

MARIANA ROCHA LOPES

**IDENTIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE UMA β -GLICOSIDASE EXTRACELULAR E
CONSTRUÇÃO DE VETORES PARA EXPRESSÃO CONSTITUTIVA DE
CELULASES EM *Kluyveromyces marxianus* UFV-3**

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
2011

MARIANA ROCHA LOPES

**IDENTIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE UMA β -GLICOSIDASE EXTRACELULAR E
CONSTRUÇÃO DE VETORES PARA EXPRESSÃO CONSTITUTIVA DE
CELULASES EM *Kluyveromyces marxianus* UFV-3**

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*.

APROVADA: 21 de fevereiro de 2011.

Prof. Humberto Josué de Oliveira Ramos

Prof^a. Valéria Monteze Guimarães

Prof. Leandro Licursi de Oliveira

Prof. Luciano Gomes Fietto

(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Deus por me iluminar nos momentos de dificuldade e me guiar nesta caminhada.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela oportunidade e pelo apoio acadêmico e institucional.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Aos meus pais Valéria e Sebastião, pelo amor, dedicação e por não medirem esforços para que eu pudesse seguir sempre em frente.

Aos meus irmãos Felipe e Israel, pelo incentivo, amor e alegria de viver.

Ao Pule, pelo amor, paciência, atenção, carinho e eterna disposição em me ajudar e apoiar em todos os momentos.

Ao Professor Dr. Luciano Gomes Fietto pela orientação, apoio e amizade.

À professora Dr^a. Andréa Barros Ribon pela amizade e conselhos para o aprimoramento desde trabalho.

Aos professores Dr. Leandro Licursi e Dr. Humberto Ramos, pelas valiosas contribuições dadas para o aprimoramento deste trabalho.

Às amigas Ancély e Marina pelas valiosas críticas e sugestões.

À Aline e Zaira, pelo auxílio nos experimentos.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biotecnologia Molecular, por tornar a estadia em Viçosa mais agradável e pelo apoio em todos os experimentos: Adíverson, Ananda, Ancély, Aline, Carlos, Daiane, Dani Arruda, Dani Mendes, Felipe, Fernanda, Glauco, Héllida, Mary, Marina, Mário, Patrícia, Priscilla, Raphael, Silvana, Zaira e Zamira.

Às amigas Raquel e Isabela pelo grande incentivo, apoio nos momentos difíceis e pelos ótimos momentos de descontração.

À Marina Q. R. B. R. et al., pela ajuda no planejamento de experimentos e nas análises estatísticas.

A todos os meus amigos e familiares, pela torcida, incentivo e apoio em todas as horas.

A todos, que de alguma forma contribuíram para o meu engrandecimento profissional e pessoal.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT.....	xi
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1. Celulases.....	1
2. β -glicosidases (CE 3.2.1.21)	3
3. Inibição de celulases	4
4. Aplicações biotecnológicas	6
4.1. Processo de conversão da biomassa a etanol	7
4.2. Outras aplicações biotecnológicas para as β -glicosidases	9
5. A levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i>	10

CAPITULO I - Construção de vetores para expressão constitutiva de celulases em *Kluyveromyces marxianus* UFV-3

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Plasmídeos e micro-organismos	16
3.2. Meios de cultura e condições de cultivo	17
3.3. Obtenção, amplificação e clonagem dos gene da β -glicosidase.....	17
3.3.1. Obtenção da seqüência codificadora da β -glicosidase e desenho de primers .	17
3.3.2. Indução da produção de celulases por <i>Aspergillus niger</i>	18
3.3.3. Extração de RNA total de <i>Aspergillus niger</i>	18
3.3.4. Síntese do cDNA.....	19
3.3.5. Amplificação do gene <i>bgl1</i>	19
3.3.6. Clonagem do gene <i>bgl1</i>	19
3.4. Transformação de <i>Kluyveromyces marxianus</i> UFV-3	20
3.5. Avaliação da produção heteróloga de β -glicosidase pela levedura <i>K. marxianus</i> .	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	21
4.1. Obtenção do gene <i>bgl1</i>	21

4.2. Clonagem do gene <i>blg1</i>	22
4.3. Transformação de <i>K. marxianus</i> e obtenção dos clones.....	23
5. CONCLUSÃO.....	26

CAPITULO II - Identificação e purificação de uma β -glicosidase extracelular de *Kluyveromyces marxianus* UFV-3

1. INTRODUÇÃO	27
2. OBJETIVOS	28
2.1. Objetivo.....	28
2.2. Objetivos Específicos	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1. Micro-organismos e condições de cultivo.....	29
3.2. Ensaio enzimático.....	29
3.3. Otimização da produção de BGL extracelular	30
3.4. Produção de BGL extracelular.....	30
3.5. Determinação da temperatura e pH ótimos.....	30
3.5.1. Efeito da Temperatura	30
3.5.2. Efeito do pH	31
3.5.3. Análise da superfície de resposta	31
3.6. Estabilidade térmica	32
3.7. Hidrólise da celobiose.....	32
3.8. Purificação parcial da BGL extracelular de <i>K. marxianus</i> através de eletroforese não-desnaturante em gel de poliacrilamida.....	32
3.8.1. Eletroforese não-desnaturante (PAGE)	32
3.8.2. Zimograma	33
3.8.3. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	33
3.8.4. Coloração de proteínas por Coomassie-Blue R-250	34
3.9. Digestão trípica em gel de poliacrilamida	34
3.10. Análise por espectrometria de massas	35
3.11. Purificação da BGL extracelular através de Cromatografia Líquida (FPLC) ..	36
3.11.1. Ultra-filtração.....	36
3.11.2. Cromatografia líquida de troca iônica	36
3.12. Determinação da concentração de proteínas solúveis	37
3.13. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	37
3.13.1. Coloração de proteínas com Comassie Coloidal G-250	38
3.14. Especificidade da enzima a diferentes substratos	38

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1. Otimização da produção de BGL extracelular	39
4.2. Determinação da temperatura e pH ótimos	43
4.3. Estabilidade Térmica	47
4.4. Hidrólise da celobiose.....	48
4.5. Purificação parcial da BGL através de eletroforese não-desnaturante em gel de poliacrilamida.....	48
4.6. Análise por espectrometria de massas.....	49
4.7. Purificação parcial da BGL através de Cromatografia Líquida (FPLC)	53
4.8. Especificidade da BGL a diferentes substratos	56
5. CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

LISTA DE ABREVIATURAS

adh2p: promotor adh2

BGL: β -glicosidase

bgl1: gene da β -glicosidase de *Aspergillus niger*

DCCR: Delineamento Composto Central Rotacionado

FPLC: Fast Protein Liquid Chromatography

LBM: Laboratório de Biotecnologia Molecular

mNP α Gal: *meta*-NP- α -D-galactopiranosídeo

MS: espectrometria de massas

oNP α Gal: *orto*-NP- α -D-galactopiranosídeo

oNP β G: *orto*-NP- β -D-glicopiranosídeo

pNP: *para*-nitrofenol

pNP α Ara: *p*-NP- α -D-arabnopiranosídeo

pNP α G: *p*-NP- α -D-glicopiranosídeo

pNP α Gal: *p*-NP- α -D-galactopiranosídeo

pNP α Man: *p*-NP- α -D-manopiranosídeo

pNP β Cb: *p*-NP- β -D-celobiosídeo

pNP β G: *p*-NP- β -D-glicopiranosídeo

pNP β Gal: *p*-NP- β -D-galactopiranosídeo

pNP β Man: *p*-NP- β -D-manopiranosídeo

pNP β Xyl: *p*-NP- β -D-xilopiranosídeo

SSF: sacarificação e fermentação simultânea

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema mecanístico da hidrólise enzimática da celulose	2
Figura 2: Principais vias cinéticas de inibição das celulases pelos produtos	4
Figura 3: Esquema do vetor pKLAC1-adh2.....	16
Figura 4: <i>Primers</i> (a) <i>forward</i> e (b) <i>reverse</i> para amplificação do gene <i>bg1</i>	18
Figura 5: Fracionamento em gel de agarose (a) extração de RNA total de <i>A. niger</i> . (b) produto de amplificação a partir do cDNA total de <i>A. niger</i>	22
Figura 6: Fracionamento da digestão do pGEM-bg1 em gel de agarose	22
Figura 7: Fracionamento em gel de agarose (a) PCR de colônia de <i>E. coli</i> transformantes com pKLAC1-adh2p-bg1. (b) Clivagem dos pKLAC1-adh2p-bg1 extraídos dos clones.....	23
Figura 8: Fracionamento em gel de agarose do PCR de colônia de <i>K. marxianus</i> transformadas com pKLAC1-adh2p-bg1	24
Figura 9: Gráficos de contorno da produção esperada de BGL extracelular	42
Figura 10: Superfícies de resposta da produção esperada de BGL extracelular.	42
Figura 11: Efeito do pH na atividade enzimática	43
Figura 12: Efeito da temperatura na atividade enzimática	44
Figura 13: Gráfico de contorno para os efeitos de temperatura e pH sobre a atividade da BGL extracelular.....	46
Figura 14: Superfície de resposta para os efeitos de temperatura e pH sobre a atividade da BGL extracelular.....	46
Figura 15: Termoestabilidade da BGL extracelular a 60°C	47
Figura 16: Hidrólise da celobiose pela BGL extracelular de <i>K. marxianus</i>	48
Figura 17: (a) Zimograma (b) SDS-PAGE das proteínas eluídas do zimograma.....	49
Figura 18: Espectro de massas das proteínas 1 e 2	50
Figura 19: Espectro de massas do íon 2226	50
Figura 20: Seqüência hipotética da β -1,3-glicosidase de <i>K. lactis</i>	51
Figura 21: Resultado na análise no <i>protein blast</i> da proteína hipotética de <i>K. lactis</i> ...	52
Figura 22: Perfil cromatográfico da troca aniônica; eluição por gradiente de NaCl.....	54
Figura 23: Perfil cromatográfico da troca aniônica; eluição em passos de concentrações de NaCl	55
Figura 24: Perfil cromatográfico da troca aniônica; eluição em passos e em gradiente de concentrações de NaCl.	55
Figura 25: SDS-PAGE das amostras de cada etapa do processo de purificação.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tipos de inibição enzimática de celulasas pelos produtos	5
Tabela 2: Valores de atividade de celulase do fungo <i>Aspergillus niger</i>	21
Tabela 3: Atividade enzimática dos clones e da <i>K. marxianus</i> não transformada	25
Tabela 4: Série McIlvaine	31
Tabela 5: Reagentes para preparação do gel de poliacrilamida.	34
Tabela 6: Produção de BGL extracelular por <i>K. marxianus</i> (experimento fatorial 2 ²) ..	39
Tabela 7: Atividade da BLG em diferentes combinações de temperatura e pH.....	44
Tabela 8: Tabela da purificação parcial da BGL extracelular de <i>K. marxianus</i> UFV-3.	53
Tabela 9: Especificidade da BGL em relação a diferentes substratos cromogênicos*.	57

RESUMO

LOPES, Mariana Rocha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011.
Identificação e purificação de uma β -glicosidase extracelular e construção de vetores para expressão constitutiva de celulases em *Kluyveromyces marxianus* UFV-3. Orientador: Luciano Gomes Fietto. Co-orientadores: Flávia Maria Lopes Passos e Andréa de Oliveira Barros Ribon

Kluyveromyces marxianus é uma levedura com muitas características desejáveis para o desenvolvimento de um eficiente processo de produção de etanol a partir da sacarificação e fermentação simultâneas de biomassas: elevada taxa de crescimento, utilização de uma ampla variedade de açúcares, eficiente sistema de secreção de proteínas e a capacidade de fermentação em temperaturas próximas a 42°C. A expressão heteróloga de celulases termoestáveis em *K. marxianus* têm sido o foco de várias pesquisas. O vetor pKLAC1-adh2p, para expressão constitutiva de celulases em *K. marxianus*, foi construído no Laboratório de Biotecnologia Molecular (LBM/UFV). Neste trabalho o gene de uma β -glicosidase de *Aspegillus niger* foi clonado e inserido no pKLAC1-adh2p. O cassete de expressão, pKLAC1-adh2p-bgl1, foi utilizado para transformação de *K. marxianus* UFV-3, porém o processo de seleção não foi eficiente e, durante a triagem por leveduras transformantes, foi observada a capacidade da levedura *K. marxianus* de secretar uma β -glicosidase. Dessa forma, enquanto trabalhos de padronização de um eficiente sistema de expressão heteróloga em *K. marxianus* vêm sendo desenvolvidos no laboratório (LBM/UFV), esta β -glicosidase extracelular de *K. marxianus* foi caracterizada. A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para otimizar o processo de produção e determinar os parâmetros pH e temperatura ótimos para a atividade da β -glicosidase extracelular. As melhores condições do meio para produção foram 4% de glicose, pH 5,5 e incubação a 35°C. A maior atividade enzimática foi obtida em pH 5,5 e 55°C. Ensaios de termoestabilidade determinaram uma meia-vida de 4 horas para a enzima, quando incubada a 60°C. A análise de especificidade por substratos mostrou que a enzima foi capaz de hidrolisar celobiose, p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo, o-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo, p-nitrofenil- β -cellobiosídeo e p-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo. A enzima foi purificada por eletroforese não desnaturante em gel de poliacrilamida (PAGE) e análise de zimograma. A análise por SDS-PAGE revelou duas bandas majoritárias em torno de 45 KDa, que foram submetidas à digestão trípica em gel e analisadas por espectrometria de massas (MS/MS). A proteína foi identificada como uma β -glicosidase. Para finalizar este trabalho, a β -glicosidase foi purificada por ultra-filtração e cromatografia de troca aniônica. O processo de purificação foi

acompanhado por ensaio enzimático utilizando p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo como substrato e SDS-PAGE. Estes resultados mostram pela primeira vez uma β -glicosidase secretada por uma levedura fermentadora, isto abre a possibilidade para o uso de desta levedura para produção de etanol celulósico, já que os custos com a utilização de celulasas ainda inviabilizam economicamente o processo.

ABSTRACT

LOPES, Mariana Rocha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2011.
Identification and purification of an extracellular β -glucosidase and construction of vectors to cellulase constitutive expression in *Kluyveromyces marxianus*.
Advisor: Luciano Gomes Fietto. Co-advisors: Flávia Maria Lopes Passos and Andréa de Oliveira Barros Ribon

Kluyveromyces marxianus is a yeast with many beneficial properties for the development an efficient process for producing ethanol from simultaneous saccharification and fermentation of biomass: a high growth rate, the utilization of a wide range of sugar types, a efficient system for protein secretion and fermentation capacity at temperatures around 42 °C. The heterologous expression of thermostable cellulases in *K. marxianus* have been the focus of many researches. The vector pKLAC1-adh2p, for constitutive expression of cellulases in *K. marxianus*, was constructed at Laboratory of Molecular Biotechnology (LBM/UFV). In this study, the gene of a β -glucosidase from *Aspegillus niger* was cloned and inserted into pKLAC1-adh2p. The expression cassette, pKLAC1-adh2p-bgl1 was used for transformation of *K. marxianus* UFV-3, but the selection process was not efficient, and during screening of transformants yeasts, we observed the ability of the yeast *K. marxianus* to secrete a β -glucosidase. Thus, while works on standardization of an efficient system for heterologous expression in *K. marxianus* have been developed in laboratory (LBM/UFV), this β -glucosidase extracellular from *K. marxianus* was characterized. The response surface methodology was used to optimize the production process and determine the parameters pH and temperature for enzyme activity. The best conditions for production were glucose 4%, pH 5.5 and incubation at 35°C. The highest activity was obtained at pH 5.5 and 55°C. Thermostability tests determined a half-life of 4 hours for the enzyme, when incubated at 60 ° C. Analysis of substrate specificity showed that the enzyme was able to hydrolyze cellobiose, *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, *o*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, *p*-nitrophenyl- β -cellobioside and *p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside. The enzyme was purified by non-denaturing electrophoresis in polyacrylamide gel (PAGE) and zymogram analysis. The SDS-PAGE analysis revealed two major bands around 45 KDa, which were submitted at in-gel trypsin digestions and analyzed by mass spectrometry (MS/MS). The protein was identified as a β -glucosidase. To finish this work, the β -glucosidase was purified by ultrafiltration and anion exchange chromatography. The purification process was monitored by enzymatic assay using *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside as substrate and SDS-PAGE. These results show for the first time a β -glucosidase secreted in a

fermentative yeast, this opens the possibility to use this yeast for cellulosic ethanol production, since the costs with the use of cellulases makes the process uneconomical.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Celulases

A biodegradação de celulose por celulases e celulosomas, produzidos por inúmeros micro-organismos, é muito importante em vários processos agrícolas e de tratamento de resíduos (HAIGHT, 2005), e pode ser amplamente utilizada para produzir “bioenergia” a fim de substituir os combustíveis fósseis (REDDY e YANG, 2005). Estima-se que aproximadamente 4×10^9 toneladas de celulose sejam formadas anualmente (ARO et al., 2005). A celulose, principal componente de paredes celulares vegetais, é a biomassa mais abundante no planeta, representando uma valiosa fonte renovável de carbono que pode ser utilizada na produção de combustíveis, alimentos, entre outros produtos. Neste sentido, materiais lignocelulolíticos naturais têm sido considerados promissores devido à sua abundância, baixo custo e enorme disponibilidade potencial (LYND et al., 2002; ARO et al., 2005).

A celulose é um polímero linear constituído por resíduos de D-glicopirranose unidos por ligações glicosídicas $\beta(1-4)$, com um grau de polimerização (DP) de 100 a 20000 (ZHANG e LYND, 2004). O acoplamento de cadeias adjacentes de celulose por ligações de hidrogênio e forças da van der Waals resultam em um alinhamento paralelo e uma estrutura cristalina com fibras supramoleculares estáveis, de grande resistência à tensão e baixa acessibilidade (DEMAIN et al., 2009; ZHANG et al., 2006).

A bioconversão da celulose em monômeros de glicose necessita da ação de celulases, que formam um complexo enzimático. O mecanismo amplamente aceito para hidrólise enzimática da celulose envolve ações de sinergismo entre endoglucanases (CE 3.2.1.4), exoglucanases ou celobiohidrolases (CE 3.2.1.91), e β -glicosidases (CE 3.2.1.21) (ZHANG e LYND, 2004; WILSON, 2009). Endoglucanases hidrolisam aleatoriamente ligações glicosídicas $\beta(1-4)$ intramoleculares acessíveis em cadeias de celulose para produzir novas extremidades na cadeia; exoglucanases decompõem processivamente cadeias de celulose nas extremidades para liberar celobiose ou glicose solúveis; e β -glicosidases (BGLs) hidrolisam celobiose à glicose. Estes três processos de hidrólise ocorrem simultaneamente como mostrados na Figura 1 (ZHANG et al., 2006).

A etapa de despolimerização enzimática realizada por endoglucanases e exoglucanases é o passo limitante para todo o processo de hidrólise de celulose (JØGER et al., 2010). A hidrólise secundária que ocorre na fase líquida envolve essencialmente a hidrólise de celobiose à glicose pelas BGLs (ZHANG e LYND, 2004).

A ação dessa, além de finalizar a despolimerização, também contribui para a taxa global do processo consumindo a celobiose, que é um inibidor de endo e exoglucanases (OLSEN et al., 2010).

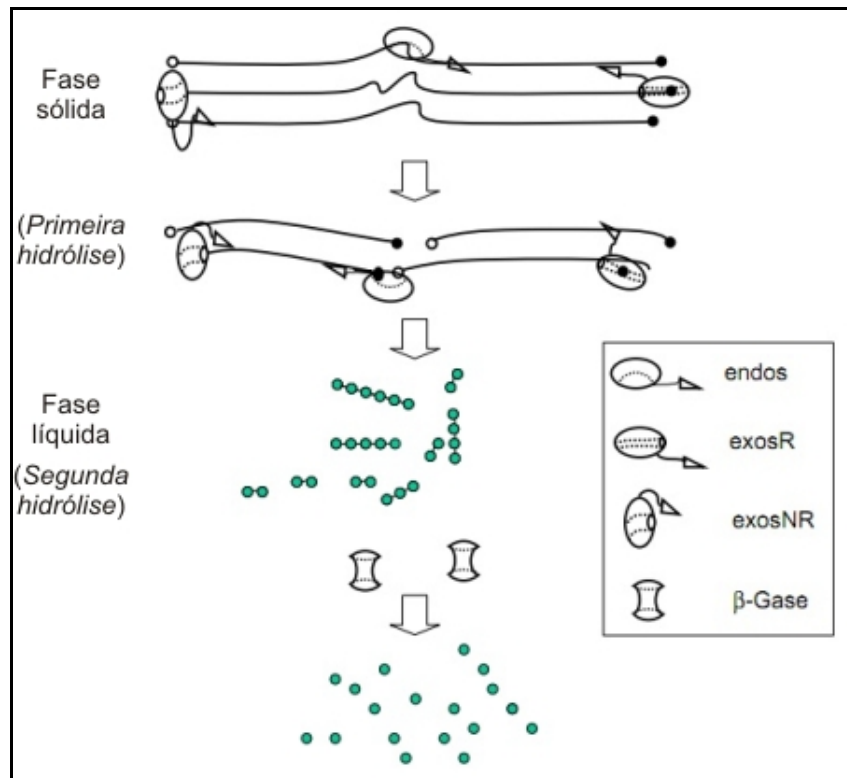


Figura 1: Esquema mecanístico da hidrólise enzimática da celulose. **endos:** endoglucanase; **exoR:** exoglucanase com ação em extremidades redutoras; **exoNR:** exoglucanase com ação em extremidades não redutoras; **β-Gase:** β-glicosidase (Adaptado de ZHANG et al., 2006).

Durante a hidrólise de celulose, as características do substrato sólido variam, incluindo (1) mudanças no número de extremidades na cadeia de celulose resultantes da ação de endoglucanases e diminuição do grau de polimerização pela ação das exoglucanases (ZHANG e LYND, 2004) e (2) mudanças na acessibilidade da celulose resultante da fragmentação da celulose e diminuição de regiões cristalinas (WALKER et al., 1990).

