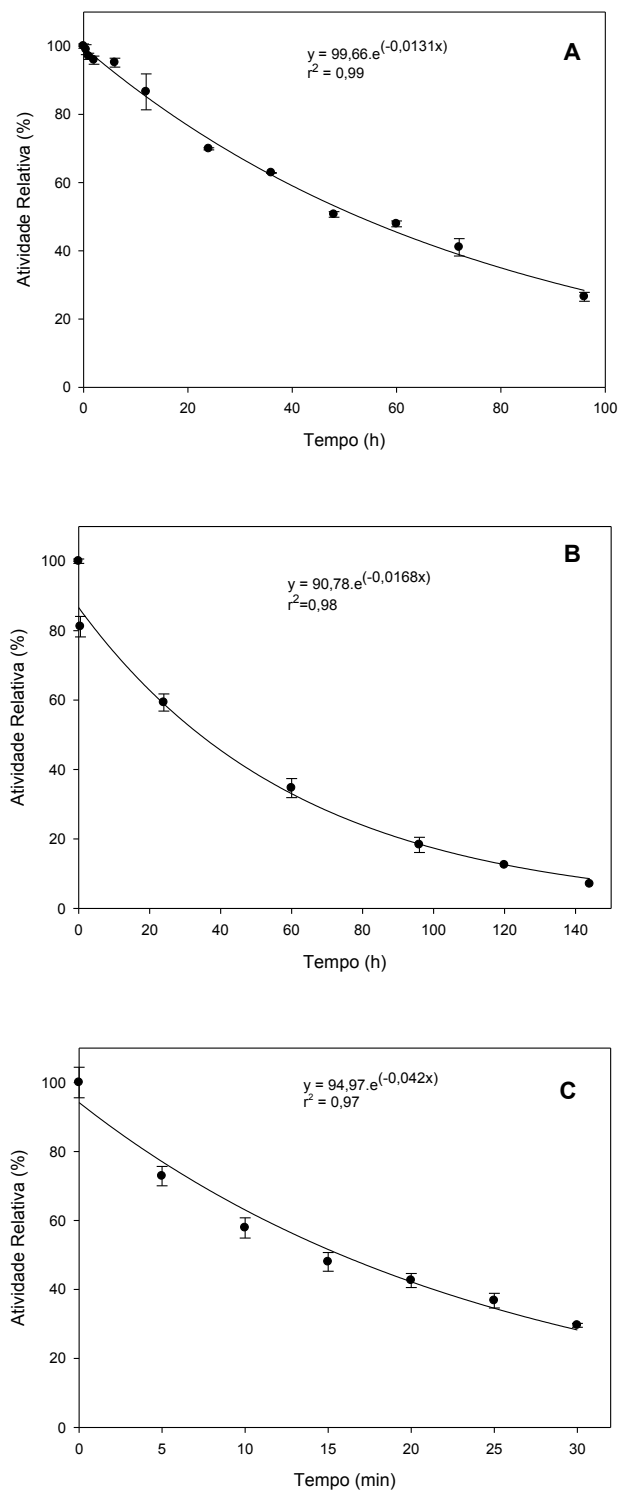
#### **5.4.4. Determinação da meia-vida das $\beta$ -glicosidases**

Para a determinação dos valores de meia vida das  $\beta$ -glicosidases de *C. cubensis*, os ensaios foram realizados nas temperaturas de 50, 60 e 70°C (Figura 14). Na temperatura de 50 °C, o valor estimado para a meia-vida foi de 52 horas e 39 minutos, enquanto que a 60 °C com 35 horas e 30 minutos *Ec* teve sua atividade reduzida à metade. A estimativa para a meia-vida do complexo de  $\beta$ -glicosidases de *C. cubensis* na temperatura de 70 °C foi de 15,3 minutos.

Segundo Choi et al. (2011), a  $\beta$ -glicosidase de *Phoma* sp. apresentou tempo de meia-vida de 197 minutos a 50 °C. E ainda, estudos de I-Son (2010) mostraram que o tempo de meia-vida da  $\beta$ -glicosidase de *P. citrinum* a 58 °C foi de 2 horas.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que esse complexo de  $\beta$ -glicosidases de *C. cubensis*, poderia ser utilizado em processos que requerem temperaturas acima de 50 °C e por um longo período de tempo, uma vez que as enzimas foram altamente estáveis tanto a 50 quanto a 60 °C.

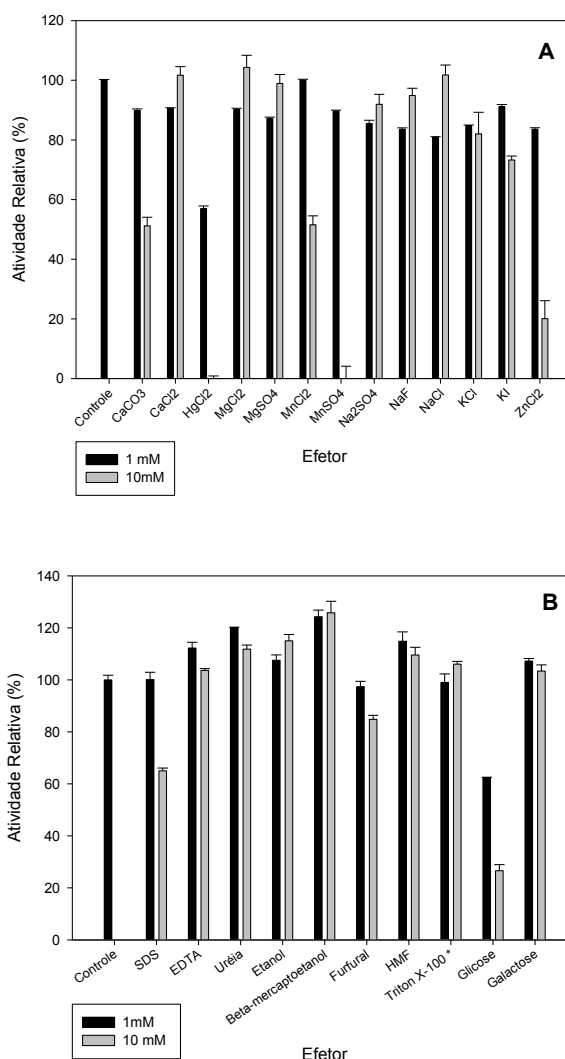
Como a sacarificação enzimática é um processo que requer longos períodos de reação, a estabilidade térmica é uma característica essencial para eficiência da hidrólise da biomassa. Dessa forma, a alta termoestabilidade para *Ec* a 50 °C indica que complexo de  $\beta$ -glicosidases obtido do fungo *C. cubensis* apresenta potencial para ser usado no processo de sacarificação da biomassa.