Micro-organismos produtores de celulasas são encontrados em diversos grupos taxonômicos, em sua maioria bactérias e fungos, desempenhando papel importante na biosfera e participando do ciclo do carbono através da reciclagem da celulose (BÉGUIN e AUBERT, 1994). Em fungos filamentosos, a capacidade de utilizar celulose é amplamente distribuída (LYND et al., 2002). As celulasas comerciais mais usadas são baseadas em complexos celulolíticos secretados pelo ascomiceto *Trichoderma reesei* (SINGHANIA et al., 2010).

2. β -glicosidases (CE 3.2.1.21)

As β -glicosidases (BGLs) são um grupo altamente heterogêneo de enzimas hidrolíticas, encontradas em diversos organismos como bactérias (GUEGUEN et al., 1997b), fungos (JOO et al., 2010), plantas (SASANUMA e HIRAKAWA, 2010) e animais (PONTOH e LOW, 2002), incluindo o homem (NEMETH et al., 2003). Tais enzimas hidrolisam ligações β -glicosídicas em dissacarídeos, oligossacarídeos e glicosídeos conjugados (BHATIA et al., 2002), sendo que a afinidade por um substrato específico depende da origem, e também da função fisiológica e da localização da enzima (WOODWARD e WISEMAN, 1982). Sob certas condições, as BGLs podem também catalisar a síntese de ligações β -glicosídicas entre diferentes moléculas, como em baixa atividade de água, alta concentração de substrato, ou na presença de nucleófilos diferentes da água (BHATIA et al., 2002).

As BGLs desempenham diversas funções *in vivo*. Em bactérias e fungos atuam na hidrólise de oligossacarídeos de cadeia curta e celobiose (BHATIA et al., 2002; ARO et al., 2005). Em plantas estão envolvidas em diferentes funções, como por exemplo, na hidrólise de precursores de hormônios (SASANUMA e HIRAKAWA, 2010). Em humanos, realizam a hidrólise de glicosilceramidas (glicocerebrosídeos) e de outros glicosídeos conjugados (GERMAIN, 2004).

As BGLs podem ser classificadas de acordo com: (1) a especificidade em relação ao substrato, ou (2) com a similaridade entre as seqüências de aminoácidos e conformação. Atualmente, o ultimo método é o mais aceito, pois pode refletir características estruturais, relações evolucionárias e o mecanismo catalítico destas enzimas (BHATIA et al., 2002).

Em alguns micro-organismos, diferentes BGLs são codificadas por genes distintos. Entretanto, formas múltiplas de uma enzima podem também originar-se através da degradação proteolítica de uma única enzima, ou através de diferentes graus de modificações pós-traducionais, como glicosilação. Fungos, por exemplo, são conhecidos por secretar diversas formas de uma mesma enzima, dependendo da linhagem e de condições ambientais (RIOU et al., 1998).

Várias metodologias de purificação têm sido desenvolvidas com o intuito de detalhar características bioquímicas de BGLs produzidas por vários fungos, devido principalmente ao fato de que esta enzima muitas vezes é um fator limitante em processos de hidrólise enzimática (KARNCHANATAT et al., 2007). BGLs intracelulares e extracelulares de diversos fungos já foram purificadas e o processo se desenvolve

com intuito de entender as características destas enzimas cada vez mais (KARNCHANATAT et al., 2007; DAROIT et al., 2008; PAL et al., 2010).

3. Inibição de celulasas

As enzimas celulolíticas são significativamente inibidas por celobiose e glicose, produtos da hidrólise. Esta inibição retarda a taxa global de conversão de celulose a glicose (GAN et al., 2002; KATZ e REESE, 1968).

Celobiose, o produto das celobiohidrolases e em parte da ação de endoglucanases, inibe diretamente estas duas classes de enzimas (Figura 2, seta 5). Glicose inibe diretamente BGLs (Figura 2, seta 3), incluindo a BGL de *Aspergillus niger* amplamente utilizada (XIAO et al., 2004), celobiohidrolases e endoglucanases (Figura 2, seta 4). Na prática, entretanto, a principal inibição pela glicose nas duas últimas é uma inibição indireta, pois a inibição por glicose da β -glicosidase pode resultar em acúmulo de celobiose (ANDRIĆ et al., 2010).

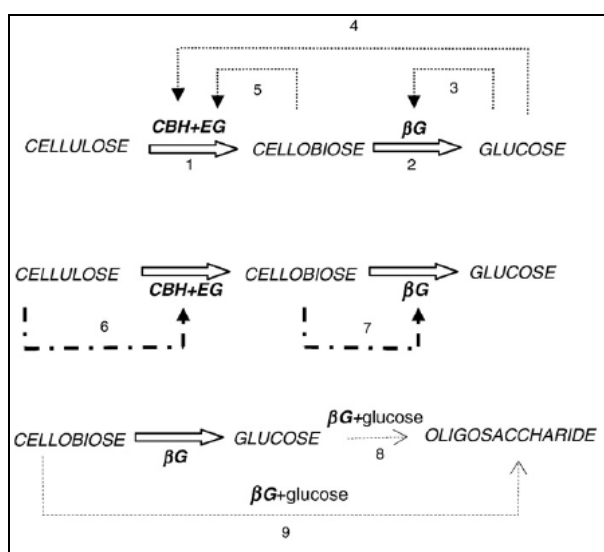


Figura 2: Inibição das celulasas: Resumo das principais vias cinéticas de inibição pelos produtos. (1, 2): reações principais de hidrólise da celulose. (3,4): inibição por glicose. (5): inibição por celobiose. (6,7): inibição pelos substratos. (8,9): reações de transglicosilação catalisadas pela β -glicosidase (ANDRIĆ et al., 2010).

Inúmeras tentativas foram feitas para entender os mecanismos experimentalmente observados de inibição pelos produtos, celobiose e glicose, em celulasas em esquemas clássicos de Michaelis-Menten (Tabela 1). Para a hidrólise enzimática da celulose foram descritos dois subtipos de sistemas de inibição parcial especiais, envolvendo reações do complexo enzima-inibidor (EI) com o inibidor ou com

o substrato (BEZERRA e DIAS, 2005), estes raros esquemas são habitualmente designadas como parabólico e hiperbólico, respectivamente (YOSHINO, 1987) (Tabela 1).

Tabela 1: Tipos de inibição enzimática. S (substrato), P (produto), E (enzima) e I (inibidor). Em relação à inibição de celulasas pelos produtos, todos os tipos da tabela já foram reportados (ANDRIĆ et al., 2010).

Common inhibition		Special inhibition	
Main reaction	$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$	Main reaction	$E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$
Type	Mechanism	Type	Mechanism
Competitive ^a	$E + I \rightleftharpoons EI$	Parabolic ^b	$E + I \rightleftharpoons EI$
Uncompetitive	$ES + I \rightleftharpoons ESI$	Hyperbolic ^b	$EI + I \rightleftharpoons EI I$
			$E + I \rightleftharpoons EI$
			$EI + S \rightleftharpoons ESI$
			$EIS \rightarrow EI + P$
			$ES + I \rightleftharpoons EIS$
Mixed ^c / Non-competitive ^d	$E + I \rightleftharpoons EI$ $ES + I \rightleftharpoons ESI$ $EI + S \rightleftharpoons ESI$	Substrate ^e	$ES + S \rightleftharpoons SES$

Uma vez que a atividade de endoglucanases e exoglucanases é fortemente inibida por celobiose, as BGLs, neste sentido, não só produzem glicose a partir de celobiose, mas também reduzem o efeito inibitório da celobiose, permitindo a maior eficiência tanto das endo quanto das exoglucanases (BÉGUIN e AUBERT, 1994; SUN e CHENG, 2002). A hidrólise eficiente da celobiose em glicose é, desta forma, crítica para a completa digestão da celulose, e as BGLs têm importante função no mecanismo de regulação da degradação enzimática da celulose podendo ser consideradas como limitantes para a hidrólise microbiana da celulose (BERGHEM e PETTERSSON, 1974; BUSTO et al., 1997; JÜGER et al., 2010).

Portanto, a inibição da atividade de BGLs, exercida pela glicose, ainda é um problema que necessita ser superado para que a hidrólise enzimática de celulose seja realizada comercialmente (WOODWARD e WISEMAN, 1982). Isto vem aumentando a procura por BGLs insensíveis à inibição pelo produto (glicose) e de alta estabilidade térmica (ZANOELO et al., 2004).

Apenas poucos micro-organismos produzem o conjunto completo de enzimas necessárias para degradar eficientemente a celulose nativa, contrastando com o maior número de espécies capazes de produzir sistemas celulasas incompletos (BÉGUIN e AUBERT, 1994). A presença de várias BGLs parece ser comum tanto entre micro-organismos celulolíticos (GUEGUEN et al., 1995) quanto entre espécies de micro-

organismos incapazes de degradar celulose (SAHA e BOTHAST, 1996). Contudo, diversos fungos celulolíticos (como linhagens de *Trichoderma reesei*, por exemplo) produzem celulasas deficientes em BGLs. Caso celulasas comerciais com esta deficiência sejam utilizadas em reatores de hidrólise, possivelmente ocorrerá o acúmulo de celobiose e celooligossacarídeos, com a conseqüente diminuição da eficiência do processo. Neste sentido, a adição (ou suplementação) de BGLs pode atuar aumentando a taxa de conversão de celulose em glicose (SHEN e XIA, 2004).

4. Aplicações biotecnológicas

Enzimas são comumente utilizadas em diversas aplicações industriais, e a demanda por enzimas mais estáveis, altamente ativas e específicas vem crescendo rapidamente, com vários produtores comerciais disponibilizando preparações enzimáticas feitas sob medida, adequadas aos interesses do consumidor (BHAT, 2000). Os principais impedimentos para a exploração comercial de enzimas são seu baixo rendimento de produção e purificação, baixa estabilidade, baixa especificidade e alto custo de produção. Desta forma, novas enzimas comercialmente importantes, com desejáveis características bioquímicas, físicas e químicas, e com baixo custo de produção vêm sendo, durante anos, o foco de pesquisas (IEMBO et al., 2002).

Micro-organismos são muito atrativos como fontes potenciais de enzimas, pois sua concentração celular pode ser potencialmente induzida ou aumentada através de diversas modificações no ambiente ou manipulações genéticas (BUSTO et al., 1995).

As celulasas, atualmente, estão entre as enzimas comerciais mais importantes em termos de economia de mercado. Com o desenvolvimento de processos industriais de sacarificação para produção de biocombustíveis, as celulasas devem subir para o primeiro lugar no ranking de mercado (WILSON, 2009).

Algumas utilizações têm sido sugeridas para biodegradação de resíduos lignocelulósicos, como matéria-prima para produção de etanol, fabricação de papel, para fazer adubo para o cultivo de cogumelos comestíveis, na alimentação animal, produção de cerveja e vinho, tratamento de esgoto, silvicultura, indústrias químicas, farmacêuticas e têxteis (BHAT et al., 2000; HOWARD et al., 2003; KIM e DALE, 2004; WEN et al., 2004; YIN et al., 2010a).

Diante do atual contexto de limitação dos combustíveis fósseis, a aplicação de celulasas no processamento da biomassa lignocelulolítica é vista como um atrativo para a produção de etanol (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006). A conversão destas matérias-primas em biocombustíveis é uma importante escolha para a exploração de fontes energéticas alternativas e redução da emissão de gases poluentes

(BHARADWAJ et al., 2011). O resíduo de lignocelulose é um produto de baixo custo e o mais abundante substrato natural renovável para conversão em biocombustíveis. O teor de celulose e hemicelulose nesta biomassa, os quais podem ser convertidos em hexoses e pentoses, representam uma alternativa sustentável, ou seja, uma fonte de energia renovável e barata para aumentar a produção de biocombustíveis com menor contribuição para o efeito estufa (DEMAIN, 2009).

Um requisito importante na eficiência de custo do processamento da biomassa lignocelulósica é empregar sistemas de reatores que irão garantir, ou mesmo promover, a conversão máxima de celulose com a mínima dosagem de enzima, uma vez que as enzimas ainda são um dos custos mais importantes em termos de processamento da lignocelulose em etanol (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006; LYND et al., 2008). Uma estratégia interessante é a suplementação de BGLs para melhorar o desempenho dos complexos celulolíticos fúngicos, que em geral tem deficiência nesse componente (ORTEGA et al., 2001).

4.1. Processo de conversão da biomassa a etanol

Os processos para obter etanol a partir de materiais lignocelulósicos baseados na hidrólise enzimática são métodos promissores para produzir biocombustíveis. Estes consistem basicamente em quatro fases: pré-tratamento, hidrólise enzimática, fermentação e destilação (TOMÁS-PEJÓ et al., 2009). O processo biológico para a conversão de lignocelulose em etanol combustível requer: deslignificação para liberar a celulose e hemicelulose a partir de seu complexo com lignina, despolimerização da celulose para produzir açúcares livres e fermentação da misturas de açúcares hexoses e pentoses para produzir etanol.

O pré-tratamento visa aumentar a dimensão dos poros e reduzir a cristalinidade da celulose, principalmente pela remoção da lignina, sendo necessário para expor as fibras de celulose às enzimas ou, pelo menos, tornar a celulose mais acessível (FUENTES et al., 2010). Por isso, uma série de métodos de pré-tratamentos termoquímicos foi desenvolvida para melhorar a digestibilidade. Esses variam de muito ácido para muito alcalino, de forma que têm efeitos diferentes sobre os principais componentes da biomassa (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006). Muito provavelmente, não haverá um método geral, devido ao fato de diferentes tipos de matérias-primas exigirem diferentes pré-tratamentos. Um eficiente pré-tratamento pode reduzir substancialmente o requerimento de enzimas celulolíticas que, como já foi dito, constitui uma grande parte do custo de produção (MOSIER et al., 2005).

A sacarificação, que compreende a segunda etapa do processo, pode ser realizada utilizando ácidos ou enzimas para a liberação de açúcares monoméricos (HAMELINCK et al., 2005). A conversão enzimática é substrato específica, sem formação de subprodutos, o que reduz a inibição das seguintes etapas do processo, demonstrando melhores resultados para a posterior fermentação, embora o processo seja mais lento (SÁNCHEZ e CARDONA, 2008).

A próxima etapa do processo é a fermentação dos açúcares liberados. A hidrólise enzimática e a fermentação podem também ser executadas em um passo combinado - chamado sacarificação e fermentação simultâneas (SSF). O processo SSF mostra índices mais atraentes do que a sacarificação e fermentação realizadas separadamente, com maior rendimento de etanol e menor consumo energético (ALFANI et al., 2000; STENBERG et al., 2000; TOMÁS-PEJÓ et al., 2009). Neste caso, as celulasas e os micro-organismos são adicionados ao mesmo processo, o que permite que as unidades de glicose formadas durante a hidrólise enzimática da celulose sejam imediatamente consumidas pelos micro-organismos, convertendo-as em etanol. Desse modo, é mantida uma concentração de glicose baixa no meio, sendo uma boa estratégia para aumentar a taxa global de conversão de celulose em etanol (HARI et al., 2001; BOLLÓK et al., 2000; STENBERG et al., 2000). No entanto, este processo não funciona em condições ideais para a hidrólise e exige maior dosagem da enzima, o que influencia positivamente na conversão do substrato, mas negativamente nos custos do processo. Considerando que as enzimas representam uma parte importante dos custos de produção, é necessário encontrar métodos para reduzir a dose de celulasas a ser utilizada (SÁNCHEZ e CARDONA, 2008).

Para a conversão enzimática de biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis em escala comercial são necessários, portanto, todos os componentes celulolíticos em níveis e condições ótimos, sendo essencial que enzimas altamente efetivas estejam disponíveis a baixos custos (ORTEGA et al., 2001). Entretanto, além da inibição pelo produto final, o alto custo de produção do complexo celulolítico, o baixo rendimento, a baixa estabilidade e a baixa especificidade impedem a exploração do potencial comercial das celulasas para este fim (KANG et al., 2004).

Desta forma, a utilização bem sucedida de materiais lignocelulósicos como fontes renováveis de carbonos depende do desenvolvimento de tecnologias economicamente praticáveis para a produção de celulasas (RYU e MANDELS, 1980). A redução do custo de produção de celulasas é, particularmente, um ponto crucial para a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos (SUN e CHENG, 2002).

4.2. Outras aplicações biotecnológicas para as β -glicosidases

Diversos estudos vêm sendo realizados visando à utilização de BGLs imobilizadas em vários suportes, com diversos propósitos, uma vez que este processo oferece vantagens em relação ao uso de enzimas não imobilizadas, como reutilização das enzimas, possibilidade de operação contínua, controle da formação do produto, processamento simples, entre outras (GUEGUEN et al., 1997a; SHEN e XIA, 2004).

As BGLs podem hidrolisar antocianinas, importantes agentes de cor encontradas em alimentos de origem vegetal (SPAGNA et al., 2000). Em uvas tintas e em mostos e vinhos derivados destas uvas, as antocianinas são os principais pigmentos (LIU, 2002). Logo, BGLs (antocianases) podem ser utilizadas na produção de vinho branco com reduzida coloração vermelha, ou na produção de vinhos rosados a partir de variedades de uvas tintas, onde o processo de maceração pode ser prolongado, e o excesso de cor removido através de tratamento enzimático. Além disso, antocianases podem ser empregadas em processos de vinificação visando prevenir a sedimentação durante a estocagem em garrafas (SÁNCHEZ-TORRES et al., 1998). Em indústrias de sucos de frutas, particularmente, BGLs são utilizadas em processos de maceração ou liquefação, participando da liberação de aromas através da hidrólise de precursores glicosilados (LE TRAON-MASSON e PELLERIN, 1998).

BGLs podem ser também utilizadas na diminuição do amargor de sucos cítricos através da hidrólise de prunina (RIOU et al., 1998); na hidrólise de compostos tóxicos (cianogênicos) presentes em vegetais utilizados em alimentação humana e animal, como na mandioca (GUEGUEN et al., 1997b); na obtenção de goma gelana de baixa viscosidade, para uso na indústria alimentícia (HASHIMOTO et al., 1998); na extração de vanilina a partir de glicovanilina em vagens de baunilha, substituindo processos microbianos tradicionais (RUIZ-TERÁN et al., 2001); além de diversas outras aplicações biotecnológicas (BHATIA et al., 2002).

A propriedade de sintetizar ligações β -glicosídicas permite que estas enzimas sejam também empregadas na síntese de vários compostos, como oligossacarídeos e glicoconjugados (YAN e LIAU, 1998). Recentemente, os oligossacarídeos estabeleceram sua condição de componentes funcionais no aperfeiçoamento do valor de alimentos. Os galactooligossacarídeos, por exemplo, são utilizados por grupos benéficos de bactérias, como as bifidobacterias. Tais oligossacarídeos são adicionados a alimentos nutritivos (iogurte, entre outros) como ingredientes funcionais para o melhoramento da microbiota intestinal (AKIYAMA et al., 2001). Quanto à síntese de glicoconjugados, os soforooligossacarídeos e gentiologossacarídeos, por sua vez, são úteis em alimentos de baixa caloria e também em produtos farmacêuticos

(BHATIA et al., 2005). A síntese enzimática destas moléculas é atraente, uma vez que a síntese tradicional, utilizando rotas químicas, é geralmente lenta e inespecífica, resultando na formação de produtos secundários indesejáveis (BHATIA et al., 2002).

Particularmente, a aplicação de BGLs requer a produção destas enzimas em larga escala, bem como o conhecimento detalhado de seus mecanismos de reação (BHATIA et al., 2002). Neste sentido, a clonagem molecular de genes codificantes para BGLs tem sido estudada não representando apenas uma poderosa ferramenta para produção de proteínas em larga escala, mas também oferecendo a possibilidade de aplicação de métodos de engenharia de proteínas na análise da atividade enzimática e no melhoramento de suas funções (LI & LEE, 1999). Técnicas de mutagênese, visando o incremento da produção de BGLs, bem como a obtenção de enzimas com características desejáveis, também vêm sendo exploradas (RAJOKA, 2005).

5. A levedura *Kluyveromyces marxianus*

As leveduras são organismos eucarióticos primitivos unicelulares bem conhecidos do ponto de vista científico e tecnológico, cujas propriedades industriais têm justificado sua potencial aplicação para produção de proteínas de interesse biotecnológico (PORRO et al., 2005).

A levedura *Kluyveromyces marxianus* é um micro-organismo de grande importância industrial, não só devido às suas aplicações tradicionais (produção de biomassa e enzimas), mas também como potencial hospedeiro para a produção de proteínas heterólogas (KIERS et al., 1998).

K. marxianus é descrito como uma levedura hemiascomiceto, homotálica, filogeneticamente relacionada a *Saccharomyces cerevisiae* e das espécies conhecidas a mais próxima é *Kluyveromyces lactis* (LACHANCE, 1998; LLORENTE et al., 2000). Esta levedura possui algumas propriedades que a tornam bastante atrativa para a sua aplicação industrial e, em especial, em processos de SSF: é capaz de crescer em uma ampla variedade de substratos, dentre esses xilose, e em altas temperaturas (NONKLANG et al., 2008), apresenta altas taxas de crescimento específico, possui ainda uma capacidade natural de secretar enzimas o que é uma propriedade desejada para a relação custo-benefício do processo industrial (FONSECA et al., 2008). E, ainda, o fato de diversas linhagens de *K. marxianus* terem obtido o status GRAS (generally-regarded-as-safe), similarmente a *S. cerevisiae* e *K. lactis* (HENSING et al., 1995) indica que este aspecto não impõe qualquer desvantagem para sua aplicação

industrial, quando comparado às outras leveduras, em termos de aprovação do processo pelas agências reguladoras.

Linhagens pertencentes à espécie de levedura *K. marxianus* têm sido isoladas a partir de uma grande variedade de habitat, o que resulta em uma alta diversidade metabólica e um substancial grau de polimorfismo intra-espécie (FONSECA et al., 2008). Como consequência, várias aplicações biotecnológicas têm sido investigadas com esta levedura. Em termos de estudos bioquímicos em enzimas de interesse industrial, *K. marxianus* tem sido usada como fonte de inulinase, β -galactosidase, β -glicosidase, poligalacturonases e outras proteínas com potenciais aplicações industriais, tais como proteínas fosfatases, carboxipeptidases, e aminopeptidases; e, ainda, na produção de compostos aromáticos, e de etanol (incluindo os de alta temperatura e processos de sacarificação e fermentação simultâneos); redução do teor de lactose em produtos alimentares; biorremediação; como um agente anticolesterolêmico, e como um hospedeiro para produção heteróloga de proteínas (FONSECA et al., 2008).

A produção de etanol em temperaturas elevadas tem recebido muita atenção. As vantagens descritas, além da economia de energia, pois mantém os custos reduzidos, foram: maiores taxas de sacarificação e fermentação, contínua remoção de etanol, e contaminação reduzida (BANAT et al., 1998). *K. marxianus* foi descrita ter a capacidade de produzir de etanol em temperaturas acima de 40°C e tem uma temperatura de crescimento máxima de 47°C (ANDERSON et al., 1986), 49°C (HUGHES et al., 1984), ou mesmo 52°C (BANAT et al., 1992). HACKING e colaboradores (1984) selecionaram linhagens de leveduras por sua capacidade de fermentar glicose a etanol em temperaturas elevadas. A tolerância de todas as espécies parecia diminuir com a temperatura, mas no geral, linhagens de *Kluyveromyces* foram mais termotolerantes que *Saccharomyces*, que por sua vez podem produzir maiores rendimentos de etanol. A conversão de xilose em etanol por *K. marxianus* também foi relatada anteriormente (MARGARITIS e BAJPAI, 1982).

OLIVA e colaboradores (2003; 2004) realizaram o estudo do efeito de compostos liberados durante o pré-tratamento da biomassa por explosão a vapor sobre *K. marxianus*, mostrando que o crescimento é mais afetado que a produção de etanol, e que este micro-organismo exibe uma importante resistência aos compostos aromáticos.

Devido a *K. marxianus* ser filogeneticamente próxima de *K. lactis*, é suposto que tenha uma capacidade semelhante de síntese e secreção de proteínas de alto peso molecular (ZHANG et al., 2003). Alguns exemplos mostrando a produção heteróloga de proteínas nesta levedura foram relatados na literatura (BERGKAMP et

al., 1993; ZHANG et al., 2003; PECOTA et al., 2007; HONG et al., 2007). Embora estes estudos demonstrem que a expressão heteróloga de proteínas em *K. marxianus* foi funcional, a capacidade dessa levedura de realizar modificações pós-traducionais, semelhante aos mamíferos, nas proteínas heterólogas ainda continua sendo investigada (FONSECA et al., 2008).

CAPITULO I

Construção de vetores para expressão constitutiva de celulases em *Kluyveromyces marxianus* UFV-3

1. INTRODUÇÃO

O grande potencial econômico e o importante papel que as celulases desempenham no emergente mercado da bioenergia comprovam a motivação em desenvolver preparações melhores dessas enzimas para hidrólise da parede celular das plantas. Porém, o custo de produção dessas enzimas torna sua utilização em biorefinarias ainda economicamente inviável. Logo, estratégias que visem redução dos custos de produção das celulases têm sido alvo de pesquisas (ZHANG et al., 2006).

As táticas propostas para diminuir o custo da conversão da biomassa são diversas e incluem: expressão heteróloga das enzimas, bioprocesso consolidado, engenharia enzimática por *designs* reacionais, aperfeiçoamento por evolução direta e obtenção de micro-organismos hospedeiros altamente produtores de celulases. Uma estratégia promissora envolve a produção das enzimas celulolíticas, hidrólise da biomassa e fermentação dos açúcares resultantes aos produtos desejados em um único passo por ação de micro-organismos celulolíticos ou engenheirados geneticamente, em um bioprocesso consolidado (CBP). Ele oferece redução de custos ao proporcionar economia de substrato e matérias primas, possibilita altas taxas de hidrólise, reduz o volume reacional e, conseqüentemente, diminui o capital de investimento na produção das enzimas (LYND et al., 2005).

A levedura *K. marxianus*, conhecida como sendo termoresistente, demonstrou alta produção de etanol a 42°C (van MARIS et al., 2006), característica que chamou a atenção de muitos grupos de pesquisa, tornando promissor o seu emprego em um bioprocesso consolidado.

Para um organismo com potencial aplicação industrial, a manipulação genética é uma das maneiras mais eficientes de aperfeiçoar o processo de produção e produtividade. A aplicação da técnica de DNA recombinante pode tornar-se um pré-requisito para um bem sucedido processo industrial, seja a fim de aumentar o título do produto ou a pureza em níveis que o processo se torne economicamente viável ou para tornar o hospedeiro capaz de sintetizar um composto heterólogo. Este tipo de atividade é conhecido como engenharia metabólica (STEPHANOPOULOS et al, 1998). A tecnologia do DNA recombinante é também uma valiosa técnica para estudos

genéticos e fisiológicos, que, por sua vez, são essenciais para aumentar a nossa compreensão sobre o potencial biotecnológico do micro-organismo.

Alguns exemplos mostrando a produção heteróloga de proteínas na levedura *K. marxianus* foram relatados na literatura (BERGKAMP et al., 1993; ZHANG et al., 2003; PECOTA et al., 2007; HONG et al., 2007). Embora estes estudos demonstrem que a expressão heteróloga de proteínas em *K. marxianus* foi funcional, a capacidade dessa levedura de realizar modificações pós-traducionais, semelhante aos mamíferos, nas proteínas heterólogas ainda continua sendo investigada (FONSECA et al., 2008).

Este trabalho teve como objetivo clonar o gene que codifica a β -glicosidase de *Aspergillus niger* (gene *bgl1*) no vetor com característica de expressão constitutiva pKLAC1-adh2p, com a finalidade de expressá-lo na levedura *Kluyveromyces marxianus*, aumentando assim, a sua capacidade de hidrolisar celobiose. E, assim, sugerir a utilização desta levedura, que já vem se mostrando bastante promissora, em processos de produção de etanol a partir de materiais lignocelulolíticos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo

Clonar o gene que codifica a β -glicosidase de *Aspergillus niger* (*bgl1*) no vetor pKLAC1-adh2p com a finalidade de expressá-lo na levedura *Kluyveromyces marxianus* UFV-3.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Molecular, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

3.1. Plasmídeos e micro-organismos

O plasmídeo pGEM®-T Easy (Promega) foi utilizado para clonagem do gene *bgI1* da enzima β -glicosidase de *A. niger*. O sítio múltiplo de clonagem localiza-se na região interna do gene LacZ que permite a triagem dos transformantes recombinantes utilizando X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactopirasideo) e IPTG (Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo).

O plasmídeo pKLAC1 (*New England Biolabs*®) modificado com a introdução do promotor do gene que codifica a enzima álcool desidrogenase *adh2* de *Saccharomyces cerevisiae*, com característica de expressão constitutiva, pKLAC1-*adh2p*, foi utilizado para clonagem do gene *bgl1* e expressão da β -glicosidase em *K. marxianus*; esse é um vetor integrativo, e contém a sequência de secreção do “alpha mating factor” de *K. lactis* (α MF), o sítio múltiplo de clonagem (MCS), e o gene *amdS*, isolado de *Aspergillus nidulans*, que codifica uma acetamidase, utilizada como marca de seleção dos transformantes (Figura 3).

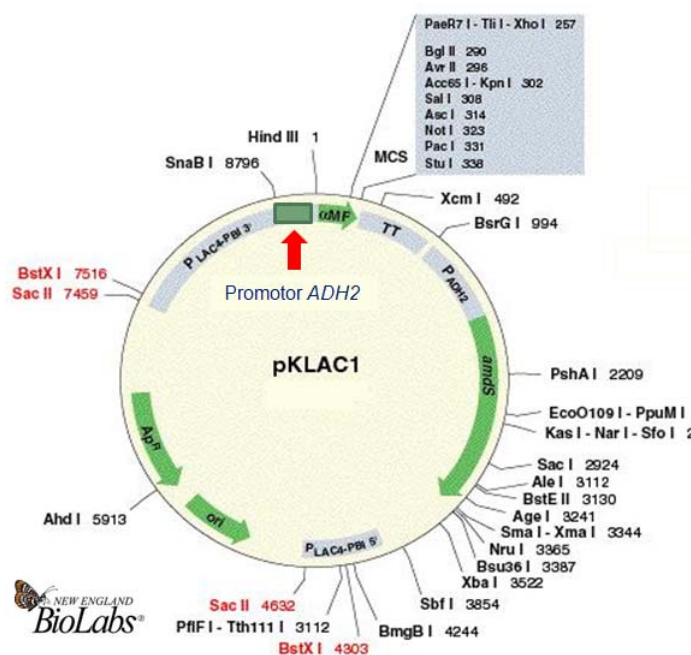


Figura 3: Esquema do vetor pKLAC1-adh2 (*New England Biolabs* - Adaptado).

O fungo *Aspergillus niger*, cedido pelo Laboratório de Genética de Microrganismos/BIOAGRO/UFV, foi utilizado como fonte do RNA para obtenção e amplificação do gene da enzima β -glicosidase.

Células de *Escherichia coli* DH5 α TM foram utilizadas para propagação dos plasmídeos utilizados neste trabalho.

A linhagem de *Kluyveromyces marxianus* UFV-3, cedida pelo Laboratório de Fisiologia de Microrganismos - BIOAGRO/UFV, foi utilizada para transformação com a construção pKLAC1-adh2p-bgl1.

3.2. Meios de cultura e condições de cultivo

O fungo *A. niger*, retirado de estoque em óleo mineral, foi ativado por incubação em meio BDA (batata-dextrose-água - VETEC) enriquecido. Para indução da produção de celulasas, os esporos ativados foram inoculados em meio salino (NH₄Cl 0,03% (p/v), NaNO₃ 0,05% (p/v), K₂HPO₄ 0,1% (p/v), MgSO₄ 0,03% (p/v), CaCl₂ 0,01% (p/v), FeCl₂ 0,005% (p/v)), acrescido de celulose microcristalina 1% (p/v) como única fonte de carbono a 28°C e 180 rpm.

Células de *Escherichia coli* DH5 α foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) (triptona 2% (p/v), extrato de levedura 1% (p/v), cloreto de sódio 1% (p/v)) sob agitação de 180 rpm a 37°C. Células transformadas com os plasmídeos pGEM[®]-T Easy e pKLAC1-adh2p, foram cultivadas sob as mesmas condições em meio LB contendo 50 μ g.mL⁻¹ de ampicilina para seleção dos transformantes e manutenção dos plasmídeos.

Leveduras *K. marxianus* foram cultivadas em meio YPD [1% (p/v) de extrato de levedura, 2% (p/v) de peptona e 2% (p/v) de dextrose] a 42°C sob agitação de 180 rpm. Para as culturas em meio sólido foram adicionados 2% (p/v) de água em meio YPD. O meio para seleção dos transformantes foi YCB (Yeast Carbon Base) água contendo 5mM de acetamida como única fonte de nitrogênio.

3.3. Obtenção, amplificação e clonagem dos gene da β -glicosidase

3.3.1. Obtenção da seqüência codificadora da β -glicosidase e desenho de primers

Através de uma análise no banco de dados GenBank, a seqüência do gene *bgl1* (EU233788.1) que codifica a enzima β -glicosidase de *A. niger* foi obtida. O

software SDSC Biology Workbench foi usado para análises dos sítios de restrições da sequência e desenho dos *primers* (Figura 4), os quais foram adicionados os sítios de restrição para as endonucleases *Xho* I e *Bgl* II, correspondentes ao sítio múltiplo de clonagem (MCS) do vetor pKLAC-adh2p.

(a) *nigerbglIF*: 5' **CTCGAG**ATGAGGTTCACTTCGATCGAGG 3'
(b) *nigerbglIR*: 5' **AGATCT**TTAGTGAACAGTAGGCAGAGACGC 3'

Figura 4: *Primers* (a) *forward* e (b) *reverse*, utilizados para amplificação *in vitro* do gene *bgl1*. As bases em vermelho representam o sítio de restrição para *Xho* I, e em azul para *Bgl* II.

3.3.2. Indução da produção de celulasas por *Aspergillus niger*

O fungo *A. niger* foi cultivado em meio indutor de produção de celulasas, meio salino + celulose microcristalina 1% (p/v) à 28° sob agitação de 180 rpm. Alíquotas foram retiradas de 24 em 24 horas para realização de *ensaios de atividade enzimática*. No ensaio foi utilizado 150 µL da amostra, tampão acetato/ácido acético 0,1M pH 4,8 e 2mM de p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo (Sigma) como substrato, a mistura de reação foi incubada à 40°C por 20 minutos. Após incubação, foi adicionado 0,5M de NaCO₃, de modo a parar a reação e formar p-nitrofenol, a partir do p-nitrofenil liberado na hidrólise, esse absorve luz na região do UV, na faixa de comprimento de onda λ = 390 - 430 nm (Zhang *et. al.*, 2006). Dessa forma, a absorvância da solução resultante foi medida em λ = 410 nm. E a partir dessa, foi calculada a atividade celulásica em função da quantidade de p-nitrofenol formado, utilizando a curva padrão de p-nitrofenol [concentração (µmol/mL) *versus* absorvância (λ = 410 nm)] (anexo I). Dessa forma confirmou-se a produção de β-glicosidase por *A. niger* e foi determinado o tempo de cultivo a ser feita a extração de RNA total. Uma unidade (U) da enzima, foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1nmol de pNPG por mL, por minuto de reação.

3.3.3. Extração de RNA total de *Aspergillus niger*

Para extração de RNA total, após o sétimo dia, a cultura de *A. niger* foi submetida à filtragem e o micélio, previamente seco, foi triturado em nitrogênio líquido. O triturado foi separado em porções de 200 mg, as quais foram submetidas a extração de RNA pelo método *Trizol Reagent* (Invitrogen).

A qualidade das amostras foi avaliada em gel de agarose 1,2% (p/v) e, o RNA foi quantificado pela leitura de absorvância a 260 nm em espectrofotômetro.

Todas as soluções, inclusive o tampão TBE e o gel de agarose 1,2%, foram preparadas com água tratada com o composto dietil pirocarbonato (DEPC) 0,1% (Sigma) para inibir ação de nucleases.

Posteriormente, as amostras foram tratadas com DNase utilizando o RQ1 RNase-free DNase (Promega), segundo recomendações do fabricante.

3.3.4. Síntese do cDNA

A síntese do cDNA foi realizada a partir do RNA total, por reação de transcrição reversa utilizando o ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega), segundo protocolo do fabricante.

3.3.5. Amplificação do gene *bgl1*

Para a amplificação do gene, o cDNA total resultante foi utilizado como *template* na reação da polimerase em cadeia (PCR) de contendo: 1 µL do cDNA, 1 unidade da enzima Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 200 µM de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂, e 20 pmoles de cada *primer* (nigerbglIF e nigerbglIR - figura 4) seguindo o programa: (i) 94°C por 2 minutos (1 ciclo); (ii) 94°C por 1 minuto, 57°C por 1 minuto e 68°C por 3 minutos (30 ciclos); (iii) 72°C por 5 minutos (1 ciclo).

O produto da amplificação foi submetido a eletroforese em gel de agarose 0,9% (p/v) em tampão TBE 1X, e analisado com o padrão de tamanho 1Kb DNA Ladder (Invitrogen) como referência. O fragmento esperado foi visualizado e purificado do gel seguindo o protocolo do kit *DNA Extraction Kit* (Fermentas),

3.3.6. Clonagem do gene *bgl1*

O fragmento purificado foi primeiro subclonado no vetor pGEM®-T Easy (Promega), segundo recomendações do fabricante. A reação de ligação foi utilizada para transformação de células *E. coli* DH5α por choque térmico e, a triagem dos transformantes foi realizada pelo cultivo em meio LB ágar contendo 40 µg.mL⁻¹ de X-gal, 200 µM de IPTG e 50 µg.mL⁻¹ de ampicilina.

O DNA plasmidial foi extraído pelo método da lise alcalina (SAMBROOK e RUSSEL, 2001) e submetido à clivagem com as enzimas de restrição *Xho* I e *Bgl* II,

para liberação do inserto *bgl*1 e confirmação da clonagem. A banda correspondente ao gene *bgl*1, visualizado em gel de agarose 0,9% (p/v), foi purificado com o *DNA Extraction Kit* (Fermentas).

O fragmento purificado foi submetido a reação de ligação com o vetor pKLAC1-*adh*2p, também clivado com *Xho* I e *Bgl* II, utilizando 1 unidade da enzima T4 DNA ligase (Promega), incubada à 4°C por 16 horas; seguida da transformação de *E. coli* DH5 α , por choque térmico. A triagem dos transformantes foi realizada pelo cultivo em meio LB ágar contendo 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina.

As colônias selecionadas foram submetidas a PCR de colônia (94°C 10'; 30 ciclos de 94°C por 1', 57°C por 1' e 68°C por 3'; 72°C por 5') e inoculadas em meio LB líquido contendo ampicilina. O DNA plasmidial foi extraído por método de lise alcalina utilizando-se fenol-clorofórmio (Sambrooke e Russel, 2001), e submetidos à clivagem com as endonucleases *Xho* I e *Bgl* II, para liberação do fragmento e confirmação da clonagem.

3.4. Transformação de *Kluyveromyces marxianus* UFV-3

O plasmídeo pKLAC-*adh*2p-*bgl*1 foi previamente linearizado com a enzima de restrição *Bst*X I, como sugerido pelo fabricante (*New England Biolabs*®). Células de *K. marxianus* UFV-3 foram transformadas por choque térmico pelo método de acetato de lítio, segundo HILL e colaboradores (1991). O método de seleção utilizado foi meio YCB contendo 5mM de acetamida como única fonte de nitrogênio. Para triagem dos transformantes foi realizado PCR, utilizando o DNA plasmidial pKLAC1-*adh*2p-*bgl*1 como controle positivo.

3.5. Avaliação da produção heteróloga de β -glicosidase pela levedura *K. marxianus*

Os clones selecionados foram incubadas em meio YPD a 42°C sob agitação de 180 rpm, por 24 horas. Após centrifugação da biomassa a 8000 rpm por de 10 minutos, o sobrenadante foi coletado para ensaio de atividade enzimática.

O ensaio de atividade foi realizado utilizando p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (Sigma) como substrato, conforme descrito anteriormente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Obtenção do gene *bgl1*

Para confirmar a produção de celulasas pelo fungo *A. niger*, e determinar o tempo de cultivo a ser feita a extração de RNA total, foi realizado ensaio de atividade enzimática para alíquotas coletadas de 24 em 24 horas. A tabela 2 apresenta os resultados de atividade do sobrenadante da cultura do fungo. Uma unidade (U) da enzima, foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1nmol de pNPG por mL, por minuto de reação.

Tabela 2: Valores de atividade de celulase do fungo *Aspergillus niger*.

Dia	Absorvância (T0) em 410nm	Absorvância em 410nm (média)	(U)
1	0,0020	0,0198	2,89
2	0,0014	0,2648	20,24
3	0,0022	0,3864	28,77
4	0,0029	0,4560	33,63
5	0,0030	1,0184	73,33
6	0,0062	0,8123	58,56

O quinto dia de crescimento do fungo mostrou uma maior atividade de celulase, portanto foi escolhido como o tempo de cultivo para coleta do micélio para a extração do RNA total. Através da análise eletroforética em gel de agarose 1,2% (p/v) foi confirmada a integridade do RNA total extraído com o aparecimento das bandas referentes ao RNA ribossomal 28S e 18S, conforme apresentado na figura 5a.

Uma vez verificada a integridade do RNA este foi utilizado para síntese do cDNA seguido de PCR, utilizando os *primers* *nigerbgl1F* e *nigerbgl1R* (Figura 4). A amplificação resultou em um fragmento entre 2000 e 3000 pb, conforme apresentado na figura 5b, compatível com o tamanho esperado para o gene *bgl1* de 2583 pb.

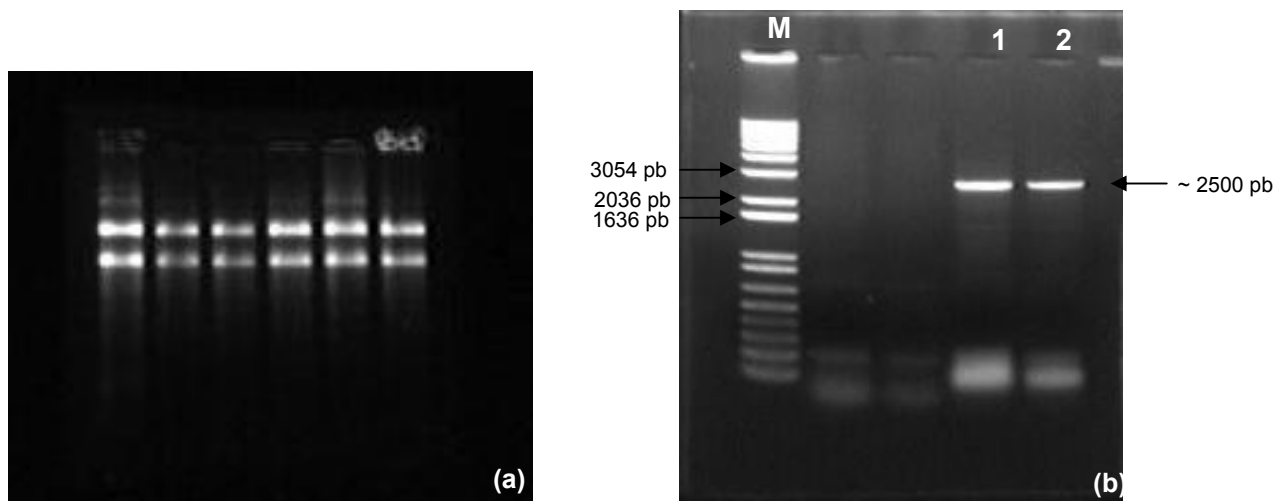


Figura 5: Fracionamento em gel de agarose **(a)** 1,2% da extração de RNA total de *A. niger*. **(b)** 0,9% do produto de amplificação a partir do cDNA total de *A. niger*. **M:** Padrão de tamanho molecular 1Kb DNA Ladder (Invitrogen). **1, 2:** Fragmento do gene *bgl1* (2500 pb) amplificado *in vitro*.