**Figura 14:** Valores de meia-vida estimados para as  $\beta$ -glicosidases de *Chrysosporthe cubensis* LPF-1 em diferentes temperaturas. (A) 50 °C, (B) 60 °C e (C) 70 °C.

### 5.4.5. Efeito de íons, açúcares e agentes desnaturantes na atividade das $\beta$ -glicosidasas de *Chrysosporthe cubensis* LPF-1

Para determinar o efeito de íons, agentes redutores e açúcares na atividade das  $\beta$ -glicosidasas de *C. cubensis*, os ensaios enzimáticos foram realizados conforme descrito no item 4.11.6. A atividade relativa foi calculada em relação à atividade da enzima sem efetor, considerada como controle com 100% de atividade (figura 15).



**Figura 15:** Atividade relativa das  $\beta$ -glicosidasas de *Chrysosporthe cubensis* LPF-1 submetido aos diferentes efetores. (A) íons, (B) açúcares, agentes redutores e outros efetores.

Agentes redutores, íons e açúcares resultaram em diversos efeitos sobre a atividade das  $\beta$ -glicosidasas de *C. cubensis* (figura 15). A atividade das enzimas foi completamente inibida por cloreto de mercúrio e sulfato de manganês, na concentração

final de 10 mM. Carbonato de cálcio, cloreto de manganês e cloreto de zinco inibiram consideravelmente as três  $\beta$ -glicosidasas, sendo que as atividades residuais na concentração de 10 mM foram de 51,21, 51,52 e 20,15 %, respectivamente.

Além disso, o detergente dodecilsulfato de sódio (SDS) e o cloreto de zinco na concentração de 10 mM resultaram em atividades residuais de 65,02 e 20,15%, e a glicose inibiu consideravelmente nas concentrações de 1 e 10 mM, sendo que na segunda, a atividade enzimática foi reduzida em 73,40%.

A atividade das enzimas praticamente não foi alterada por cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, sulfato de magnésio, cloreto de sódio, fluoreto de sódio, sulfato de sódio, cloreto de potássio, iodeto de potássio, furfural, hidroximetilfurfural e galactose, todos nas concentrações finais de 1 e 10 mM e, por triton X-100, nas concentrações finais de 1 e 5%.

Ec teve sua atividade aumentada em 20% na presença de uréia, 15% com etanol, 25% com  $\beta$ -mercaptoetanol e 12% com o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), todos nas concentrações finais de 1 e 10 mM. Devido à uréia ser um agente caotrópico pode-se inferir que a mesma promoveu desagregação das  $\beta$ -glicosidasas, resultando em exposição das enzimas, o que propiciou em aumento de atividade. O EDTA é um agente quelante e, uma vez que a atividade foi aumentada na sua presença, pode-se sugerir que as  $\beta$ -glicosidasas não sejam enzimas complexadas com metais. Já o  $\beta$ -mercaptoetanol foi um dos efetores que promoveu maior aumento na atividade enzimática. Por se tratar de um agente redutor, esse efector pode atuar em ligações químicas na estrutura da enzima, que resultam na estabilização do sítio catalítico e, portanto contribui para a ativação das  $\beta$ -glicosidasas.

Choi et al. (2011), avaliaram o efeito de íons na atividade da  $\beta$ -glicosidase de *Phoma* sp. A atividade da enzima foi aumentada na presença de magnésio e zinco, nas concentrações de 5 e 10 mM em ambos os íons, sendo que com o primeiro o aumento na atividade foi de 20% e com o segundo de 10%. Por outro lado, os íons manganês, ferro, cobalto e cálcio não apresentaram nenhuma influencia significativa na atividade, enquanto que a enzima teve sua atividade reduzida em 52% na presença de cobre.

Resultados similares foram descritos por I-Son e colaboradores (2010). A  $\beta$ -glicosidase do fungo *P. citrinum* foi fortemente inibida por íons de cobre, os quais promoveram uma redução de 73% da atividade. E ainda, a atividade da enzima

praticamente não foi alterada na presença de cálcio, manganês e cobalto. Entretanto, a presença de zinco, na concentração de 10 mM, resultou em uma diminuição de 22% da atividade enzimática.

Além disso, a  $\beta$ -glicosidase de *T. pendens* foi incubada na presença de vários íons metais e solventes orgânicos. Os íons magnésio, ferro e mercúrio inibiram a atividade enzimática na concentração de 5 mM, sendo que o último reduziu a atividade para 3,5%. Por outro lado, cobalto, zinco e manganês resultaram em aumento na atividade enzimática e ainda, na presença de solventes orgânicos a enzima exibiu um leve aumento de atividade, tendo o etanol promovido um aumento de 11% (Li et al.; 2013).

#### **5.4.6. Especificidade de substrato das $\beta$ -glicosidases de *Chrysosporthe cubensis* LPF-1**

Para determinar a especificidade do complexo de  $\beta$ -glicosidases de *C. cubensis* foram realizados ensaios enzimáticos com diversos substratos sintéticos, naturais e polímeros, conforme descrito no item 4.11.7.