4.2. Clonagem do gene *bgl1*

O fragmento amplificado foi purificado do gel e subclonado no vetor pGEM®-T Easy (Promega), seguida da transformação em *E. coli* DH5α. Os transformantes foram selecionados em meio LB ágar contendo X-gal e ampicilina. Os plasmídeos pGEM-*bgl1* foram extraídos e submetidos à clivagem com as enzimas de restrição *Xho* I e *Bgl* II, para liberação dos fragmentos e confirmação da clonagem. Através da análise eletroforética em gel de agarose pôde-se observar os fragmentos esperados, cerca de 2500 pb para *bgl1* e cerca de 3000 pb para o pGEM, conforme mostrado na Figura 6. Confirmando, assim, a subclonagem do gene.

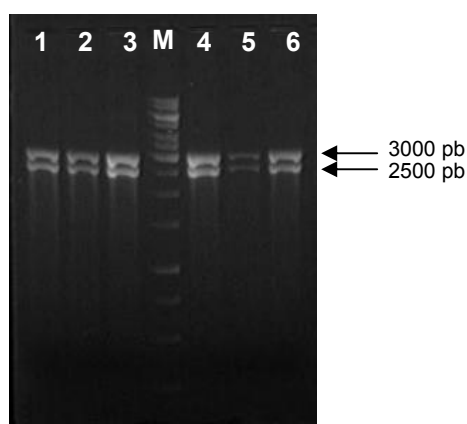


Figura 6: Fracionamento do produto da digestão do DNA plasmidial em gel de agarose 0,9%. **M:** Padrão de tamanho molecular 1 Kb DNA Ladder (Fermentas) **(1, 2, 3, 4, 5, 6):** Plasmídeos pGEM-*bgl1* extraídos de diferentes clones, clivados com as enzimas *Xho* I e *Bgl* II, mostrando a liberação dos fragmentos de 2500 pb, referente ao gene *bgl1*, e 3000 pb, referente ao pGEM.

O fragmento *bg/l1* (2500 pb) foi purificado do gel e submetido a reação de ligação com o vetor pKLAC1-*adh2p*, também clivado com as mesmas enzimas, utilizando com a enzima T4 DNA ligase (Promega). A reação de ligação foi utilizada na transformação de *E. coli* DH5 α . Os transformantes foram selecionados em meio LB ágar contendo ampicilina, e analisados por PCR de colônia, a banda esperada foi visualizada nos quatro clones selecionados (Figura 7a). A reação de clivagem dos plasmídeos extraídos, com as enzimas *Xho* I e *Bgl* II, confirmou a clonagem do gene *bg/l1* no vetor pKLAC1-*adh2p* em dois clones; uma vez que observamos as bandas de cerca de 2500 pb correspondente ao gene *bg/l1* e 9081 pb que corresponde ao pKLAC1-*adh2p* (Figura 7b). Dessa forma foi confirmada a clonagem e construção do vetor de expressão pKLAC1-*adh2p*-*bg/l1*.

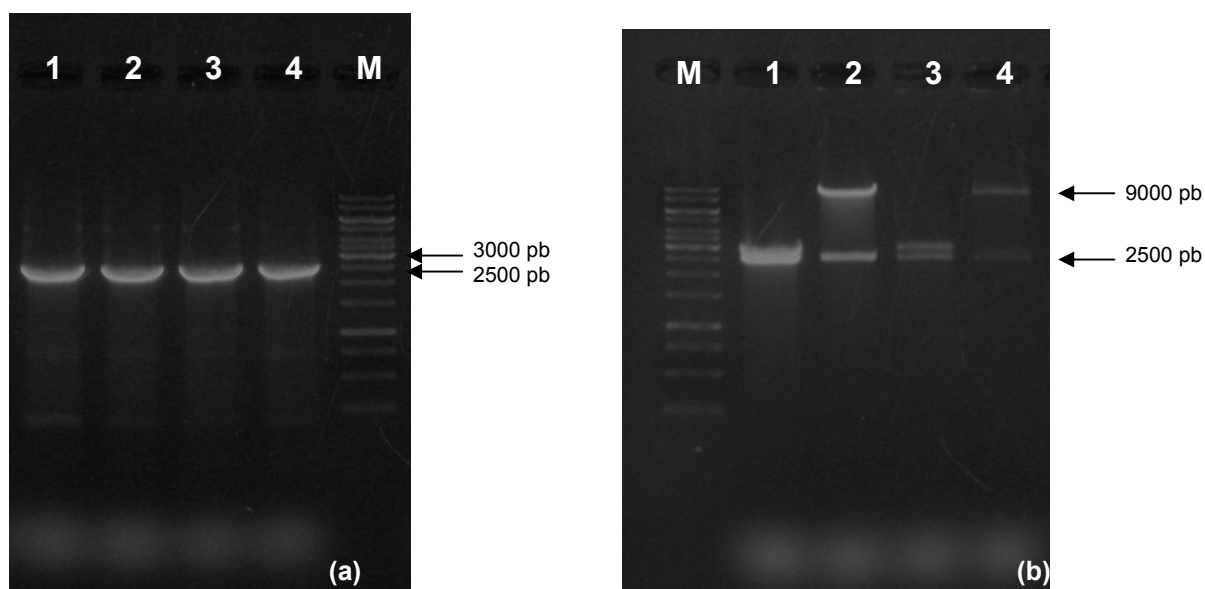


Figura 7: Fracionamento em gel de agarose 0,9%. **(a)** M: marcador de peso molecular (Fermentas) (1, 2, 3, 4): PCR de colônia de *E. coli* transformantes com pKLAC1-*adh2p*-*bg/l1*. **(b)** M: marcador de peso molecular (Fermentas) (1, 2, 3, 4): Clivagem dos pKLAC1-*adh2p*-*bg/l1* extraídos dos clones. Os clones 2 e 4 foram confirmados.

4.3. Transformação de *K. marxianus* e obtenção dos clones

O plasmídeo pKLAC1-*adh2p*-*bg/l1* foi linearizado com a enzima *Bst*X I, e utilizado para transformação de *K. marxianus* UFV-3. As células submetidas ao processo de transformação foram plaqueadas em meio YCB ágar contendo 5 mM de acetamida, para selecionar os clones. Contudo, este processo de seleção não foi eficiente, cresceu um tapete de colônias em todas as placas, inclusive a do controle de células não transformadas (dados não demonstrados). Em tentativa de isolamento de

possíveis clones, algumas colônias foram sub-cultivadas em nova placa de meio seletivo. As colônias que cresceram na nova placa foram analisadas por PCR de colônia para triagem, duas colônias apresentaram resultado positivo para amplificação do gene *bgl1* (figura 8). Estes foram denominados de clones 7 e 9.

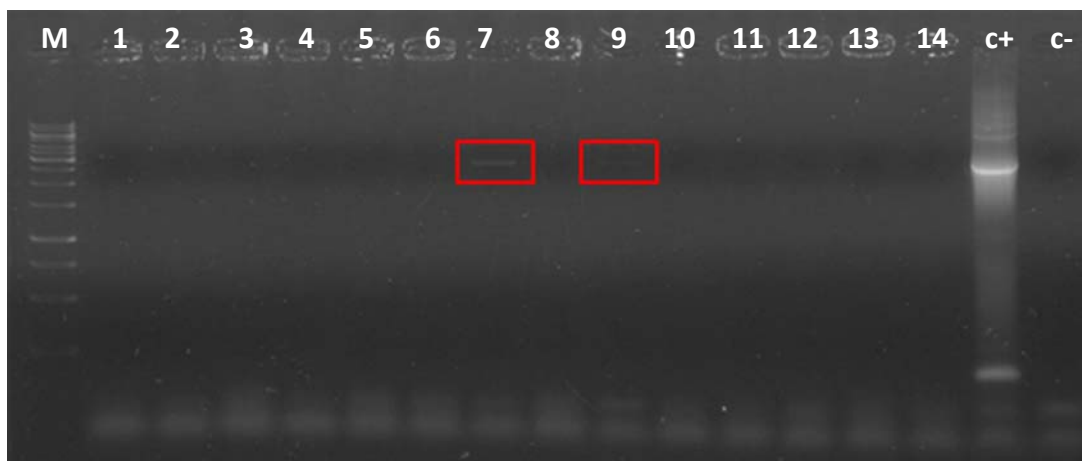


Figura 8: Fracionamento em gel de agarose 0,9% **M:** marcador de peso molecular (Fermentas) (**1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14**): PCR de colônia de *K. marxianus* transformadas com pKLAC1-adh2p-*bgl1*. **c+:** controle positivo. **c-:** controle negativo.

Os clones 7 e 9 foram inoculados em meio YPD por 16 hs para extração do DNA genômico e PCR, e para teste de atividade enzimática no sobrenadante das culturas. O resultado da amplificação foi negativo; novas reações de PCR, de colônia e com o DNA genômico como *template*, dos clones 7 e 9 foram feitas, e todas apresentaram resultado negativo. Portanto, conclui-se que as bandas observadas (figura 8) foram algum tipo de contaminação durante o preparo da reação, e as colônias selecionadas não eram clones.

O sobrenadante das culturas, clones 7 e 9, e *K. marxianus* não transformada, foram coletados para teste de atividade enzimática. Todas as amostras apresentaram atividade em pNPG como substrato, e não houve diferença entre elas (Tabela 3).

Tabela 3: Atividade enzimática apresentada pelos sobrenadantes dos clones 7 e 9, como controle negativo, foi utilizada a *K. marxianus* não transformada.

	Absorvância 410nm (média)	Atividade (U/mL)
não transformante (controle -)	0,119	5,0
clone 7	0,145	5,9
clone 9	0,116	4,9

Com este resultado, confirmou-se que estas não eram colônias transformantes, e que o processo de seleção do vetor pKLAC1 não é eficiente para *K. marxianus*.

Este experimento ainda apresentou resultados interessantes (Tabela 3), ao ser observada uma atividade de β -glicosidase no sobrenadante de culturas de *K. marxianus* UFV-3 não transformadas. Este resultado demonstra que *K. marxianus* é capaz de secretar esta enzima, característica ainda não descrita na literatura. Alguns trabalhos descrevem a capacidade de *K. marxianus* em assimilar celobiose e a presença de uma β -glicosidase da família 3 de glicosil hidrolases (GH3) nesta levedura (Raynal e Guerineau, 1984; Finn et al., 2006; Nonklang et al., 2008; Yoshida et al., 2009, 2010). A seqüência desta enzima está depositada no banco de dados de seqüências do NCBI (FJ811961.1), porém esta enzima já descrita é intracelular e não possui peptídeo sinal, o que pode ser constatado pela análise de sua seqüência no software SignalP 3. Esta observação levou, então, a realização de todo o trabalho descrito no capítulo II desta dissertação.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho, o gene da β -glicosidase de *A. niger* foi subclonado no vetor de clonagem pGEM-T-Easy e inserido no vetor de expressão pKLAC1-adh2p. Leveduras *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 foram submetidas ao processo de transformação com o vetor pKLAC1-adh2p-bgl1, mas não houve sucesso na seleção de transformantes. Este vetor contém o gene *amdS*, que codifica para uma acetamidase e confere às células transformadas a habilidade de converter a acetamida em amônia para uso como fonte de nitrogênio.

A escolha do vetor pKLAC1 para expressão foi baseada no fato de este ser um vetor integrativo e ter relatos na literatura de eficiência de obtenção de transformantes para *Kluyveromyces lactis*, uma levedura filogeneticamente relacionada com a *K. marxianus*, e devido ao fato de que a marca de seleção por acetamida presente nele já ter sido usada para transformar vários fungos filamentosos como espécies de *Aspergillus*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Trichoderma* (Read et al., 2007). Além disso, o método de seleção por acetamida seria interessante no sentido da obtenção de um organismo geneticamente transformado livre de uma marca de seleção permanente, como acontece com os métodos que se baseiam em auxotrofia.

A dificuldade em selecionar transformantes de *K. marxianus* UFV-3 com esse método pode ser explicado pelo fato de esta ser uma levedura selvagem, ainda pouco estudada e pertencente a um grupo que tem demonstrado alta diversidade metabólica e um substancial grau de polimorfismo intra-espécie. Estratégias para resolver o problema da seleção estão sendo desenvolvidas no Laboratório de Biotecnologia Molecular-DBB/UFV. Dentre essas, a construção de um novo vetor, contendo como marca de seleção o gene *kanMX* que codifica para resistência ao antibiótico geneticina (G418); e, uma alternativa a utilização de vetores, é a construção de um cassete de expressão pela técnica de PCR de fusão (Overlap PCR), que contenha promotor, gene de interesse e marca de seleção, uma vez que foi demonstrada a eficiência de transformação de *K. marxianus* utilizando DNA linear (ABDEL-BANAT et al., 2010).

CAPITULO II

Identificação e purificação de uma β -glicosidase extracelular de *Kluyveromyces marxianus* UFV-3

1. INTRODUÇÃO

A celulose é a biomassa mais abundante no planeta e representa uma valiosa fonte renovável de carbono que pode ser utilizada na produção de combustíveis, alimentos, entre outros produtos (ARO et al., 2005). A bioconversão da celulose em monômeros de glicose necessita da ação de celulasas, que formam um complexo enzimático composto por endoglucanases (CE 3.2.1.4), exoglucanases (CE 3.2.1.91), e β -glicosidases (BGLs) (CE 3.2.1.21) (ZHANG e LYND, 2004).

As BGLs microbianas têm recebido grande atenção devido à sua importância biotecnológica, podem ser aplicadas na utilização em processos de hidrólise enzimática da celulose, na liberação de compostos ricos em aroma em sucos e vinhos, liberação de compostos fenólicos com atividade antioxidante a partir de resíduos vegetais, síntese de oligossacarídeos e glicoconjugados, entre outras, despertam o interesse no estudo das BGLs (BHATIA et al., 2002).

O crescente e atual interesse nos processos de produção de etanol a partir de biomassa lignocelulolítica tem recebido grande atenção dos pesquisadores, na busca pela otimização do processo, visando torná-lo economicamente viável. Dentre os diversos trabalhos desenvolvidos, tentativas de diminuir a dosagem de enzimas necessárias têm sido o foco principal, uma vez que essas elevam significativamente o custo do processo (SUN e CHENG, 2002; SÁNCHEZ E CARDONA, 2008).

A enzima BGL, que converte celobiose em glicose, tem se mostrado um dos principais passos limitante na sacarificação de celulose. As BGLs não só determinam a taxa, mas também a amplitude da hidrólise da celulose, uma vez que alivia a inibição de endoglucanases e celobiohidrolases pela celobiose (LYND et al., 2002). Sendo assim, o uso de uma linhagem de levedura com alta atividade β -glicolítica reduziria a quantidade de celulasas adicionais necessárias e ajudaria a alcançar um processo de produção de etanol economicamente viável (SAITOH et al., 2008).

Este estudo teve como objetivos, caracterizar e identificar uma β -glicosidase secretada pela levedura *K. marxianus*, até então não descrita na literatura. E, assim, sugerir a utilização desta levedura, que já vem se mostrando bastante promissora, em processos de produção de etanol a partir de materiais linocelulolíticos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo

Identificar e purificar a β -glicosidase secretada por *K. marxianus* UFV-3.

2.2. Objetivos Específicos

- Otimizar as condições de produção da BGL extracelular por *K. marxianus* UFV-3;
- Determinar o pH e a temperatura de atuação ótima da enzima;
- Avaliar a termoestabilidade da enzima;
- Avaliar a capacidade da BGL em hidrolisar celobiose;
- Purificar a BGL extracelular;
- Analisar e identificar a BGL extracelular de *K. marxianus* por espectrometria de massas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Molecular, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.

3.1. Micro-organismos e condições de cultivo

A levedura *Kluyveromyces marxianus* UFV-3, cedida pelo Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos - BIOAGRO/UFV, foi utilizada para produção da enzima β -glicosidase.

As culturas foram mantidas em meio YPD sólido [1% (p/v) de extrato de levedura, 2% (p/v) de peptona, 2% (p/v) de dextrose e 2% (p/v) de ágar] a 4°C. Periodicamente estas culturas foram inoculadas em novas placas de meio YPD sólido, incubadas à 37°C por 18 horas e posteriormente armazenadas a 4°C.

Para produção de BGL extracelular, *K. marxianus* foi cultivada em meio YP 0,1X [0,1% (p/v) de extrato de levedura, 0,2% (p/v) de peptona] suplementado com a % de glicose e condições determinadas no experimento de otimização da produção da enzima (seção 4.1).

3.2. Ensaio enzimático

A avaliação da atividade β -glicolítica foi realizada utilizando o substrato cromogênico *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNP β G) (Sigma). A reação (1 mL) consistiu da amostra contendo atividade, tampão citrato de sódio (50 mM; pH 5,4) e 250 μ L de pNP β G 2mM. Após incubação da mistura de reação à 50°C por 40 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 1 mL de carbonato de sódio (500 mM). A estimativa da atividade enzimática foi realizada em espectrofotômetro, através da leitura de absorvância (410 nm) do *p*-nitrofenol (ϵ = 18.700) liberado; utilizando a curva padrão de *p*-nitrofenol [concentração (μ mol/mL) versus absorvância (λ = 410 nm)] (Anexo I).

Uma unidade (U) de BGL foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1nmol de pNPG por minuto de reação.

3.3. Otimização da produção de BGL extracelular

Os efeitos de diferentes fatores, pH do meio, concentração de Tween 20, concentração de glicose e temperatura de cultivo, para a produção de BGL extracelular por *K. marxianus* UFV-3 em cultivo submerso, foram avaliados através de experimento fatorial utilizando o Delineamento Composto Central Rotacionado (DCCR) ($2^4+2 \times 4+5$), com cinco repetições no ponto central, totalizando 25 combinações e 29 unidades experimentais. Cinco níveis foram propostos para cada variável independente, e a atividade extracelular de BGL foi tomada como a variável dependente. A tabela 6 (seção 4.1) mostra as variáveis independentes e seus níveis (codificados e reais), bem como a resposta (atividade enzimática) obtida. Todos os dados foram analisados com o software Minitab 15 por meio de Análise de Variância da Regressão e teste t para os coeficientes ($\alpha = 0,05$).

Os erlenmeyers contendo 50 mL de meio YP 0,1X (diluído 10 vezes), de acordo com os diferentes tratamentos (tabela 6), foram inoculados acertando a A_{600} inicial para 0,6. Após incubação por 24 horas, sob agitação orbital de 180 rpm, o sobrenadante das culturas foi coletado para os ensaios de atividade enzimática.

3.4. Produção de BGL extracelular

A produção de BGL foi realizada através do cultivo da levedura *K. marxianus* UFV-3 em meio YP 0,1X nas condições determinadas pelo experimento de otimização (seção 3.3), por 48 horas. Após centrifugação ($10.000 \times g$ por 10 minutos) da cultura, o sobrenadante foi utilizado como fonte da enzima para caracterização de alguns parâmetros da atividade β -glicolítica.

3.5. Determinação da temperatura e pH ótimos

3.5.1. Efeito da Temperatura

Para avaliar o efeito da temperatura na atividade enzimática, foram realizados ensaios enzimáticos, com o substrato pNP β G, incubando a reação nas temperaturas 28, 37, 42, 50, 55, 60, 65 e 70°C.

3.5.2. Efeito do pH

Para avaliar o efeito do pH na atividade enzimática, foram realizados ensaios enzimáticos, com o substrato pNP β G, utilizando tampão Mcllvaine (citrato/fosfato), preparado de acordo com a tabela 4, nos valores de pH de 3,0 a 7,5, em intervalos de 0,5.

Tabela 4: Série Mcllvaine obtido pela mistura de fosfato de sódio dibásico e ácido cítrico.

pH	Ácido cítrico 0,1M	Na ₂ HPO ₄ 0,2M	Volume final
3,0	7,945 mL	2,055 mL	10 mL
3,5	7,020 mL	2,980 mL	10 mL
4,0	6,145 mL	3,855 mL	10 mL
4,5	5,505 mL	4,495 mL	10 mL
5,0	4,535 mL	5,465 mL	10 mL
5,5	4,355 mL	5,645 mL	10 mL
6,0	3,685 mL	6,315 mL	10 mL
6,5	2,965 mL	7,035 mL	10 mL
7,0	1,765 mL	8,235 mL	10 mL
7,5	0,830 mL	9,170 mL	10 mL

3.5.3. Análise da superfície de resposta

Para a determinação de temperatura e pH ótimos da enzima, foi realizado experimento fatorial segundo Delineamento Composto Central Rotacionado (DCCR) ($2^2+2 \times 2+5$), com cinco repetições no ponto central, totalizando treze unidades experimentais. Cinco níveis foram propostos para cada variável independente (temperatura e pH), e a atividade β -glicolítica foi tomada como variável dependente. A tabela 7 (seção 4.2) mostra as variáveis independentes e seus níveis (codificados e reais). Os dados obtidos foram analisados utilizando o software Minitab 15 por meio de Análise de Variância da Regressão e teste t para os coeficientes ($\alpha = 0,05$).

As condições de temperatura e pH ótimos, determinadas por este experimento, foram utilizadas em todos os ensaios enzimáticos seguintes.