A partir dos resultados obtidos para os substratos sintéticos, pode-se perceber que Ec foi altamente seletivo para ligações do tipo  $\beta$  e para resíduos de glicose (Tabela 2). As enzimas associadas foram capazes de hidrolisar somente pNP $\beta$ Glc e oNP $\beta$ Glc, de maneira que não apresentaram nenhuma atividade significativa para outros substratos sintéticos, todos nas concentrações de 0,5 mM, os quais continham resíduos de açúcares diferentes da glicose e com ligações na posição  $\alpha$ .

Considerando a atividade com o pNP $\beta$ Glc como 100%, o substrato oNP $\beta$ Glc resultou em 25,4% de atividade relativa. Isso mostra que além de hidrolisar ligações  $\beta$  do tipo 1-4, como ocorre no pNP $\beta$ Glc, na celobiose e na celulose, Ec foi capaz também de hidrolisar ligações do tipo 1-2, presente no substrato oNP $\beta$ Glc e ligações do tipo 1-6, que unem os monômeros de glicose para formar a gentiobiose.

**Tabela 2:** Atividade das  $\beta$ -glicosidasas de *Chrysoporthe cubensis* LPF-1 com substratos sintéticos, naturais e o polímero celulose.

Substrato	Concentração final	Atividade ( $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ ) $\pm$ DP
$\rho\text{NP}\beta\text{Glc}$	0,5 mM	0,585 $\pm$ 0,037
$\rho\text{NP}\alpha\text{Glc}$	0,5 mM	0
$\text{oNP}\beta\text{Glc}$	0,5 mM	0,149 $\pm$ 0,014
$\rho\text{NP}\beta\text{Gal}$	0,5 mM	0
$\rho\text{NP}\alpha\text{Gal}$	0,5 mM	0
$\text{oNP}\alpha\text{Gal}$	0,5 mM	0
$\text{mNP}\alpha\text{Gal}$	0,5 mM	0
$\rho\text{NP}\beta\text{Man}$	0,5 mM	0
$\rho\text{NP}\alpha\text{Man}$	0,5 mM	0
$\rho\text{NP}\beta\text{Xil}$	0,5 mM	0
$\rho\text{NP}\alpha\text{Ara}$	0,5 mM	0
Celobiose	2,5 mM	0,157 $\pm$ 0,006
Lactose	2,5 mM	0
Maltose	2,5 mM	0
Melibiose	2,5mM	0
Gentiobiose	2,5 mM	0,104 $\pm$ 0,003
Sacarose	2,5 mM	0
Celulose	0,1%	0
Celulose	1%	0,018 $\pm$ 0,004

Kara e colaboradores (2011) avaliaram a atividade da  $\beta$ -glicosidase de *Olea europaea* L com substratos sintéticos  $\rho\text{NP}\beta\text{Glc}$  e  $\text{oNP}\beta\text{Glc}$ . O substrato na posição para

foi mais específico para a enzima do que o  $\rho$ -NP $\beta$ Glc na posição orto, sendo que os valores de  $K_M$  obtidos foram de 2,22 e 14,11 mM, respectivamente.

Já a  $\beta$ -glicosidase de *Phoma* sp. foi capaz de hidrolisar o  $\rho$ NP $\beta$ Glc bem como  $\rho$ NP $\beta$ Cel e  $\rho$ NP $\beta$ Xil, com atividades relativas de 3,8 e 1,0%, respectivamente, todos nas concentrações de 1 mM (Choi et al.; 2011).

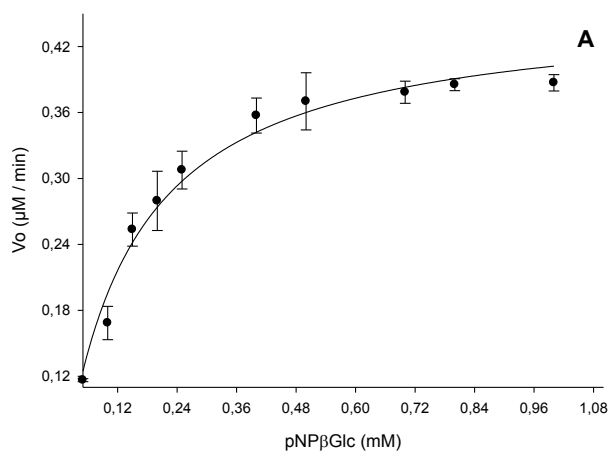
De acordo com os resultados encontrados para os substratos naturais, *Ec* foi capaz de hidrolisar celobiose, gentiobiose, nas concentrações de 2,5 mM e celulose, na concentração de 0,1 e 1%, sendo o último em uma escala bem menor do que os demais. A atividade relativa com a celobiose foi de 26,9%, enquanto que com gentiobiose atividade foi de 17,7% e com a celulose bem menos expressiva, no total de 3,1%, na concentração de 1%.

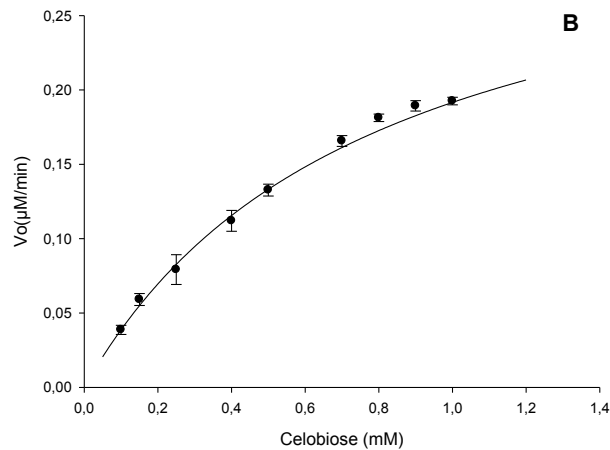
Choi et al. (2011) relataram que a  $\beta$ -glicosidase de *Phoma* sp. foi altamente específica para a celobiose, de maneira que a enzima apresentou 54,9% de atividade relativa com esse substrato.