3.6. Estabilidade térmica

Para determinação da termoestabilidade da enzima, o extrato enzimático foi incubado previamente a 60°C por 30 horas e alíquotas foram retiradas a cada 2 horas para serem utilizadas no ensaio enzimático. A atividade residual da enzima nestes testes foi expressa como porcentagem da atividade enzimática apresentada no tempo zero (controle). Para o cálculo do tempo de meia-vida da enzima foi utilizada a equação da reta, obtida através do gráfico semi-logarítmico da atividade residual (%) *versus* tempo de pré-incubação (horas) (Anexo II).

3.7. Hidrólise da celobiose

Para testar atividade da BGL na hidrólise de celobiose, o extrato enzimático foi incubado com celobiose (100 mM) em tampão citrato de sódio (50 mM; pH 5,5), à 55°C por 30 horas e a cada 6 horas alíquotas foram retiradas e fervidas por 5 minutos para inativar a enzima e parar a reação. A quantidade de glicose (g/L) liberada em cada tempo de reação (alíquotas coletadas) foi mensurada utilizando o Kit de dosagem de glicose *Glucose (HK) Assay Kit* (Sigma), seguindo as recomendações do fabricante.

3.8. Purificação parcial da BGL extracelular de *K. marxianus* através de eletroforese não-desnaturante em gel de poliacrilamida

3.8.1. Eletroforese não-desnaturante (PAGE)

A eletroforese não-desnaturante (PAGE) foi utilizada visando à posterior observação da atividade β -glicolítica no gel através de zimograma.

A eletroforese foi feita usando-se um gel de poliacrilamida a 6% de acordo com o método descrito por LAEMMLI (1970), substituindo-se o dodecil sulfato de sódio (SDS) por triton-X-100 0,1% (v/v) e deoxicolato de sódio 0,1% (v/v), no gel e no tampão de corrida. O gel de separação (Tris-HCl 0,375 M, pH 8,0; acrilamida-bis 6% (30:0,8); triton-X-100 0,1%; deoxicolato de sódio 0,1%; persulfato de amônio 0,05% e TEMED 0,05%) foi montado entre placas de 8 x 15 cm, com espaçadores de 1,0 mm de espessura. O gel de empilhamento (Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8; acrilamida-bis 4% (30:0,8); triton-X-100 0,1%; deoxicolato de sódio 0,1%; persulfato de amônio 0,05% e TEMED 0,1%) foi montado com a inserção de pente com o número de poços adequados para aplicação das amostras. O tampão de corrida, pH 8,0, continha Tris-

base 3 g/L; glicina 14,4 g/L; triton-X-100 0,1% e deoxicolato de sódio 0,1%. Não foi usado padrão de peso molecular.

O extrato enzimático foi concentrado 20 vezes por ultra-filtração em Coluna Vivaspin 10 KDa MWCO (GE Healthcare), de acordo com recomendações do fabricante. Alíquotas de 15 µL do extrato enzimático concentrado foram solubilizadas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8; triton-X-100 0,2%; deoxicolato de sódio 0,4% e glicerol 10%) e submetidas à eletroforese por aproximadamente 240 minutos a 40 Volts, à 4°C (em cuba de eletroforese BioRad, modelo Mini-Protein II Cell). O corante azul de bromofenol (0,05%) foi adicionado ao tampão de amostra sem proteínas e foi aplicado em um poço do gel como controle da corrida eletroforética, que foi interrompida após a saída do corante.

3.8.2. Zimograma

Após a corrida, o gel foi lavado por 15 minutos (sem agitação) em tampão citrato de sódio (50 mM; pH 4,8) para retirada do tampão de corrida. Após a lavagem, seguindo o protocolo baseado em Pandey e Mishra (1995), o gel foi mergulhado em placas de Petri contendo tampão citrato de sódio (50 mM; pH 5,5) e pNPβG (2 mM), e incubado por 30 minutos à 50°C, sem agitação. Após este período, solução de carbonato de sódio (500 mM) foi adicionada, visando parar a reação e visualizar banda(s) de coloração amarela.

A banda visualizada foi cortada, dividida em pedaços menores (1 mm²) e, para ser eluída do gel, incubada em água destilada a temperatura ambiente por 16 horas. A amostra eluída foi concentrada em coluna Vivaspin 10 KDa MWCO (GE Healthcare), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.8.3. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As proteínas eluídas do gel foram analisadas por SDS-PAGE. O tampão de amostra 4X (Glicerol 30% [v/v]; SDS 9,2% [p/v]; azul de bromofenol 1% [p/v]; β-mercaptoetanol 20% [v/v]; Tris-HCl 1,0M pH 6,8) foi adicionado a amostra protéica e incubado a 100°C por 5 minutos. As amostras foram então aplicadas em gel de poliacrilamida 10% contendo SDS. O protocolo utilizado na preparação do gel está detalhado na tabela 5. No gel também foi aplicado o marcador de peso molecular (SDS-PAGE Standards, Broad Range – Bio Rad) que apresenta proteínas na faixa de 6,5 a 200 KDa. A separação de proteínas foi realizada através de aplicação de campo

elétrico (100 V), e as bandas foram visualizadas pelo método de coloração por Coomassie Blue R-250.

Tabela 5: Reagentes, com as respectivas quantidades, utilizados na preparação do gel de poliacrilamida.

Reagente	Gel de separação (10%)	Gel de empilhamento (5%)
Água	1,630 mL	0,855 mL
Acrilamida / Bisacrilamida 30% (29,2 : 0,8)	1,666 mL	0,255 mL
Tampão Tris 1,5 M / SDS 0,4% (p/v) pH 8,8	1,650 mL	_____
Tampão Tris 0,5 M / SDS 0,4% (p/v) pH 6,8	_____	0,390 mL
PA 10%	0,05 mL	0,0075 mL
TEMED	0,004 mL	0,0015 mL

3.8.4. Coloração de proteínas por Coomassie-Blue R-250

O gel de SDS-PAGE foi incubado em solução corante contendo ácido acético glacial 9% (v/v); metanol 45% (v/v) e coomassie-Blue R-250 0,1% (p/v) por cerca de 4 horas. Posteriormente, o gel foi lavado com água e incubado em solução descorante contendo ácido acético 7,5% (v/v) e metanol 25% (v/v) até a revelação das bandas. Ambas as etapas foram realizadas à temperatura ambiente e sob agitação branda.

3.9. Digestão trípica em gel de poliacrilamida

Para posterior análise no espectrômetro de massas, as bandas do gel foram previamente cortadas e descoradas em solução de acetonitrila 50% em bicarbonato de amônio 25 mM, pH 8,8. Esta solução descorante foi trocada regularmente, agitando no vortex, antes e depois, até os géis ficarem completamente descorados. Após o descorante ser removido, os géis foram desidratados 2 vezes com acetonitrila 100%, ficando branco/opaco, e seco em centrifuga a vácuo. As proteínas contidas nas bandas removidas do gel foram reduzidas com DTT (ditiotreitól) 65 mM em bicarbonato de amônio 100 mM por 30 minutos, a 56°C em banho-maria. O DTT foi removido e as proteínas foram alquiladas com Iodoacetamida 200 mM em bicarbonato de amônio 100 mM, por 30 minutos, a temperatura ambiente, no escuro. Após serem lavados com bicarbonato de amônio 100 mM, por 10 minutos, os géis

foram desidratados com acetonitrila 100% por 5 minutos e, posteriormente, reidratados com bicarbonato de amônio 100 mM por 10 minutos. Os géis foram novamente desidratados com acetonitrila 100%, 2 vezes de 5 minutos, e secos na centrífuga a vácuo. Para tripsinização das proteínas, foi adicionada aos géis uma solução contendo tripsina (Trypsin Gold Mass – Promega) 25 ng/μL em bicarbonato de amônio 40 mM e acetonitrila 10%, e mantido no gelo por 45 minutos para a tripsina penetrar no gel sem que se inicie a digestão. Foi adicionada mais solução de bicarbonato de amônio 40 mM e acetonitrila 10% de forma a cobrir os pedaços de gel. A reação foi incubada a 37°C por 16 horas. Em seguida, o gel foi sonicado em ultrassom por 20 minutos, e após agitação no vortex por 20 segundos, a solução com os peptídeos foi removida para outro microtubo. Ao gel restante foi adicionado ácido fórmico 5% em acetonitrila 50%, seguido de agitação por 20 segundos no vortex e repouso por 15 minutos em temperatura ambiente. O gel foi sonicado por 2 minutos, agitado em vortex e a solução removida para o microtubo anterior. Este procedimento foi repetido 2 vezes. A amostra removida para o outro microtubo foi seca em centrífuga a vácuo. Os peptídeos foram estocados em freezer (- 20°C) para posterior análise por espectrometria de massas.

3.10. Análise por espectrometria de massas

A análise dos peptídeos por espectrometria de massas foi realizada no Núcleo de Análises de Biomoléculas (NuBioMol)/CCB/UFV, utilizando MALDI-TOF-TOF (Bruker Daltonics). Os peptídeos tripticos foram solubilizados em 20 μL de acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% para análises por MALDI. Uma alíquota de 1,0 μL da digestão triptica foi misturada a 1,0 μL da matriz ácido alfa-*ciano*-4-hidroxicinâmico e 0,5 μL foi aplicado em placa de MALDI. Os espectros de massas tripticas foram obtidos em modo refletivo positivo e a fragmentação por meio do método do LIFT. Os espectros de massas foram processados usando o software FlexAnalysis (Bruker). As listas de picos monoisotópicos obtidas foram utilizadas para pesquisas contra banco de dados de proteínas pelo método de “Peptide Mass Fingerprinting” utilizando o banco de dados NCBI por meio do pacote computacional MASCOT, rodando em plataforma local. Os espectros de fragmentação MS/MS foram utilizados para identificação das seqüências de aminoácidos dos peptídeos por meio do método “MS/MS íon search”, utilizando-se o MASCOT. As seqüências obtidas foram confirmadas por inspeção visual dos fragmentos de massas utilizando-se o software FlexiAnalysis. A seqüência de aminoácidos obtida foi utilizada para pesquisa no banco de dados NCBI, utilizando o pacote computacional *MASCOT search*.

3.11. Purificação da BGL extracelular através de Cromatografia Líquida (FPLC)

Para purificação utilizando FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography), a enzima extracelular foi obtida através do cultivo da levedura *K. marxianus* UFV-3 nas condições determinadas pelo experimento de otimização (seção 3.3). O inóculo foi realizado de modo que a A_{600} inicial estivesse 0,8. Após 48 horas de incubação a cultura foi centrifugada (10.000 x g por 10 minutos) e o sobrenadante coletado, denominado extrato bruto, foi utilizado como fonte da enzima para as subseqüentes etapas de purificação.

3.11.1. Ultra-filtração

O extrato bruto foi primeiramente concentrado por ultra-filtração, utilizando Coluna Vivaspin 10 KDa MWCO (GE Healthcare), a 4500 rpm até a concentração final de 10% (v/v). Para o extrato bruto concentrado foram realizados o ensaio enzimático bem como a determinação de proteínas solúveis totais.

3.11.2. Cromatografia líquida de troca iônica

- **Passo 1**

Uma alíquota do extrato bruto concentrado, com valor de pH previamente ajustado para 7,0, foi aplicado na coluna de cromatografia líquida de troca aniônica HiTrap Capto Q (GE Healthcare) de 1 mL, previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0. O fluxo foi ajustado para 1,0 mL/minuto. As proteínas foram eluídas com gradiente crescente de NaCl, de 0 a 1 M, e coletadas em frações de 1mL. As frações foram analisadas por ensaio enzimático para determinar a concentração de NaCl na qual a proteína de interesse estava sendo eluída.

- **Passo 2**

O extrato bruto concentrado, com valor de pH previamente ajustado para 7,0, foi aplicado na coluna de cromatografia líquida de troca aniônica HiTrap Capto Q (GE Healthcare) de 1 mL, previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio pH 7,0 / 50 mM. O fluxo foi ajustado para 1,0 mL/minuto. A eluição foi realizada em passos, nas concentrações 100 mM, 200 mM, 400 mM e 1 M de NaCl, e em cada passo frações de 15 mL foram coletadas. Foi realizado o ensaio enzimático para cada fração. A fração contendo atividade foi separada e determinada a concentração de proteínas solúveis totais.

- Passo 3

À fração da etapa anterior foi adicionado 50 mL de tampão fosfato de sódio pH 7,0 / 50 mM e, para retirada do NaCl, foi feita ultra-filtração em Coluna Vivaspin 10 KDa MWCO (GE Healthcare). A amostra foi então re-cromatografada na Coluna HiTrap Capto Q (GE Healthcare). A eluição com NaCl foi realizada em um passo inicial de 100 mM, seguida por um gradiente crescente de 100 a 200 mM, e dois passos finais de 200 mM e 1 M. Frações de 1 mL foram coletadas e analisadas por ensaio enzimático. As amostras contendo atividade foram unidas e concentradas em Coluna Vivaspin 10 KDa MWCO (GE Healthcare), sendo realizados o ensaio enzimático e a determinação de proteínas solúveis totais.

3.12. Determinação da concentração de proteínas solúveis

A determinação da concentração de proteína solúvel nas diferentes etapas de purificação foi realizada através do método BCA - Ácido Bicinconínico (Smith et al., 1985). Este método monitora os íons cobre monovalentes produzidos na reação de proteínas com cobre bivalente, em meio alcalino, pela formação de um complexo colorido com BCA, que absorve luz a 562 nm.

A concentração de proteína foi determinada através da curva padrão preparada com albumina sérica bovina (BSA) (Anexo III).

3.13. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Após a purificação do extrato bruto de *K. marxianus* UFV-3, o padrão protéico foi analisado por SDS-PAGE. O tampão de amostra 4X (Glicerol 30% [v/v]; SDS 9,2% [p/v]; Azul de bromofenol 1% [p/v]; β -mercaptoetanol 20% [v/v]; Tris-HCl 1,0M pH 6,8) foi adicionado a 10 μ g de proteínas de cada amostra, e incubado a 100°C por 5 minutos. As amostras foram então aplicadas em gel de poliacrilamida 10% contendo SDS (Tabela 5). No gel também foi aplicado o marcador de peso molecular (SDS-PAGE Standards, Broad Range – Bio Rad) que apresenta proteínas na faixa de 6,5 a 200 kDa. A separação de proteínas foi realizada através de aplicação de campo elétrico (100 V) e a observação das bandas foi possível após coloração com Comassie Coloidal G-250.

3.13.1. Coloração de proteínas com Comassie Coloidal G-250

O gel de SDS-PAGE foi submetido à fixação de proteínas em metanol 50% (v/v) e ácido fosfórico 2% (v/v) por duas vezes de 30 minutos. Em seguida, o gel foi incubado com solução de ácido fosfórico 2% (p/v) por mais duas vezes de 20 minutos e, fixado por 30 minutos em solução de ácido fosfórico 2% (v/v), metanol 18% (v/v) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 15% (p/v). Posteriormente, foi adicionado, à solução anterior, 1% (v/v) de solução de Comassie Coloidal G-250 2% (p/v). Para o desenvolvimento da coloração das bandas, o gel foi incubado pelo tempo necessário à visualização das bandas protéicas. Todas as etapas foram realizadas à temperatura ambiente e sob agitação branda.

3.14. Especificidade da enzima a diferentes substratos

Para determinação da atividade sobre substratos cromogênicos (contendo pNP), a reação enzimática foi feita da mesma forma como descrito anteriormente (seção 3.2), somente variando os substratos (Tabela 9 – seção 4.8), nas condições ótimas de temperatura e pH.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Otimização da produção de BGL extracelular

As técnicas de planejamento fatorial e superfície de resposta, reunidas na chamada Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), são estratégias experimentais eficientes para obtenção de condições ótimas em sistemas de múltiplas variáveis (KALIL et al., 2000). Tais técnicas vêm sendo empregadas com êxito em diversas áreas da biotecnologia, principalmente na otimização de meios de cultivo para produção de enzimas (BARBOSA et al., 2010; YIN et al., 2010b), mas também na otimização de condições para a atividade de diversas enzimas (DAIROT et al., 2008; FUENTES et al., 2010). Dessa forma, utilizamos destas técnicas para estimar a equação que relacionasse a resposta produção de BGL com os fatores controláveis pH, temperatura, Tween 20 e glicose, a fim de otimizar a produção de BGL extracelular por *K. marxianus* UFV-3. A tabela 6 mostra os fatores, temperatura, pH, Tween 20 e Glicose, seus níveis codificados e reais, bem como as respostas, atividade enzimática, em cada tratamento, representando a produção de BGL. O intervalo de valores a serem testados para cada fator, foram determinados com base na literatura, para o Tween 20, bem como a partir de resultados experimentais obtidos previamente em nosso laboratório (LBM/UFV).

Tabela 6: Produção de BGL extracelular por *K. marxianus* utilizando diferentes combinações de temperatura, pH, Tween 20 e Glicose.

Tratamento	Variáveis independentes*				Atividade enzimática** U.mL ⁻¹
	Temperatura °C	pH	Tween 20 %	Glicose %	
1	31,5 (-1)	4,75 (-1)	0,05 (-1)	3 (-1)	5,23
2	38,5 (+1)	4,75 (-1)	0,05 (-1)	3 (-1)	7,04
3	31,5 (-1)	6,25 (+1)	0,05 (-1)	3 (-1)	4,10
4	38,5 (+1)	6,25 (+1)	0,05 (-1)	3 (-1)	2,73
5	31,5 (-1)	4,75 (-1)	0,15 (+1)	3 (-1)	5,13
6	38,5 (+1)	4,75 (-1)	0,15 (+1)	3 (-1)	6,68
7	31,5 (-1)	6,25 (+1)	0,15 (+1)	3 (-1)	4,43
8	38,5 (+1)	6,25 (+1)	0,15 (+1)	3 (-1)	2,81
9	31,5 (-1)	4,75 (-1)	0,05 (-1)	5 (+1)	4,22

10	38,5 (+1)	4,75 (-1)	0,05 (-1)	5 (+1)	7,68
11	31,5 (-1)	6,25 (+1)	0,05 (-1)	5 (+1)	6,46
12	38,5 (+1)	6,25 (+1)	0,05 (-1)	5 (+1)	5,39
13	31,5 (-1)	4,75 (-1)	0,15 (+1)	5 (+1)	4,31
14	38,5 (+1)	4,75 (-1)	0,15 (+1)	5 (+1)	6,92
15	31,5 (-1)	6,25 (+1)	0,15 (+1)	5 (+1)	4,87
17	28 (-α)	5,5 (0)	0,1 (0)	4 (0)	6,11
18	42 (+α)	5,5 (0)	0,1 (0)	4 (0)	5,12
19	35 (0)	4,0 (-α)	0,1 (0)	4 (0)	3,21
20	35 (0)	7,0 (+α)	0,1 (0)	4 (0)	5,11
21	35 (0)	5,5 (0)	0 (-α)	4 (0)	13,45
22	35 (0)	5,5 (0)	0,2 (+α)	4 (0)	10,76
23	35 (0)	5,5 (0)	0,1 (0)	2 (-α)	8,36
24	35 (0)	5,5 (0)	0,1 (0)	6 (+α)	10,55
25	35 (0)	5,5 (0)	0,1 (0)	4 (0)	10,75
26	35 (0)	5,5 (0)	0,1 (0)	4 (0)	11,41
27	35 (0)	5,5 (0)	0,1 (0)	4 (0)	11,37
28	35 (0)	5,5 (0)	0,1 (0)	4 (0)	11,10
29	35 (0)	5,5 (0)	0,1 (0)	4 (0)	10,99

* São apresentados os valores reais e codificados (entre parênteses) para as variáveis independentes temperatura, pH do meio, Tween 20 e glicose.

** Variável independente.

A partir da análise de regressão dos dados experimentais obtidos, foi gerado o modelo expresso pela equação (1):

$$AE = - 295,92 + 10,1661 T + 41,3599 P + 6,99310 G - 0,144369 T^2 - 3,79071 P^2 - 0,808376 G^2 \quad (1)$$

Onde *AE* corresponde à atividade enzimática (U), *T* à temperatura, *P* ao pH do meio, e *G* à concentração de glicose, em valores não codificados. Os termos dos efeitos lineares e quadráticos da concentração de Tween 20, e os termos dos efeitos das

interações entre os fatores experimentais, foram descartados por não apresentarem significância segundo teste t ($\alpha = 0,05$).

A análise deste modelo foi realizada por análise de variância (ANOVA) (Anexo IV) e demonstrou um valor de $p < 0,05$ ($p = 0,000$), indicando que o modelo foi significativo. O valor R^2 indica que 73,53% da variação foi explicada pelo modelo. Assim, a variação considerada pelo modelo é significativamente maior do que possíveis variações ao acaso. Este modelo ainda não possui um ajuste que permita estimar a produção de BGL extracelular a partir de determinadas combinações dos fatores, mas fornece uma boa indicação das relações existentes entre os fatores e entre os fatores e a variável resposta.

O gráfico de contorno e a superfície de resposta, gerados a partir dos dados obtidos, são apresentados nas Figuras 9 e 10. A produção máxima de BGL extracelular foi observada no intervalo de temperaturas entre 32,5 e 37,5°C, nas concentrações de glicose entre 3,5 e 5,5% e, nos valores de pHs entre 5,0 e 6,0; abrangendo o ponto central do experimento (35°C, 4% de glicose e pH 5,5). Desta forma, a combinação de condições, temperatura, concentração de glicose e pH do meio, próximas ao ponto central foram consideradas ótimas para produção da BGL extracelular de *K. marxianus* UFV-3. Pode-se observar a existência de uma faixa ótima, ou seja, várias combinações dos fatores nesta faixa podem ser utilizadas de modo a fornecer o mesmo resultado, o que permite a escolha de níveis mais econômicos dos fatores de interesse.

Os coeficientes e o teste T para os mesmos estão apresentados no Anexo V. A análise destes coeficientes codificados (anexo V) nos permite concluir que o pH é o fator que exerce a maior influência sobre a produção da BGL extracelular por *K. marxianus*, seguido pela temperatura de cultivo e, com uma menor contribuição, está concentração de glicose. Esta interpretação também pode ser observada analisando as curvas de superfície de resposta (Figura 10).