Além disso, o complexo de  $\beta$ -glicosidasas de *C. cubensis* não apresentou nenhuma ou muito pouca capacidade de hidrolisar maltose, lactose, melibiose e sacarose, nas concentrações de 2,5 mM e, celulose na concentração de 0,1%.

#### 5.4.7. Constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) e velocidade máxima ( $V_{max}$ )

O efeito da concentração dos substratos  $\rho$ NP $\beta$ Glc e celobiose na velocidade da reação catalisada pelo *Ec*  $\beta$  de *C. cubensis* foram determinados através da curva de Michaelis-Menten, como demonstrado na figura 16.





**Figura 16:** Efeito de diferentes concentrações de substratos na velocidade da reação catalisada pelo conjunto de  $\beta$ -glicosidases de *Chrysosporthe cubensis* LPF-1. (A) Com o substrato sintético  $\rho$ NP $\beta$ Glc, (B) com o substrato natural celobiose.

Os valores de  $K_M$  e  $V_{max}$  para o complexo de  $\beta$ -glicosidases de *C. cubensis* foram de 0,132 mM e  $0,416 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ , respectivamente, utilizando o  $\rho$ NP $\beta$ Glc (figura 16 A), enquanto que com a celobiose o valor obtido de  $K_M$  foi de 0,782 mM e  $V_{max}$   $0,341 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$  (figura 16 B).

Choi et al. (2011), avaliaram os parâmetros cinéticos para a  $\beta$ -glicosidase de *Phoma* sp. e utilizaram como substratos o  $\rho$ NP $\beta$ Glc e a celobiose. Os valores de  $K_M$  encontrados foram de 0,3 mM para  $\rho$ NP $\beta$ Glc e de 3,2 mM para a celobiose. Kara e colaboradores (2011) obtiveram o valor de  $K_M$  de 2,22 mM para a  $\beta$ -glicosidase de *Olea europaea* L, como o substrato  $\rho$ NP $\beta$ Glc. Okamoto e colaboradores obtiveram valores de  $K_M$  de 0,706 e 0,971 mM, respectivamente, para BGI e BGII, utilizando o  $\rho$ NP $\beta$ Glc como substrato (Okamoto et al.; 2011).

A  $\beta$ -glicosidase do fungo *P. citrinum* apresentou o valor de  $K_M$  de 1,2 mM quando utilizado o substrato  $\rho$ NP $\beta$ Glc e de 32,17 mM com a celobiose (I-Son et al.; 2010). A  $\beta$ -glicosidase recombinante de *Thermofilum pendens* foi altamente específica tanto para o  $\rho$ NP $\beta$ Glc quanto para a celobiose e, os valores de  $K_M$  obtidos foram de 0,189 e 0,149 mM, respectivamente (Li et al.; 2013).

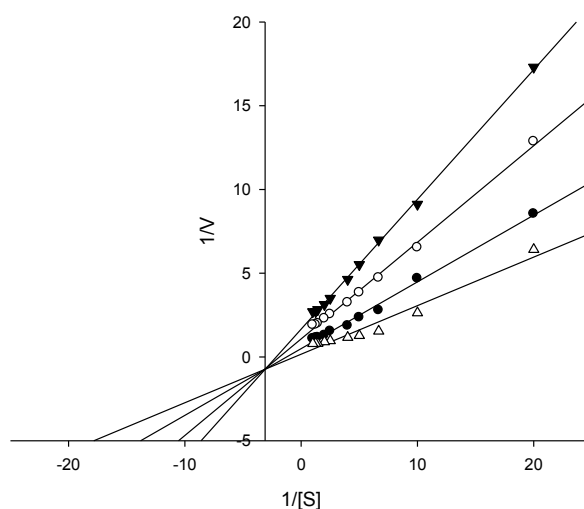
Em comparação com os dados da literatura, pode-se perceber que os valores de  $K_M$  e  $V_{max}$  obtidos para o complexo de  $\beta$ -glicosidases de *C. cubensis* são bem menores daqueles descritos na literatura, embora, sabe-se que enzimas oriundas de diferentes

fontes apresentam valores distintos de afinidades para os substratos pNPβGlc e celobiose.

Assim, Ec apresenta maior afinidade para o substrato sintético pNPβGlc em comparação com a celobiose e ainda, o valor de  $K_M$  encontrado para a celobiose é muito baixo, o que demonstra que o conjunto de enzimas também apresenta alta afinidade por esse substrato. Esses resultados demonstram que o complexo de β-glicosidases de *C. cubensis* apresenta grande potencial para aplicação no processo de sacarificação da biomassa, uma vez que a celobiose atua como forte inibidor de celulasas e o acúmulo desse substrato impede a hidrólise completa da celulose.

#### 5.4.8. Determinação da constante de inibição ( $K_i$ )

Para a obtenção do valor de  $K_i$  para a glicose, os ensaios de atividade enzimática foram realizados como descrito no item 4.11.7. A partir do gráfico do duplo-recíproco (figura 17), pode-se perceber que a glicose apresenta o comportamento de um inibidor competitivo. As retas que representam ensaios enzimáticos na ausência e na presença de glicose interceptam no mesmo ponto no eixo y, indicando, portanto o mesmo valor de  $V_{max}$ , enquanto que o na presença do inibidor, o valor de  $K_M$  aumentou (intercepto no eixo x).

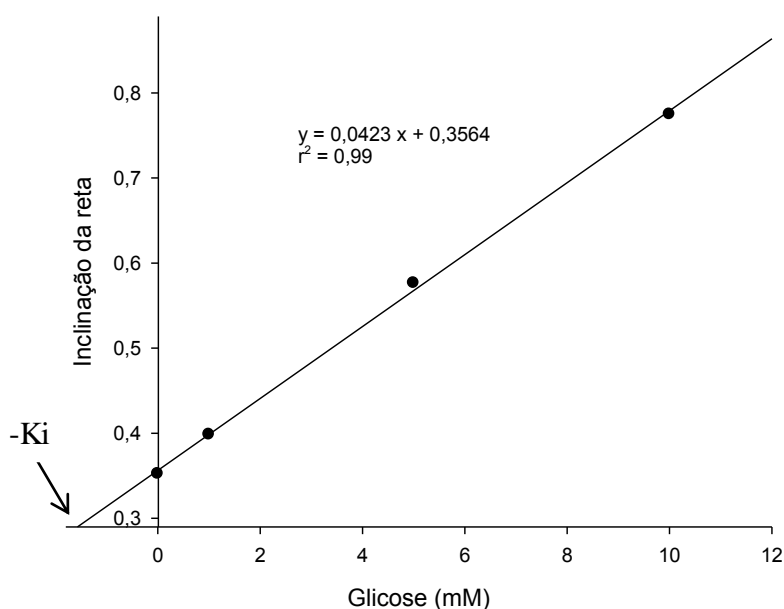


**Figura17:** Gráfico do duplo recíproco. Glicose nas concentrações de 1mM (●), 5mM (○), 10 mM (▼) e Controle – sem glicose (△).

De acordo com o gráfico da inclinação da reta do gráfico duplo-recíproco versus a concentração de inibidor correspondente, o valor de  $K_i$  calculado foi de 8,43 mM (Figura 18).

As  $\beta$ -glicosidases de diferentes fontes possuem comportamento diferente com a glicose. A  $\beta$ -glicosidase de *Penicillium funiculosum* (Ramani, G.; et al; 2012) apresentou o valor de  $K_i$  de 1,5 mM, enquanto que o  $K_i$  para a  $\beta$ -glicosidase de *Phoma* sp. foi de 1,7 mM (Choi et al.; 2011).

Comparando com os dados da literatura, o valor de  $K_i$  de 8,43 mM determinado para *Ec* usando glicose com inibidor, está bem acima dos valores relatados. Este resultado mostra que as  $\beta$ -glicosidases de *C. cubensis* apresentam menor afinidade por glicose, ou seja, tolerância à glicose.



**Figura18:** Gráfico da concentração do inibidor versus a inclinação do gráfico do duplo recíproco de cada uma das concentrações de glicose.

A glicose produzida por meio do processo de sacarificação atua como inibidor da hidrólise da celulose, pois é um inibidor de várias celulasas, especialmente  $\beta$ -glicosidases. Assim, a eficiência da hidrólise da biomassa requer  $\beta$ -glicosidases que sejam tolerantes à glicose e que possam ser ativas em altas concentrações desse inibidor.

Dessa forma, as  $\beta$ -glicosidases de *C. cubensis* tornam-se extremamente interessante para aplicação na sacarificação enzimática, uma vez que apresenta

especificidade para a celobiose, à qual é um forte inibidor de celulasas, bem como apresenta razoável tolerância à glicose.

### **5.5. Sacarificação enzimática com bagaço de cana-de-açúcar**

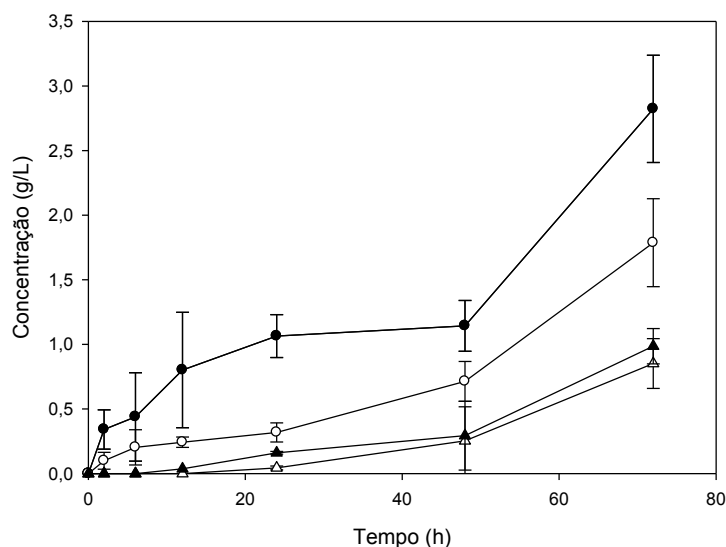
O bagaço de cana foi submetido ao pré-tratamento alcalino e as sacarificações enzimáticas foram realizadas, conforme descrito no item 4.12.

Falkoski et al. (2013), realizaram um estudo com o *C. cubensis* e avaliaram o potencial desse fungo para a produção de enzimas lignocelulolíticas bem como para a sacarificação do bagaço de cana com o extrato enzimático obtido. De acordo com os autores, *C. cubensis* foi capaz produzir de forma expressiva um conjunto de celulasas e hemicelulasas, as quais foram eficientes na sacarificação do bagaço de cana após pré-tratamento alcalino.

Além disso, o coquetel enzimático do *Chrysoporthe cubensis* foi mais eficiente no processo de hidrólise do que um coquetel comercial, quando utilizado o bagaço de cana como biomassa (Falkoski et al., 2013).

Segundo Singhanian et al. (2013), a maioria dos fungos filamentosos produtores de celulasas são conhecidos por secretar baixos níveis de  $\beta$ -glicosidase, o que diminui a eficiência da conversão de celobiose em glicose. E ainda, enzimas recombinantes com tolerância à glicose vêm sendo desenvolvidas e utilizadas como fonte de suplementação em outras fontes de celulasas, como no coquetel do fungo *T. reesei*, por exemplo.

Dessa forma, um coquetel comercial foi utilizado no processo de hidrólise do bagaço de cana tendo o complexo de  $\beta$ -glicosidasas de *C. cubensis* como fonte de suplementação.