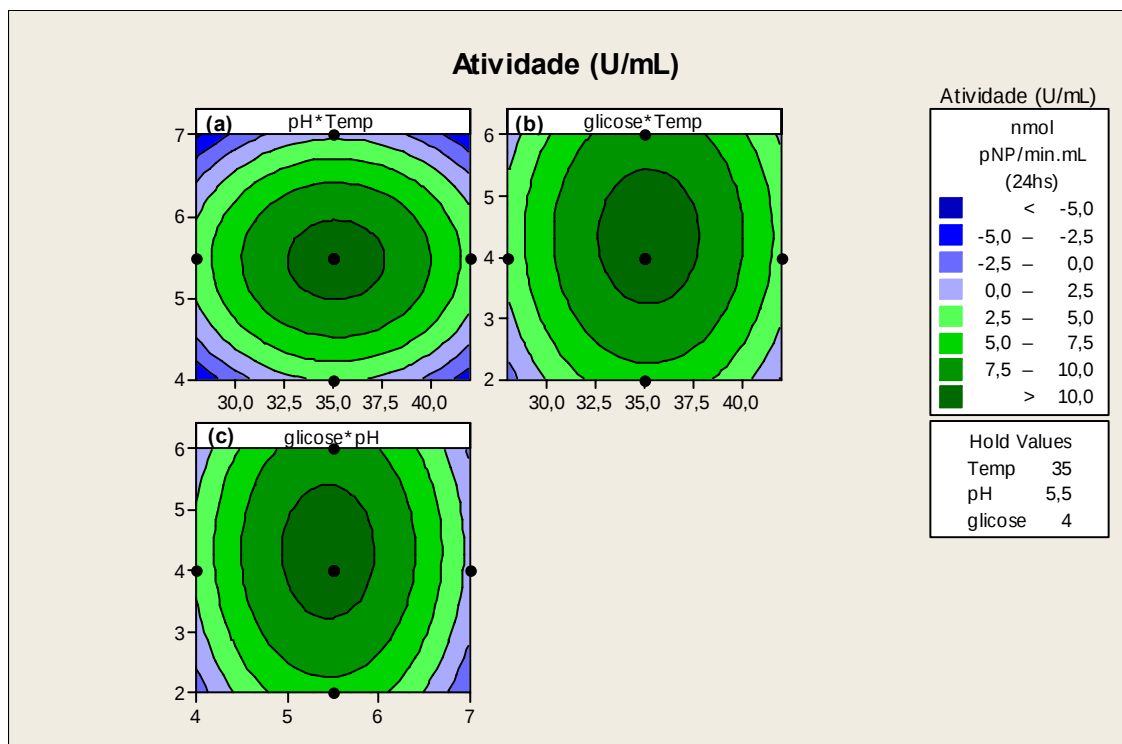


Figura 9: Gráficos de contorno da produção esperada de BGL extracelular por *K. marxianus* como uma função de: **(a)** pH e temperatura, fixando 4% de glicose. **(b)** glicose e temperatura, fixando o pH 5,5. **(c)** glicose e pH, fixando a temperatura de 35°C. A produção é representada pela atividade enzimática (U/mL)

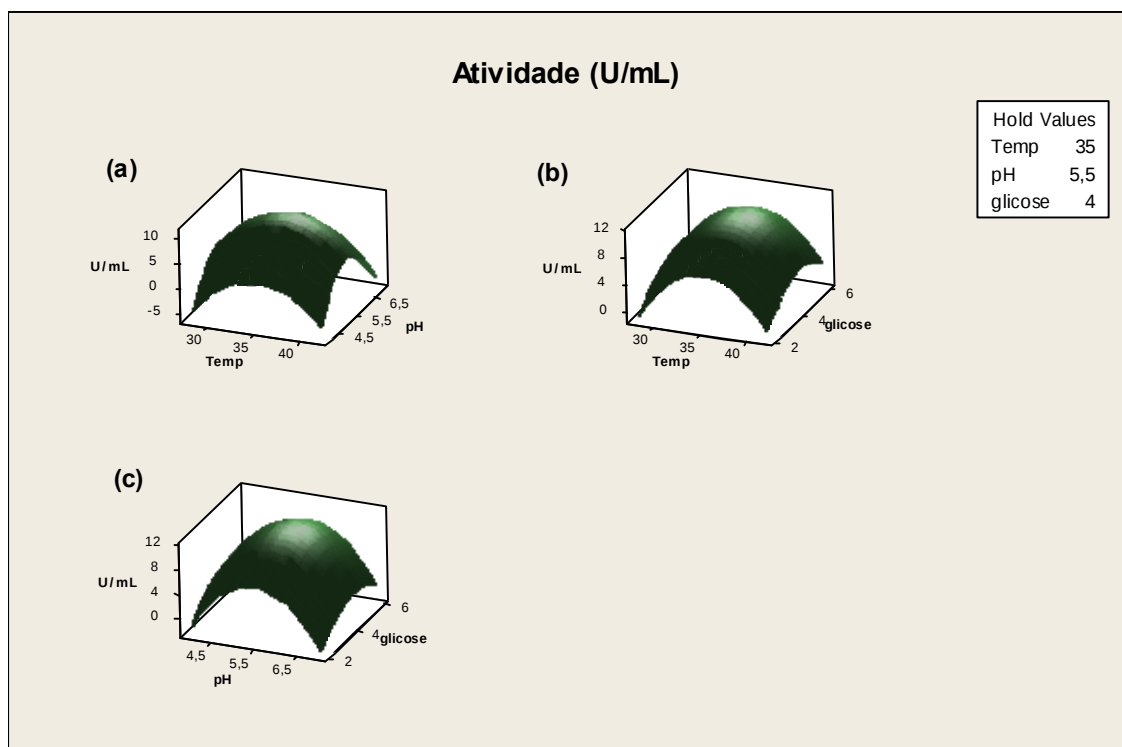


Figura 10: Superfícies de resposta da produção esperada de BGL extracelular por *K. marxianus* como uma função de: **(a)** pH e temperatura, fixando 4% de glicose. **(b)** glicose e temperatura, fixando o pH 5,5. **(c)** glicose e pH, fixando a temperatura de 35°C. A produção é representada pela atividade enzimática (U/mL).

4.2. Determinação da temperatura e pH ótimos

Para determinar a temperatura e o pH de maior atividade da enzima, foram realizados ensaios iniciais, com o sobrenadante de cultura, avaliando o efeito que estes parâmetros exercem na atividade β -glicolítica. Observamos que o máximo da atividade ocorre em torno do pH 5,0 e que esta tende a diminuir com o aumento do pH a partir deste ponto (Figura 11), indicando que valores de pH tendendo ao ácido são mais apropriados para o desempenho desta enzima. Ao avaliar o efeito da temperatura, foi observado que o aumento desta demonstrou efeito positivo na atividade enzimática (Figura 12); o efeito negativo exercido por valores acima de 60°C sugere uma desnaturação térmica.

Estes experimentos independentes não demonstram o efeito de possíveis interações entre os parâmetros e, por isso, estes resultados podem não corresponder às condições ótimas de bioprocessos. Portanto, para determinar as ótimas condições (temperatura e pH) para a atividade de BGL, estes dados (Figura 11 e 12) foram utilizados como base para o planejamento do experimento DCCR, e estimação do modelo de superfície de resposta. A tabela 7 mostra as variáveis independentes (temperatura e pH) e seus níveis codificados e reais, bem como a resposta obtida para a variável dependente (atividade) em cada combinação de tratamento.

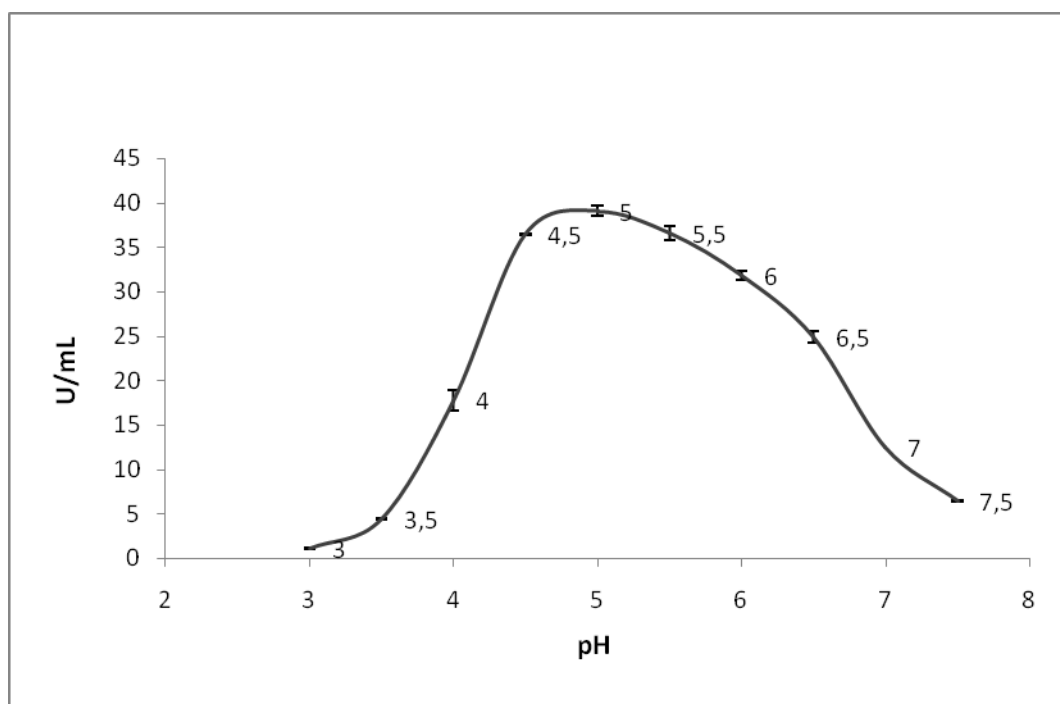


Figura 11: Efeito do pH na atividade enzimática. Atividade (U/mL) do sobrenadante da cultura de *K. marxianus* UFV-3, utilizando pNP β G como substrato, nos diferentes valores de pH, indicados no gráfico.

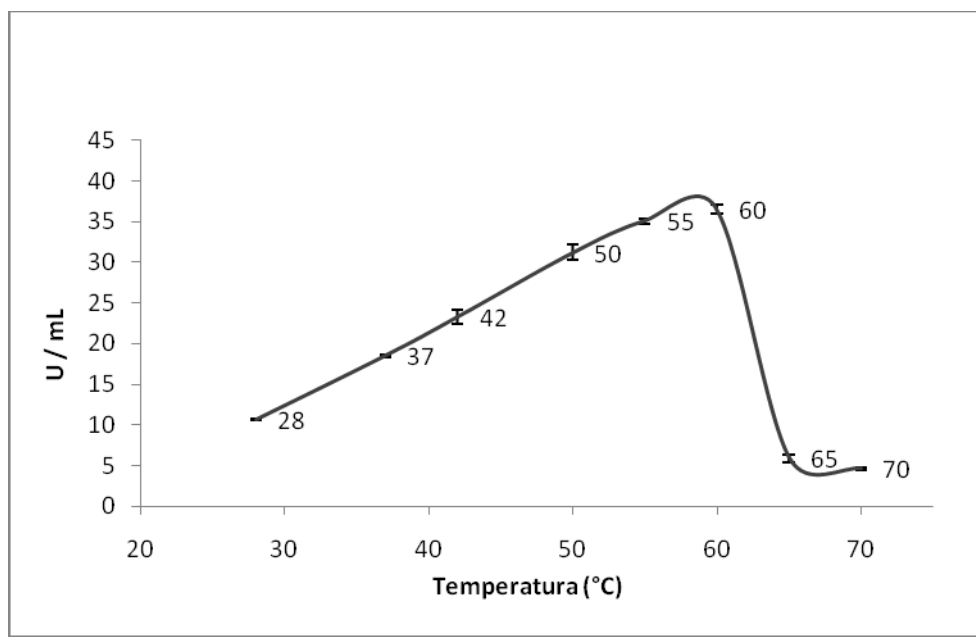


Figura 12: Efeito da temperatura na atividade enzimática. Atividade (U/mL) do sobrenadante da cultura de *K. marxianus* UFV-3, utilizando pNPβG como substrato, nas temperaturas, indicadas no gráfico.

Tabela 7: Atividade da BLG (U/mL), frente ao substrato pNPβG, em diferentes combinações de temperatura e pH.

Tratamento	Variáveis independentes*		Atividade enzimática** (U.mL ⁻¹)
	Temperatura °C	pH	
1	40 (-1)	4,5 (-1)	25,22
2	40 (-1)	6,5 (+1)	12,24
3	66 (+1)	4,5 (-1)	12,36
4	66 (+1)	6,5 (+1)	41,32
5	53 (0)	4,0 (-α)	21,35
6	53 (0)	7,0 (+α)	11,39
7	35 (-α)	5,5 (0)	15,75
8	71 (+α)	5,5 (0)	8,73
9	53 (0)	5,5 (0)	42,32
10	53 (0)	5,5 (0)	41,80
11	53 (0)	5,5 (0)	41,41
12	53 (0)	5,5 (0)	44,71
13	53 (0)	5,5 (0)	46,13

* São apresentados os valores reais e codificados (entre parênteses) para as variáveis independentes (temperatura e pH) ** Variável dependente

A partir da análise de regressão dos dados experimentais obtidos, foi gerado o modelo expresso pela equação (2):

$$AE = - 578,069 + 138,07 P + 9,61257 T - 12,8586 P^2 - 0,0915863 T^2 \quad (2)$$

Onde *AE* corresponde à atividade enzimática (U), *T* à temperatura e *P* ao pH do meio reacional.

A análise de variância (ANOVA) (Anexo VI) deste modelo apresentou valor de $p < 0,05$ ($p = 0,001$), indicando que o modelo foi significativo. O valor R^2 indica que 84,08% da variação foi explicada pelo modelo. Assim, a variação considerada pelo modelo é significativamente maior do que possíveis variações ao acaso. Logo, o modelo é confiável e adequado para a representação dos efeitos, relações e interações entre temperatura, pH e atividade enzimática e, para estimar a resposta em função destes fatores no intervalo estudado.

Os coeficientes e o teste T para os mesmos estão apresentados no Anexo VII.

O gráfico de contorno e a superfície de resposta, gerados a partir dos dados obtidos, são apresentadas nas figuras 13 e 14, respectivamente. Nas condições de reação utilizadas, a atividade enzimática máxima foi observada nos intervalos de temperaturas entre 45 - 60°C, e pHs entre 4,8 – 6,0, abrangendo o ponto central do experimento (Figuras 13 e 14). Portanto, a combinação de temperatura e pH do ponto central (53°C e pH 5,5) foi considerada ótima para a atuação desta BGL. Esta ampla área de desempenho máximo permite a exploração de inúmeras combinações entre valores de temperatura e pH, determinando a versatilidade potencial desta enzima para aplicação em diversos processos.

A maioria das BGLs fúngicas exibem temperatura ótima para atividade entre 40 e 50°C e valores ótimos de pH entre 4,0 e 6,0 (CHEN et al., 1994; SAHA et al., 1996; KARNCHANATAT et al., 2007; DAIROT et al., 2008; GONZÁLEZ-POMBO et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2009; PAL et al., 2010), coincidentes com os valores ótimos encontrados para a BGL extracelular de *K. marxianus*.

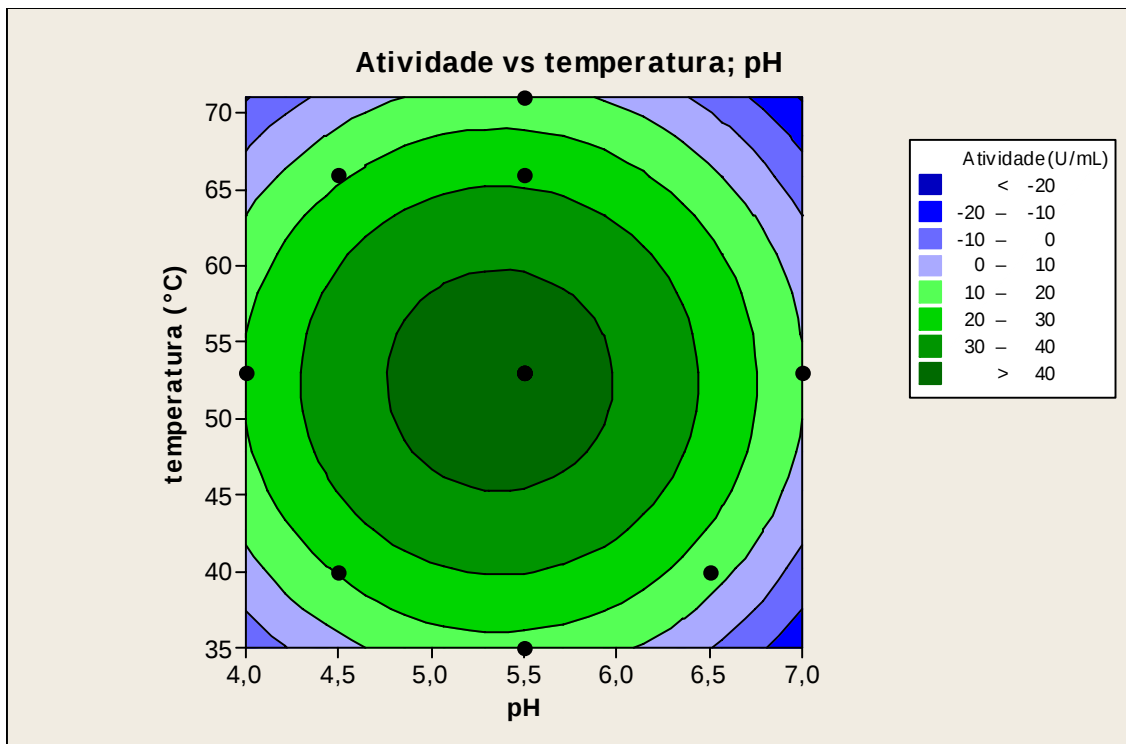


Figura 13: Gráfico de contorno para os efeitos de temperatura e pH sobre a atividade (U/mL) da BGL extracelular.

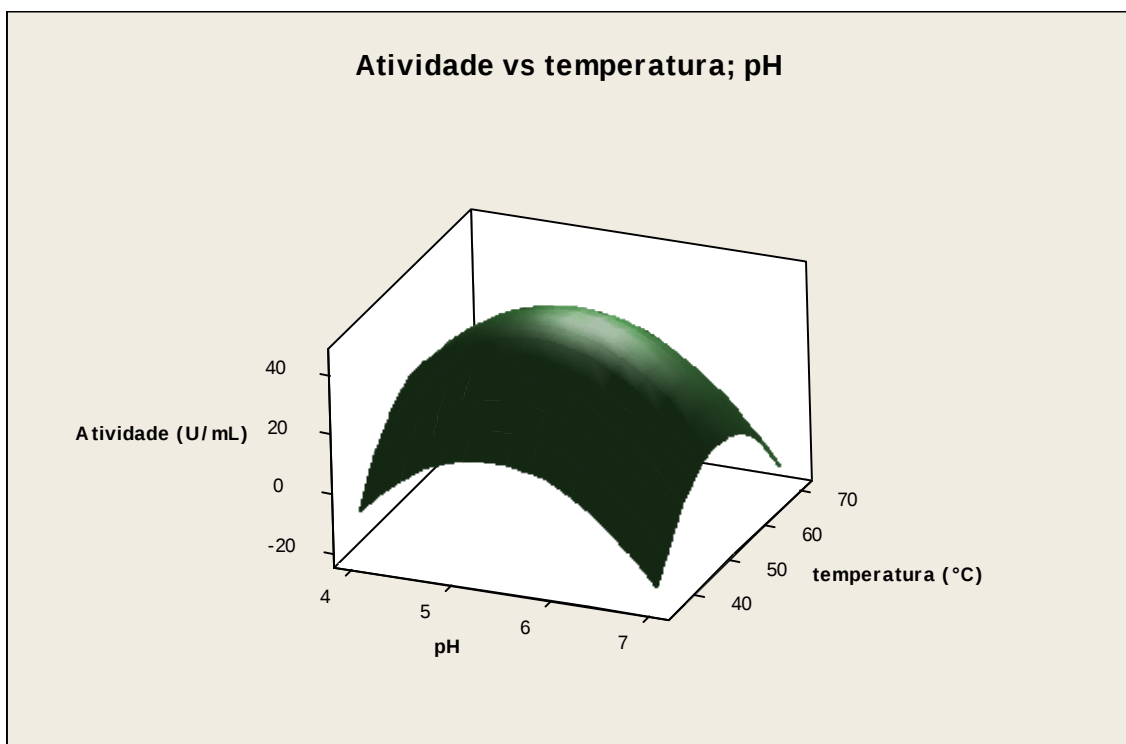


Figura 14: Superfície de resposta para os efeitos de temperatura e pH sobre a atividade (U/mL) da BGL extracelular.

4.3. Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica da BGL foi analisada a 60°C por 30 horas, em intervalos de 2 horas. Após o respectivo período de incubação o ensaio enzimático foi realizado, e a atividade residual foi expressa como porcentagem da atividade no tempo zero. Os resultados estão apresentados na figura 15. Após duas horas de pré-incubação a enzima manteve 71% da atividade observada no controle, apresentando meia-vida de 4 horas.

Apesar de alguns estudos demonstrarem que a estabilidade térmica em fungos filamentosos é superior à observada em leveduras e bactérias (SARRY e GUNATA, 2004; SESTELO et al., 2004), a BGL extracelular de *K. marxianus* apresentou valores melhores ao observado para as BGLs extracelulares dos fungos *A. niger*, *A. carbonarius* e *Trichoderma harzianum* que mantiveram 64% e 53% da atividade, após 2 horas, e 36% após 15 minutos, a 60°C, respectivamente (JØGER et al., 2001; YUN et al., 2001). E, ainda, em comparação aos nossos resultados, a BGL extracelular do fungo *Fusarium oxysporum* apresentou meia-vida de apenas 109 minutos a 60°C (CHRISTAKOPOULOS et. al, 1994); e, nos fungos *Xylaria regalis*, *Cladosporium resinae* e *Humicola grisea*, a BGL extracelular foi rapidamente inativada quando pré-incubada por 30 minutos a 60°C (WEI et al., 1996; OH et al., 1999; NASCIMENTO et al., 2009).