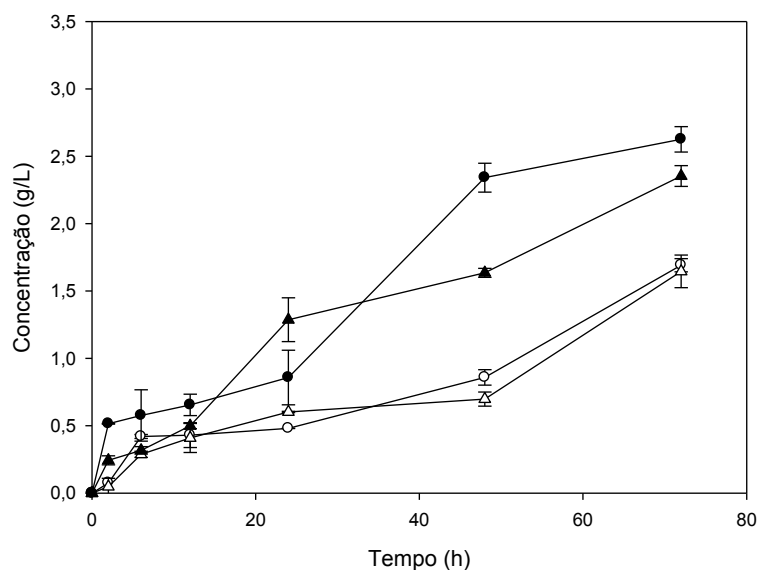


**Figura 19:** Sacarificação enzimática do bagaço de cana de açúcar após pré-tratamento alcalino usando um coquetel comercial de celulases Multifect® CL (CL) 15 FPU/g de bagaço e o mesmo coquetel suplementado com 15 U de  $\beta$ -glicosidases/g de bagaço (CLS). CL: glicose (○) e xilose (△); CLS: glicose (●) e xilose (▲).

A produção de glicose e xilose após 72 horas de sacarificação do bagaço com o coquetel Multifect® CL e do mesmo coquetel suplementado com as  $\beta$ -glicosidases de *C. cubensis* estão na figura 19.

De acordo com os resultados, pode-se perceber que a hidrólise do bagaço com o coquetel suplementado com as  $\beta$ -glicosidases de *C. cubensis* foi mais eficiente do que somente com o coquetel. A sacarificação realizada com o coquetel comercial suplementado com as  $\beta$ -glicosidases de *C. cubensis* promoveu a liberação de 2,82 g/L de glicose e 0,98 g/L de xilose ao passo que, somente com o coquetel comercial foram liberados 1,78 g/L de glicose e 0,85 g/L de xilose (Tabela 3).

Outro experimento de hidrólise do bagaço de cana de açúcar após pré-tratamento alcalino, usando o extrato de *C. cubensis* suplementado com as  $\beta$ -glicosidases, provenientes do mesmo fungo, foi realizado e os resultados estão apresentados na figura 20.



**Figura 20:** Sacarificação enzimática do bagaço de cana de açúcar após pré-tratamento alcalino usando o extrato bruto de *Chrysosporthe cubensis* LPF-1 (CC) e o mesmo extrato suplementado com  $\beta$ -glicosidases oriunda do fungo supracitado (CCS). CC: glicose (○) e xilose (△); CCS: glicose (●) e xilose (▲).

Após 72 horas, a sacarificação com o extrato do *C. cubensis* liberou 1,69 g/L de glicose e 1,64 g/L de xilose enquanto que, o extrato de *C. cubensis* suplementado com as  $\beta$ -glicosidase oriundas do mesmo fungo, promoveu a liberação de 2,62 g/L de glicose e 2,65 g/L de xilose.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se perceber que a sacarificação com os extratos de *C. cubensis* (CC) e o comercial (CL) quando suplementados com as  $\beta$ -glicosidases promoveram maior liberação dos açúcares glicose e xilose, em relação aos mesmos extratos sem suplementação. E ainda, ao analisar os produtos da hidrólise, nota-se que a sacarificação com o *C. cubensis* suplementada (CCS) foi similar em relação ao coquetel comercial suplementado (CLS), visto que, com o CCS a liberação de glicose foi de 2,62 g/L enquanto que a sacarificação com o CLS promoveu liberação de 2,82 g/L de glicose (Tabela 3).

**Tabela 3:** Liberação de glicose e xilose. Sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar com pré-tratamento alcalino, utilizando coquetel Multifect® CL e extrato bruto de *Chrysosporthe cubensis* LPF-1 e, ambos suplementados com o complexo de  $\beta$ -glicosidases do fungo supracitado.

Tratamento	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)
CL	1,78	0,85
CLS	2,82	0,98
CC	1,69	1,64
CCS	2,62	2,65

A suplementação de  $\beta$ -glicosidases no coquetel comercial Multifect® CL e no extrato de *C. cubensis* foi altamente eficiente, promovendo a liberação de cerca de 50% a mais de glicose.

Dessa forma, os resultados demonstram que as  $\beta$ -glicosidases de *C. cubensis* apresentam grande potencial para aplicação na hidrólise da biomassa, quando utilizadas como fonte de suplementação em outros extratos e coquetéis comerciais, tendo em vista a produção de etanol de segunda geração.

## 6. CONCLUSÕES

- O fungo fitopatogênico *Chrysosporthe cubensis* LPF-1 cultivado sob fermentação no estado sólido (SSF) utilizando farelo de trigo como fonte de carbono produziu um conjunto de três  $\beta$ -glicosidases,  $E_1$ ,  $E_2$  e  $E_3$ .
- Quando estimadas por SDS-PAGE, as massas moleculares das enzimas foram de 85,43 e 74,17 kDa, para  $E_2$  e  $E_3$  respectivamente, e para  $E_{1a}$ ,  $E_{1b}$  e  $E_{1c}$  foram de 63,09, 60,25 e 56,23 kDa, respectivamente.
- O complexo de  $\beta$ -glicosidases ( $E_c$ ) exibiu atividade máxima em pH 4,0 a 60 °C, estabilidade na faixa de pH de 2,0-8,0 e, alta termoestabilidade na faixa de 50 a 70 °C.
- Tempos de meia-vida calculados para  $E_c$  foram de 52 horas e 39 minutos a 50 °C e 35 horas e 30 minutos a 60 °C, enquanto que a 70 °C foi de 15,3 minutos.
- As  $\beta$ -glicosidases foram completamente inibidas na presença de  $HgCl_2$  e  $MnSO_4$ , na concentração de 10 mM.
- $E_c$  apresentou especificidade absoluta para glicose na posição  $\beta$ .
- Os valores de  $K_M$  e  $V_{max}$  foram de 0,132 mM e  $0,416 \mu M \cdot min^{-1}$  para o  $pNP\beta Glc$  e 0,782 mM e  $0,341 \mu M \cdot min^{-1}$  para a celobiose, respectivamente.
- O complexo de  $\beta$ -glicosidases apresentou inibição do tipo competitiva para a glicose com valor de  $K_i$  8,43 mM.
- A utilização das  $\beta$ -glicosidases como fonte de suplementação em outro extrato bem como em um coquetel comercial se mostrou muito eficiente no processo de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar, demonstrando que essas enzimas apresentam grande potencial para atuar na hidrólise de biomassas lignocelulósicas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, M.N.; Guimarães, V.M.; Bischoff, K.M.; Falkoski, D.L.; Pereira, O.L.; Gonçalves, D.S.P.; Rezende, S.T. (2011). Cellulases and Hemicellulases from endophytic *Acremonium* species and its application on sugarcane bagasse hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165, 594-610.

Almeida, M.N. (2013). Complexo celulolítico e hemicelulolítico do fungo endofítico *Fusarium Verticillioides* e sua aplicação para sacarificação do bagaço de cana. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa.

Barbagallo, R.N.; Spagna, G.; Palmeri, R.; Torriani, S. (2004). Assessment of  $\beta$ -glucosidase activity in selected wild strains of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 34, 292-296.

Bhatia, Y.; Misha, S.; Bisaria, V.S. (2002). Microbial  $\beta$ -Glucosidases: Cloning, Properties and Applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22, 375-407.

Blum, H., Beier, H., Gross, H. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8, 93-99.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

Brijwani, K.; Singh H. O.; Valdlani P. V. (2010). Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. *Process Biochemistry*, 45, 120-128.

Cairns, J.R.K.; Esen, A. (2010).  $\beta$ -Glucosidases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67, 3389–3405.

Choi, J. Y.; Park, A. R.; Kim, Y. J.; Kim, J. J.; Cha, C. J.; Yoon, J.J. (2011). Purification and Characterization of an Extracellular  $\beta$ -glucosidase Produced by *Phoma* sp. KCTC11825BP Isolated from Rotten Mandarin Peel. *Journal of Microbiology Biotechnology*, 21, 503-508.

Conab – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira [http://www.conab.gov.br/cana\\_3o\\_lev\\_safra\\_2010\\_2011.pdf](http://www.conab.gov.br/cana_3o_lev_safra_2010_2011.pdf) [acessado em 21.03.2011].

Costa, S.G. (2013). Purificação e caracterização bioquímica de  $\beta$ -glicosidases de *Penicillium chrysogenum* e sua aplicação na suplementação de coquetéis enzimáticos para a hidrólise de biomassas. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa.

Daenen, L.; Sterckx, F.; Delvaux, F.R.; Verachtert, H.; Derdelinckx, G. (2008). Evaluation of the glycoside hydrolase activity of a *Brettanomyces* strain on glycosides from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) used in the production of special fruit beers. *FEMS Yeast Research*, 8, 1103–1114.

Decker, C.; Visser, J.; Scheier, P. (2000).  $\beta$ -Glucosidases from Five Black *Aspergillus* Species: Estudy of Their Physico-Chemical and Biocatalytic Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4929-4936.

Ducret, A., Trani, M., Lortie, R. (2002). Screening of various glycosidases for the synthesis of octyl glucoside. *Biotechnology and Bioengineering*, 77, 752–757.

Dyk, J. S.; Pletschke, B. I. (2012). A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes – Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances*, 30, 1458-1480.

Falkoski, D. L. (2011). Enzimas lignocelulolíticas de fungos de podridão branca e fitopatógenos: produção, caracterização e aplicação em processos de sacarificação da biomassa. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa.

Falkoski, D. L.; Guimarães V. M.; Almeida M. N.; Alfenas A. C.; Colodette J. L.; Rezende S. T. (2012). Characterization of Cellulolytic Extract from *Pycnoporus sanguineus* PF-2 and Its Application in Biomass Saccharification. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 166, 1586-1603.

Falkoski, D. L.; Guimarães V. M.; Almeida M. N.; Alfenas A. C.; Colodette J. L.; Rezende S. T. (2013). *Chrysoporthe cubensis*: A new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. *Bioresource Technology*, 130, 296–305.

Geerlings A., Ibañez M.M.L., Memelinks J., Heijden R.V.D., Verpoorte R. (2000). Molecular cloning and analysis of strictosidine  $\beta$ -D-glucosidase, an enzyme in terpenol indole alkaloid biosynthesis in *Cantharanthus roseus*. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 3051–3056.

González-Pombo, P., Pérez, G., Carrau, F., Guisán, J.M., Batista-Viera, F., Brena, B.M. (2008). One-step purification and characterization of an intracellular  $\beta$ -glucosidase from *Metschnikowia pulcherrima*. *Biotechnology Letters*, 30, 1469–1475.