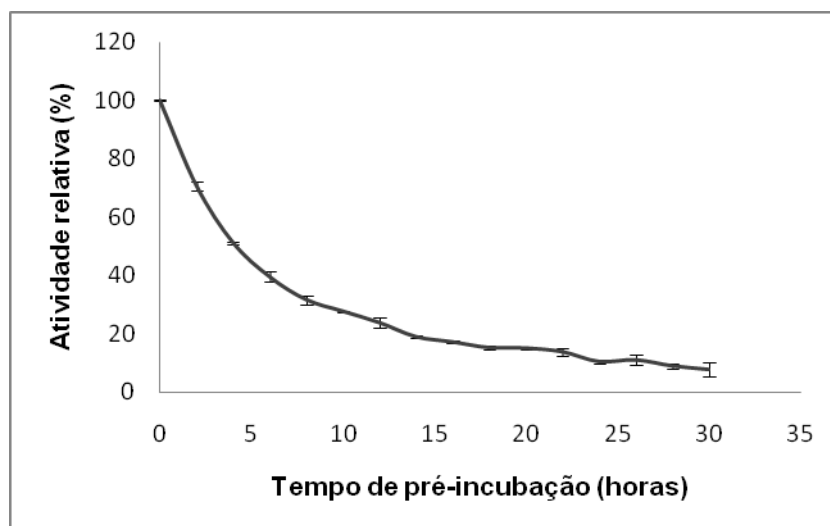


Figura 15: Termoestabilidade da BGL extracelular a 60°C. Atividade relativa (% em relação ao controle – enzima não incubada) do sobrenadante da cultura de *K. marxianus* UFV-3, pré-incubado a 60°C nos tempos indicados no gráfico, utilizando pNPβG como substrato.

4.4. Hidrólise da celobiose

O extrato enzimático foi testado, ainda, quanto à capacidade de hidrolisar celobiose, pela incubação desse com celobiose 100 mM em tampão citrato de sódio (50 mM; pH 5,5), por 30 horas. A cada 6 horas alíquotas foram coletadas e a glicose liberada na reação foi mensurada utilizando o *Glucose (HK) Assay Kit* (Sigma). Observamos um crescente aumento da concentração de glicose no decorrer da reação (Figura 16), demonstrando a capacidade da BGL extracelular de *K. marxianus* em hidrolisar esse dissacarídeo.

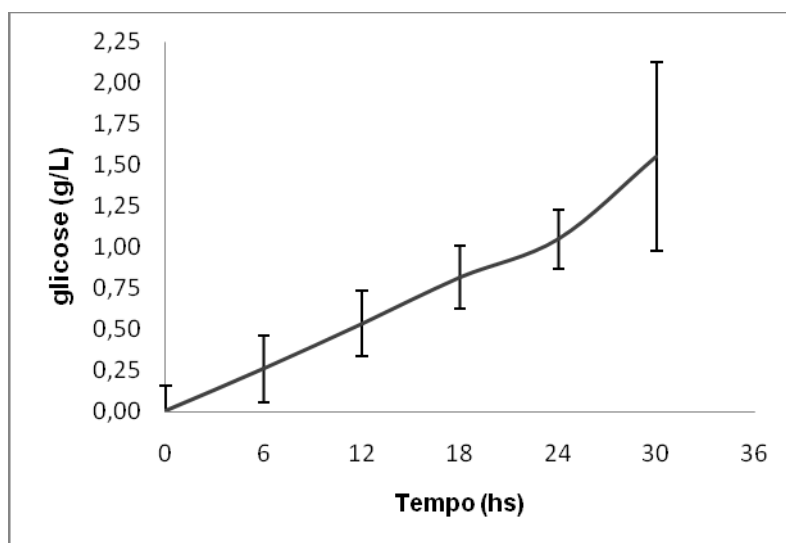


Figura 16: Glicose liberada durante a hidrólise da celobiose pela BGL extracelular de *K. marxianus*. A hidrólise foi avaliada utilizando o sobrenadante da cultura de *K. marxianus* UFV-3, e a glicose liberada foi determinada utilizando o *Glucose (HK) Assay Kit* (Sigma).

4.5. Purificação parcial da BGL através de eletroforese não-desnaturante em gel de poliacrilamida

Para purificação parcial da BGL extracelular de *K. marxianus* o extrato enzimático foi concentrado e submetido a eletroforese não-desnaturante (PAGE). Após a corrida eletroforética a atividade β -glicolítica foi localizada através de zimograma utilizando o substrato pNP β G, sendo observada uma banda de atividade, de coloração amarela (Figura 17a). Esta banda foi excisada do gel e, após ser eluída em água, foi aplicada em gel desnaturante (SDS-PAGE). A coloração do gel revelou duas bandas mais evidentes (Figura 17b; indicadas pelas setas), acima de 45 KDa. Sugerimos que estas bandas poderiam corresponder a duas subunidades de uma

mesma BGL, ou a duas isoformas de BGLs diferentes. As bandas foram numeradas (1 e 2) para facilitar a análise de espectrometria de massas.

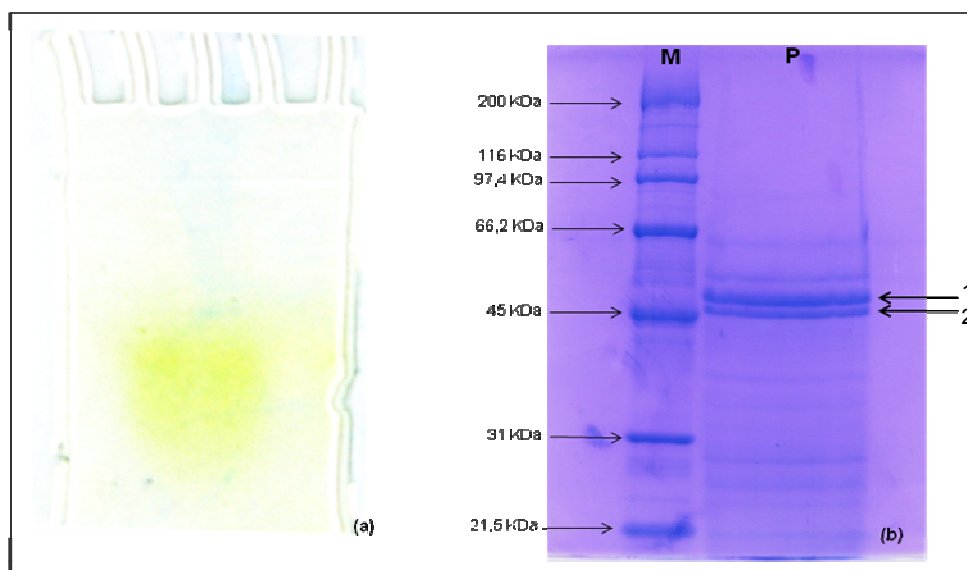


Figura 17: (a) Zimograma realizado com substrato pNPβG após PAGE. (b) SDS-PAGE das proteínas eluídas do gel nativo, após zimograma. **M:** marcador de peso molecular; **P:** padrão protéico após purificação parcial por zimograma. As setas indicam as bandas majoritárias após coloração com comassie-blue.

4.6. Análise por espectrometria de massas

As duas bandas mais evidentes, visualizadas no SDS-PAGE, foram excisadas do gel, submetidas à digestão trípica e analisadas por espectrometria de massas. Os espectros de massas foram processados usando o software FlexAnalysis (Bruker). Podemos observar, pela análise dos espectros de massas, que o padrão de fragmentação é semelhante para ambas as proteínas analisadas (Figura 18) e, assim, supõe-se que se trata de isoformas de uma mesma enzima. As análises pelo método “Peptide Mass Fingerprinting” não apresentou resultados conclusivos, e não foi possível obter informações confiáveis, uma vez que o equipamento (MALDI-TOF-TOF – Bruker Daltonics) estava instável, apresentando um erro nas massas em torno de 1,0 Dalton.

O íon 2226 (em destaque, na figura 18), foi escolhido para fragmentação MS/MS; e, o espectro obtido foi utilizado para identificação da sequência de aminoácidos pelo método “MS/MS íon search”, utilizando-se o MASCOT. A sequência obtida foi confirmada por inspeção visual dos fragmentos de massas utilizando-se o software FlexiAnalysis. O espectro e a sequência de aminoácidos (em destaque) do íon 2226 podem ser observados na figura 19.

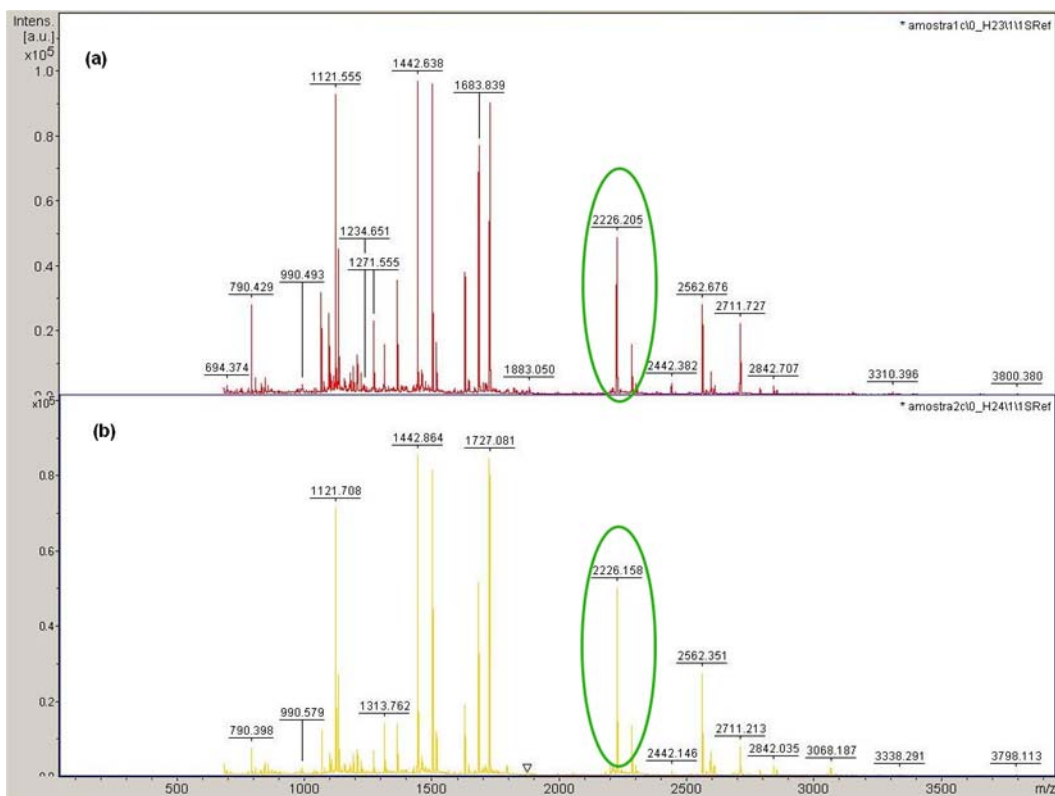


Figura 18: Espectro de massas das proteínas: (a) corresponde à banda 1 (b) corresponde à banda 2 na figura 17b. Os círculos verdes destacam o íon 2226, presente em ambas as proteínas, que foi fragmentado, posteriormente.

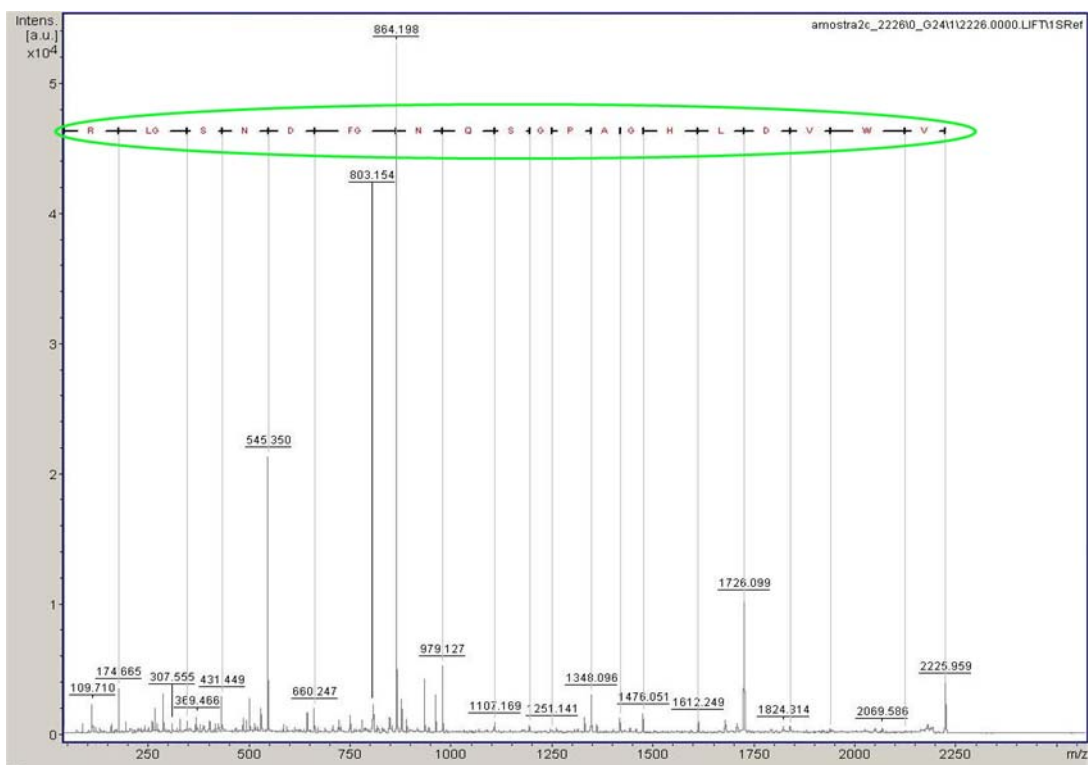


Figura 19: Espectro de massas do íon 2226. O círculo verde destaca a sequência de aminoácidos do íon.

A pesquisa no *MASCOT search*, com a sequência de aminoácidos obtida (VWVDLHGAPGSQNGFDNSGLR), identificou uma possível β -1,3-glicosidase. O valor do *score* foi 75, indicando uma alta identidade ($p < 0,05$). Dentre as β -1,3-glicosidasas listadas nesta análise, foi encontrada uma proteína hipotética de *K. lactis* (Figura 20), com um *score* de 74. Ao analisar a sequência desta proteína no software *protein blast* foi identificada como pertencente a uma superfamília de celulases, com um elevado valor de *score* (≥ 200) (Figura 21).

{MATRIX}
SCIENCE

Mascot Search Results

Protein View

Match to: gi|50304959 Score: 74
 unnamed protein product [Kluyveromyces lactis]
 Found in search of D:\Humberto\Mariana\MS_MS\Mariana_2C_2225.959.mgf

Nominal mass (M_r): 50179; Calculated pI value: 4.47
 NCBI BLAST search of gi|50304959 against nr
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Kluyveromyces lactis NRRL Y-1140](#)
 Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:
[gi|46395582](#) from [Kluyveromyces lactis](#)
[gi|1150442](#) from [Kluyveromyces lactis](#)
[gi|49641570](#) from [Kluyveromyces lactis](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
 Variable modifications: Oxidation (M)
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
 Sequence Coverage: 4%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1  MLSMQVVS LI SLLVSVCLAQ PLPLSKRYFE YENYKVRGVN LGGWLVLEPF
51  ITPSLFETFR TNEYNDGIP YDEYHYCQYL GEDLARDRLK QHWSTWITEA
101 DFEDISNTGL NTVRIPIGYW AFELDDDDPY VSGLQEAYLD QAIEWARSYG
151 LKVWVDLHGA PGSQNGFDNS GLRDQVEFQQ DGNWDVFKNV LAYVIEKYSR
201 DEFTDTVVG V EVLNEPLGPV IDMDKLKELY NWAYDYLRND LQRDQILVIH
251 DAFQKANYFD DQLTVEQGAF GVLVDHHHYQ VFSPEEVGRT IDEHISVVCE
301 QGKETL TEAH WNVVGEWSAA LTDCTKWLNG VGIGARYDGS FVKNQDTSYW
351 IGSCEGSQDI STWISDKKDN YRKYIEAQLD AYEIRNGWIY WCYKTEDTLE
401 WDYRKL VQSG LFPQPLTNRQ FPNQCSSTY
    