Gryzenhout M., Tarigan M., Clegg P. A., Wingfield M. J. (2010). *Cryptometrion aestuescens* gen. sp. nov. (Cryphonectriaceae) pathogenic to *Eucalyptus* in Indonesia. *Australasian Plant Pathology*, 39, 161–169.

Hays W.S., Jenison S.A., Yamada T., Pastuszyn A., Glew R.H. (1996). Primary structure of the  $\beta$ -glucosidase of guinea pig liver. *Biochemistry Journal*, 319, 829-37.

Hernández, L.F.; Fernández-González, M.; Briones, A. (2003).  $\beta$ -Glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *International Journal of Food Microbiology*, 80, 171-176.

Hodges C. S; Geary T. F; Cordell C. E. (1979). The occurrence of *Diaporthe cubensis* on *Eucalyptus* in Florida, Hawaii and Puerto Rico. *Plant Disease Reporter*.

Howard, R.L.; Abotsi, E.; Van Rensburg, J.E.L.; Howard, S. (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, 2, 602-619.

I-Son Ng; Chen-Wei Li; Shuang-Pi Chan; Jiun-Ly Chir; Po Ting Chen; Chii-Gong Tong; Su-May Yu; Tuan-Hua David Ho. (2010). High-level production of a thermoacidophilic  $\beta$ -glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran. *Bioresource Technology*, 101, 1310-1317.

Kara, E. H.; Sinan, S.; Turan, Y. (2011). Purification of beta-glucosidase from olive (*Olea europaea* L.) fruit tissue with specifically designed hydrophobic interaction chromatography and characterization of the purified enzyme. *Journal of Chromatography B*, 879, 1507-1512.

Khan, I.; Akhtar, M.W. (2010). The biotechnological perspective of Beta-Glucosidases. *Nature Precedings*, doi: 10.1038

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-683.

Li D.; Li X.; Dang W.; Tran P. L.; Park S. H.; Oh B. C.; Hong W. S.; Lee J. S.; Park K. H. (2013). Characterization and application of an acidophilic and thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Thermofilum pendens*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 115, 490-496.

Maitan-Alfenas, G. P.; Lage, L. G. A.; Almeida, M. N.; Visser, E. M.; Rezende, S. T.; Guimarães, V. M. (2014). Hydrolysis of soybean isoflavones by *Debaryomyces hansenii* UFV-1 immobilised cells and free  $\beta$ -glucosidase. *Food Chemistry*, 146, 429-436.

Marazza, J.A., Garro M.S., de Giori, G.S. (2009). Aglycone production by *Lactobacillus rhamnosus* CRL981 during soymilk fermentation. *Food Microbiology*, 26, 333–339.

McIlvaine, T.C. (1921). A buffer solution for colorimetric comparison. *Journal of Biological Biochemistry*, 49, 183-186.

Merwe N. A. V. D.; Gryzenhout M., Steenkamp E. T., Wingfield B. D.; Wingfield M. J. (2010). Multigene phylogenetic and population differentiation data confirm the existence of a cryptic species within *Chrysosporthe cubensis*. *Fungal biology*, 114, 966-979.

Miller, G.L. (1956). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428. Okamoto K.; Sugita Y.; Nishikori N.; Nitta Y.; Yanase H. (2011). Characterization of two acidic  $\beta$ -glucosidases and ethanol fermentation in the brown rot fungus *Fomitopsis palustris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 48, 359-364.

Pal S., Banik S.P., Ghorai S., Chowdhury S., Khowala, S. (2010). Purification and characterization of a thermostable intra-cellular  $\beta$ -glucosidase with transglycosylation properties from filamentous fungus *Termitomyces clypeatus*. *Bioresource Technology*, 101, 2412–2420.

Pei, J., Pang, Q., Zhao, L., Fan, S., Shi, H. (2012). *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* beta-glucosidase: a glucose-tolerant enzyme with high specific activity for cellobiose. *Biotechnology Biofuels*.

Ramani, G.; Meera, B.; Vanitha, C.; Rao, M.; Gunasekaran, P. (2012). Production, Purification, and Characterization of a  $\beta$ -Glucosidase of *Penicillium funiculosum* NCL1. *Applied Biochemistry Biotechnology*.

Singhania, R.R.; Sukumaran, R.K.; Patel, A.K.; Larroche, C.; Pandey, A. (2010). Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, 46, 541-549.

Singhania, R.R.; Patel, A.K.; Sukumaran, R.K.; Larroche, C.; Pandey, A. (2013). Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 127, 500-507.

Socol C. R; Vandenberghe L. P; Medeiros A. B; Karp S. G; Buckeridge M; Ramos L. P; Pitarelo A. P; Ferreira-Leitão V; Gottschalk L. M; Ferrara M. A; da Silva B. E. P; de Moraes L. M; Araújo J. de A; Torres F. A. (2010). Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresource Technology*, 101, 4820-4825.

Sternberg D.; Vijay K. P.; Reese E. T. (1977). B-Glucosidase: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. *Canadian Journal of Microbiology*, 23, 139-147.

Tate, D.; Reynolds, A.G. (2006). Validation of a rapid method for measuring  $\beta$ -glucosidase activity in fermenting Muscat grape musts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, 60–68.

Terra W.R., Ferreira C. (1994). Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 109, 1–62.

Tortora, G.J.; Funke, B.R.; Case, C.L. (2005). *Microbiologia*, 8<sup>a</sup> edição, p.804.

Wongwisansri S; Promdonkoy P; Matetaviparee P; Roongsawang N; Eurwilaichitr L; Tanapongpipat S. (2013). High-level production of thermotolerant  $\beta$ -xylosidase of *Aspergillus* sp. BCC125 in *Pichia pastoris*: characterization and its application in ethanol production. *Bioresource Technology*, 132, 410-413.

Xue, Y.; Yu, J.; Song, X. (2009). Hydrolysis of soy isoflavone glycosides by recombinant  $\beta$ -glucosidase from hyperthermophile *Thermotoga maritime*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, 1401–1408.