```

Figura 20: Sequência hipotética da β -1,3-glicosidase de *K. lactis*, identificada na pesquisa no *MASCOT search* com alta homologia às proteínas em estudo. Em vermelho está destacada a sequência de aminoácidos do íon 2226.

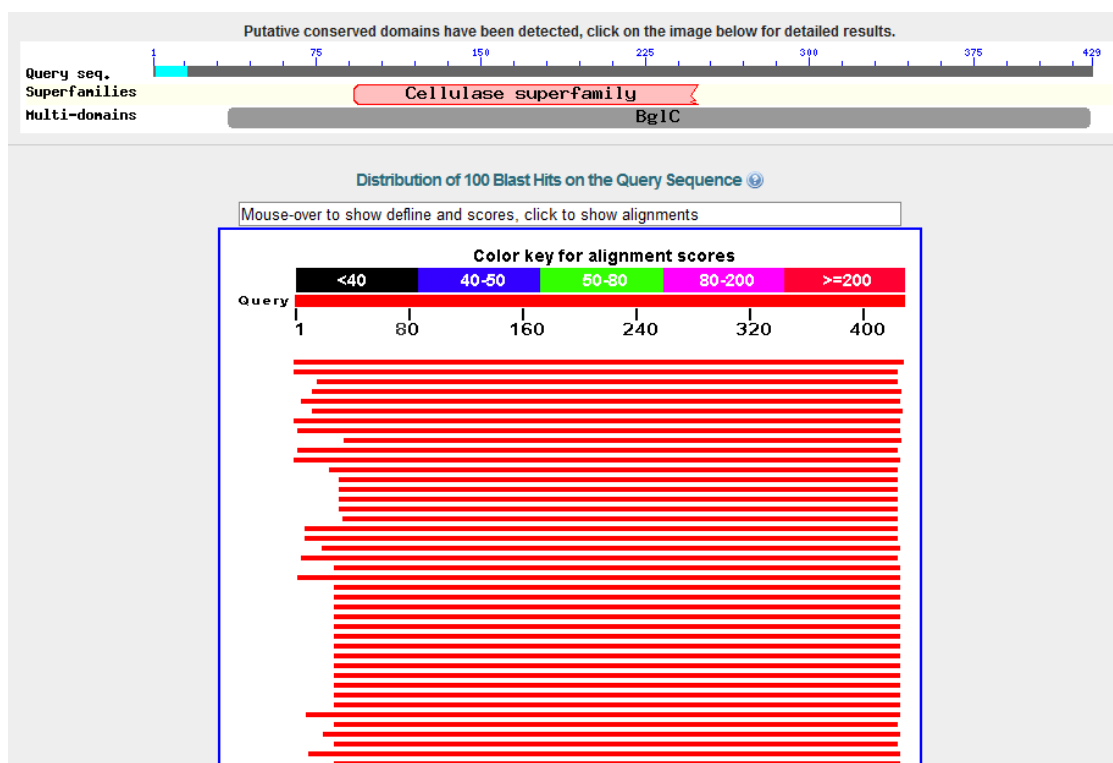


Figura 21: Resultado na análise no *protein blast* que identificou a proteína hipotética de *K. lactis* como pertencente a uma superfamília de celulasas.

IGARASHI e colaboradores (2003) relataram uma BGL extracelular do fungo *Phanerochaete chrysosporium*, previamente identificada como uma glicosil hidrolase da família 3 (GH3) deste mesmo fungo, como sendo uma β -1,3-glicosidase capaz de hidrolisar celobiose e outros substratos β -glicosídicos, tais como laminaribiose (β -1,3-glucobiose), sofrorose (β -1,2-glucobiose) e gentiobiose (β -1,6-glucobiose). Estudos com uma β -1,4-glicosidase *like* (identificada previamente por similaridade de seqüência) da cianobactéria *Synechocystis* PCC6803, demonstraram que essa era um novo tipo de glicosil hidrolase da família 9 (GH9) na qual hidrolisa preferencialmente ligações β -1,3-1,4-glicosídicas, sendo então renomeada para β -1,3-1,4-glicosidase (TAMOI et al., 2007; FUKAMIZO et al., 2008). Estes trabalhos demonstram certa relação filogenética entre β -1,3 e β -1,4-glicosidases e ainda, uma certa promiscuidade destas enzimas. Tais comparações nos levam a construir hipóteses, com base em nossos resultados, de que a BGL extracelular de *K. marxianus* pode ser uma β -1,3-glicosidase ou, ainda, trata-se de uma β -1,3-1,4-glicosidase, com atividade β -1,4-glicosídica, capaz de hidrolisar celobiose (conforme demonstrado na seção 4.4). Quanto à capacidade desta BGL extracelular de *K. marxianus* em hidrolisar ligações β -1,3-glicosídicas, não podemos concluir ou afirmar nada, uma vez que essa não foi testada.

4.7. Purificação parcial da BGL através de Cromatografia Líquida (FPLC)

Primeiramente, o sobrenadante da cultura foi concentrado por ultra-filtração (Coluna Vivaspín 10KDa – GE Healthcare). Esta coluna possui uma membrana vertical semipermeável de polietersulfona que tolera altas taxas de fluxo e permite a concentração da amostra. O processo de purificação da BGL consistiu de 2 etapas, o resumo deste processo está apresentado na tabela 8. Enquanto que no extrato bruto concentrado observou-se atividade específica de 113 U/mg de proteína, a atividade específica obtida ao final da purificação parcial foi de 3927,6 U/mg de proteína, representando um fator de purificação de 35 vezes, e com recuperação de 50% da enzima (tabela 8).

Tabela 8: Tabela da purificação parcial por FPLC da BGL extracelular de *K. marxianus* UFV-3.

Etapas de purificação	Vol (mL)	Atividade (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg ptn)	Atividade total (U)	Fator de purificação	Recuperação (%)
Ultra-filtração	40	113,0	1,0	113,0	4520	1,0	100
Troca iônica 1	2,5	962,4	0,478	2013,4	2406	18,0	53
Troca iônica 2	2,5	911,2	0,232	3927,6	2278	35,0	50

O extrato bruto concentrado foi previamente ajustado para o pH 7,0 e, um mL desse foi aplicado em coluna de cromatografia líquida de troca aniônica HiTrap Capto Q, equilibrada com tampão fosfato de sódio (50 mM; pH 7,0) e eluída com gradiente crescente de 0 a 1 M de NaCl. Na eluição foram coletadas 30 frações de 1 mL, e puderam ser observados três picos de proteína e um pico de atividade enzimática (Figura 22). Uma vez a atividade não foi bem definida em um pico de proteínas, foi decidido fazer outra cromatografia de troca aniônica e fazer uma eluição em passos para, assim, separar melhor as proteínas.

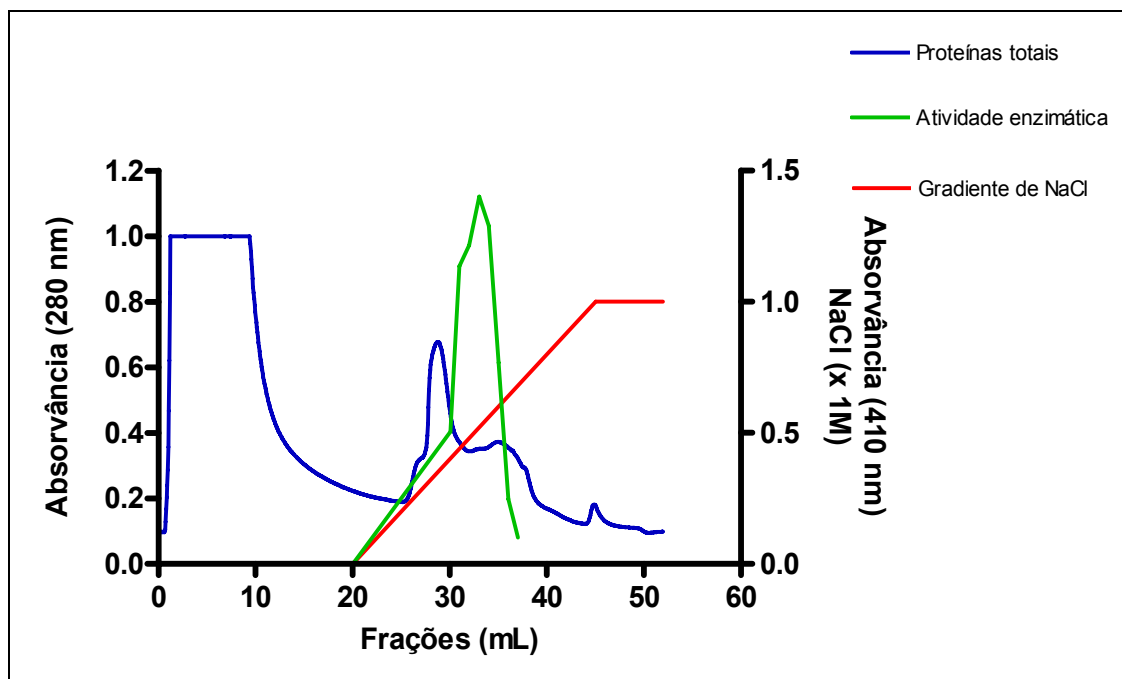


Figura 22: Perfil cromatográfico da cromatografia por troca aniônica em coluna HiTrap Capto Q; eluição por gradiente crescente de NaCl.

O extrato bruto concentrado foi então novamente aplicado na coluna HiTrap Capto Q, e esta etapa foi denominada de troca iônica 1; a eluição em passos, coletada em frações de 10 mL, apresentou quatro picos, e apenas um pico de atividade enzimática, eluído a 200 mM de NaCl (Figura 23). Ao analisar o gráfico de absorvância a 280 nm, que corresponde a proteínas, observamos que a BGL foi significativamente purificada nesta etapa, uma vez que um grande número de proteínas foi eliminado nas frações descartadas (proteínas não-ligantes; eluídas em 0,1; 0,3 e 1 M de NaCl) (Figura 23).

A fração contendo atividade, após retirada do sal, foi re-cromatografada na Coluna HiTrap Capto Q. A eluição com NaCl foi realizada em um passo inicial de 100 mM, seguida por um gradiente crescente de 100 a 200 mM, e dois passos finais de 200 mM e 1 M. Esta etapa, denominada de troca iônica 2, foi realizada para tentar separar a BGL de possíveis proteínas que ainda estejam na amostra. Na eluição em gradiente obtiveram-se dois picos sobrepostos e ambos apresentaram atividade enzimática (Figura 24).

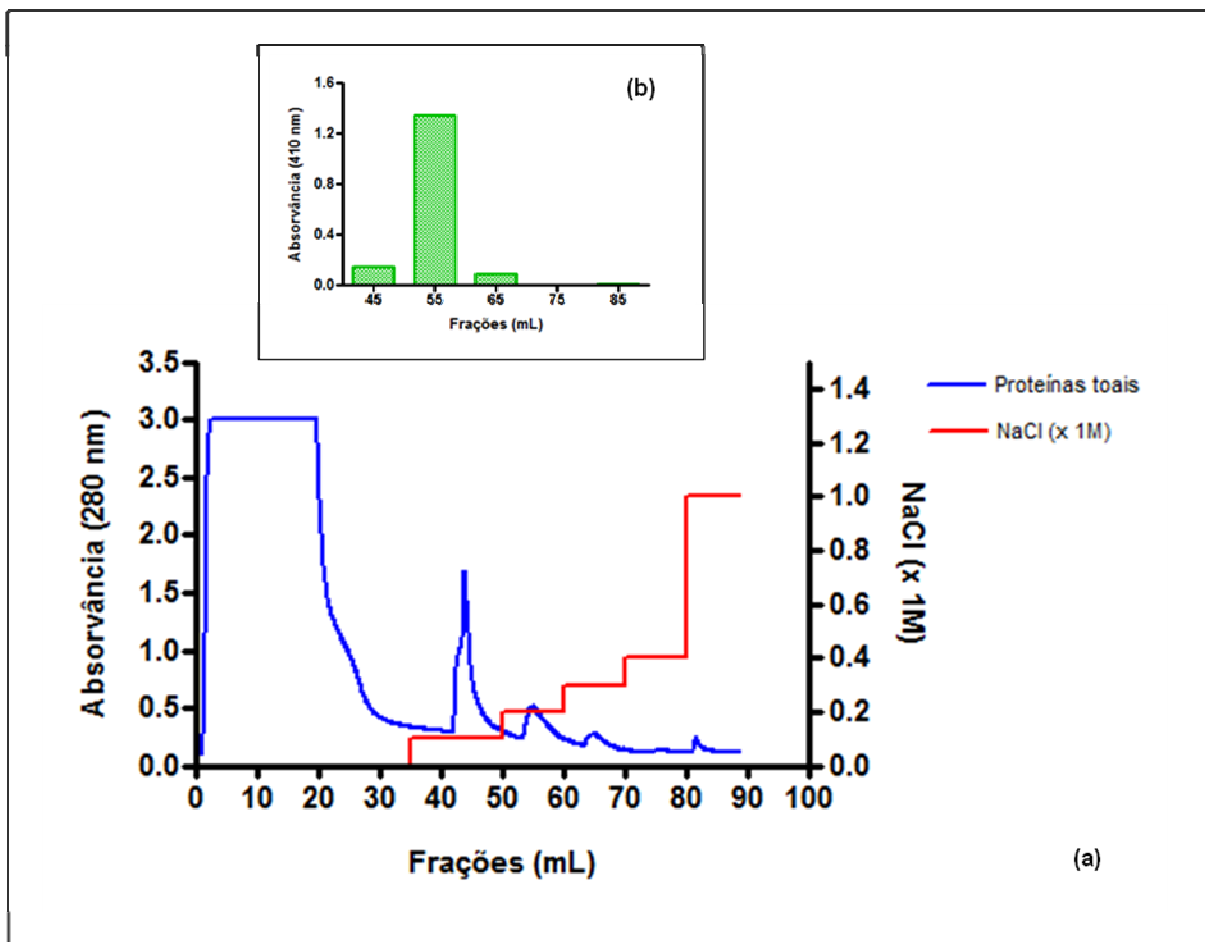


Figura 23: (a) Perfil cromatográfico da cromatografia por troca aniônica em coluna HiTrap Capto Q; eluição em passos de concentrações de NaCl. (b) Atividade das frações coletadas.

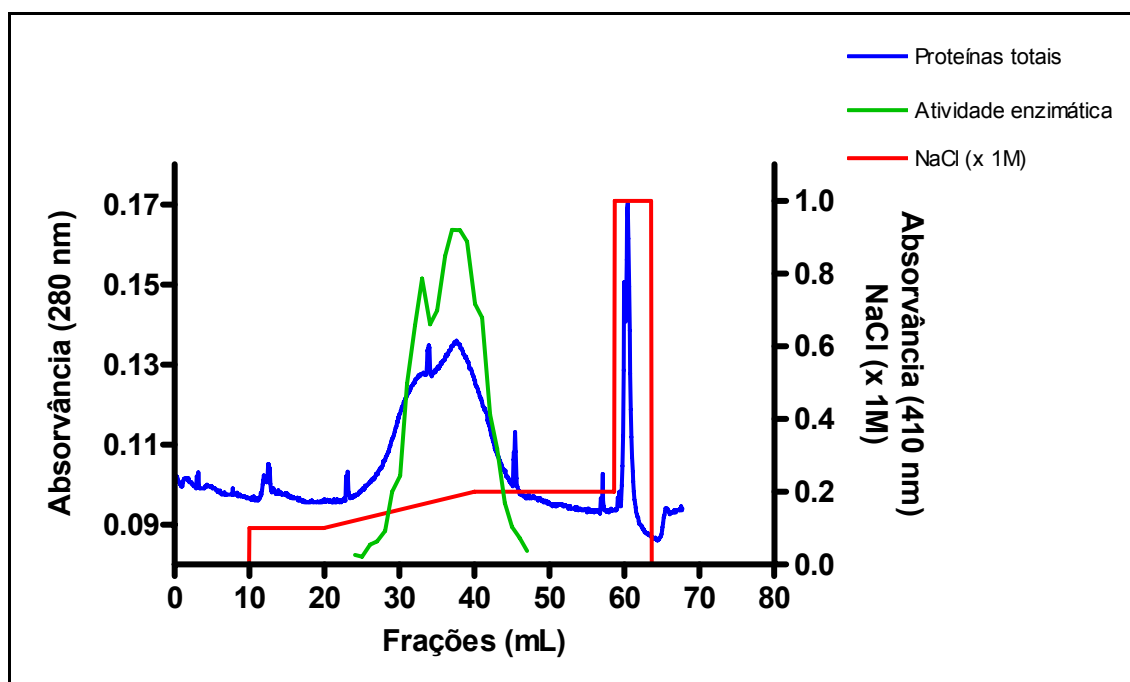


Figura 24: Perfil cromatográfico da cromatografia por troca aniônica em coluna HiTrap Capto Q; eluição em passos e em gradiente de concentrações de NaCl.

Foi concluído, então, que estes dois picos representam as duas bandas mais evidentes observadas da purificação parcial em gel de poliacrilamida não-desnaturante (seção 4.5) e, para confirmar esta hipótese, as frações com maior atividade (30-40 mL) foram reunidas, concentrada em coluna Vivaspin 10 KDa, e analisada por SDS-PAGE (Figura 25). A coloração do gel confirmou a suspeita anterior, ao revelar as mesmas duas bandas majoritárias (indicadas por setas) observadas no processo de purificação por zimograma. Podemos concluir também com este gel (figura 25), a eficiência do processo de purificação por FPLC, uma vez que a mesma quantidade de proteínas (10 µg) foi aplicada em cada poço e, nota-se uma evidente concentração das bandas (indicadas por seta) que correspondem à BGL extracelular de *K. marxianus*, ao passo que as outras proteínas contidas no extrato bruto não apresentam este perfil de concentração e portanto devem ter sido eliminadas. As proteínas “contaminantes” que ainda se encontram na amostra (duas em torno de 97 KDa e uma acima de 31 KDa), podem ser eliminadas por mais um passo de cromatografia líquida de exclusão molecular, sendo que a realização dessa é uma perspectiva a ser desenvolvida.

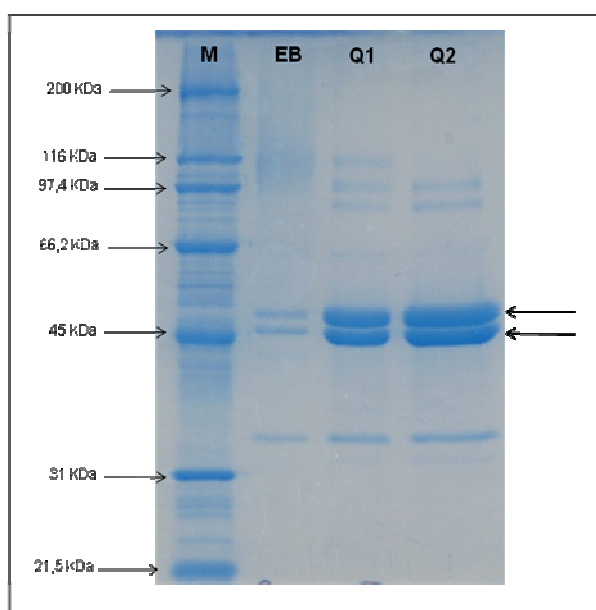


Figura 25: SDS-PAGE das amostras (10 µg de proteínas) de cada etapa do processo de purificação por FPLC. **M:** marcador de peso molecular. **EB:** extrato bruto concentrado por ultra-filtração. **Q1:** Fração coletada na cromatografia de troca iônica 1. **Q2:** Fração coletada na re-cromatografia de troca iônica 2.

4.8. Especificidade da BGL a diferentes substratos

A BGL extracelular de *K. marxianus*, parcialmente purificada, apresentou baixa taxa de hidrólise (0-4%) dos substratos pNPαG, pNPβMan, pNPαMan, pNPβGal, pNPαGal, mNPαGal, oNPαGal, pNPαAra, em comparação com a hidrólise do

substrato padrão pNP β G (100%) (Tabela 9). A taxa de hidrólise dos substratos pNP β Cb, pNP β Xyl e oNP β G foi de 28, 16 e 6,5%, respectivamente, em relação à hidrólise do pNP β G.

Tabela 9: Especificidade da BGL parcialmente purificada em relação a diferentes substratos cromogênicos*.

Substrato 2 mM	Atividade relativa (%)
pNP- β -D-glicopiranosídeo (substrato padrão)	100
oNP- β -D-glicopiranosídeo	6,5
pNP- α -D-glicopiranosídeo	3,2
pNP- β -D-manopiranosídeo	4,0
pNP- α -D-manopiranosídeo	2,9
pNP- β -D-galactopiranosídeo	2,7
pNP- α -D-galactopiranosídeo	3,8
mNP- α -D-galactopiranosídeo	0,74
oNP- α -D-galactopiranosídeo	1,8
pNP- β -D-xilopiranosídeo	16,2
pNP- α -D-arabnopiranosídeo	2,6
pNP- β -D-celobiosídeo	28,2

* Experimentos realizados em duplicata

Estes resultados demonstram, portanto, uma alta especificidade da enzima para substratos com configuração β -anomérica, uma vez que essa não apresentou eficiência na hidrólise de nenhum dos substratos α -glicosídicos testados. E, ainda esta BGL extracelular de *K. marxianus* demonstra uma certa especificidade por glicose, pois não apresentou atividade sobre outros açúcares (manose, galactose e arabinose), exceto para xilose. Trabalhos anteriores demonstraram BGLs com atividade β -xilosidase (CAI et al., 1998; WALLECHA e MISHRA, 2003; MAMMA et al., 2004). Outros substratos devem ser testados para se obter uma melhor conclusão sobre a especificidade desta BGL extracelular de *K. marxianus*. Com base nos resultados da análise por espectrometria de massas (seção 4.6), sugere-se o teste utilizando substratos naturais com ligações β -1,3-glicosídicas.

5. CONCLUSÕES

Uma nova β -glicosidase foi identificada na levedura *K. marxianus* UFV-3, sendo essa uma enzima secretada, diferente da β -glicosidase intracelular, previamente descrita na literatura. Apesar de ter sido identificada como uma β -1,3-glicosidase, por análise MS/MS, esta BGL extracelular foi capaz de hidrolisar celobiose (β -1,4). A produção da BGL extracelular por *K. marxianus* UFV-3 foi otimizada e, uma vez que foi possível observar uma faixa ótima de produção, várias combinações dos fatores podem ser utilizadas de modo a fornecer o mesmo resultado, o que permite a escolha de níveis mais econômicos dos fatores de interesse. A ótima atuação da enzima foi observada em pHs de 4,8 – 6,0 e temperaturas de 45 - 60°C, valores coincidentes com o observado para a maioria das BGLs fúngicas. Esta ampla área de desempenho permite a exploração de inúmeras combinações entre temperaturas e pHs, determinando a versatilidade potencial desta enzima para aplicação em diversos processos. A purificação da BGL extracelular de *K. marxianus*, por FPLC, foi um processo rápido e eficiente, o que facilitará um posterior estudo de caracterização e identificação mais detalhado desta enzima.

O fato de *K. marxianus*, uma levedura fermentadora, ser capaz de secretar uma β -glicosidase abre uma nova perspectiva para aplicação desta levedura na produção de etanol celulósico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-BANAT, B.M.A.; NONKLANG, S.; HOSHIDA, H.; AKADA, R. 2010. Random and targeted gene integrations through the control of non-homologous end joining in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast*. 27: 29-39.
- AKIYAMA, K. et al. 2001. Production of galactooligosaccharides from lactose using β -glucosidase from *Thermos* sp. Z-1. *Biosci Biotechnol Biochem*. 65: 438-441.
- ALFANI, A., GALLIFUOCO, F., SAPOROSI, A., SPERA, A., CANTARELLA, M. 2000. Comparison of SHF and SSF process for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. *J. Ind. Microbiol Biotechnol*. 25: 184–192.
- ANDERSON, P.J.; McNEIL, K.; WATSON, K. 1986. High-efficiency carbohydrate fermentation to ethanol at temperatures above 40°C by *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* isolated from sugar mills. *Appl Environ Microbiol*. 51: 1314–1320.
- ANDRIĆ, P.; MEYER, A.S.; JENSEN, P.A.; DAM-JOHANSEN, K. 2010. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocelluloses hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. *Biotechnol Adv*. 28: 308–324.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTILLA, M. 2005. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol Rev*. 29: 719-739.
- BANAT, I.M.; NIGAM, P.; MARCHANT, R. 1992. Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52°C and producing ethanol at 45°C and 50°C. *World J Microbiol Biotechnol*. 8: 259–263.
- BANAT, I.M.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R.; MCHALE, A.P. 1998. Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I – Yeast in general. *World J Microbiol Biotechnol*. 14: 809–821.
- BARBOSA, A.M.; GIESE, E.C.; DEKKER, R.F.H.; BORSATO, D.; PÉREZ, A.I.B.; IRANZO, J.F.U. 2010. Extracellular β -glucosidase production by the yeast

- Debaryomyces pseudopolymorphus* UCLM-NS7A: optimization using response surface methodology. *N Biotechnol.* 27: 374-381.
- BÉGUIN, P.; AUBERT, J.P. 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol Rev.* 13: 25-58.
- BERGHEM, L.E.R.; PETTERSSON, L.G. 1974. The mechanism of enzymatic cellulose degradation. Isolation and some properties of a β -glucosidase from *Trichoderma viride*. *Eur J Biochem.* 46: 295-305.
- BERGKAMP, R.J.M.; BOOTSMAS, T.C.; TOSCHKA, H.Y.; MOOREN, A.T.A.; KOX, L.; VERBAKEL, J.M.A.; GEERSE, R.H.; PLANTA, R.J. 1993. Expression of an α -galactosidase gene under control of the homologous inulinase promoter in *Kluyveromyces marxianus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 40: 309–317.
- BEZERRA, R.M.; DIAS, A.A. 2005. Enzymatic kinetic of cellulose hydrolysis: inhibition by ethanol and cellobiose. *Appl Biochem Biotechnol.* 126: 49-59.
- BHARADWAJ, R.; WONG, A.; KNIERIM, B.; SINGH, S.; HOLMES, B.M.; AUER, M.; SIMMONS, B.A.; ADAMS, P.D.; SINGH, A.K. 2011. High-throughput enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass via in-situ regeneration. *Bioresour Technol.* 102: 1329-1337.
- BHAT, M.K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol Adv.* 18: 355-383.
- BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V.S. 2002. Microbial β -glucosidases: cloning, properties and applications. *Crit Rev Biotechnol.* 22: 375-407.
- BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V.S. 2005. Purification and characterization of recombinant *Escherichia coli*-expressed *Pichia etchellsii* β -glucosidase II with high hydrolytic activity on sophorose. *Appl Microbiol Biotechnol.* 66: 527-535.
- BOLLÓK, M., RÉCZEY, K., ZACCHI, G. 2000. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated spruce to ethanol. *Appl Biochem Biotechnol.* 84–86:69–80

- BUSTO, M.D.; ORTEGA, N.; PEREZ-MATEOS, M. 1995. Induction of β -glucosidase in fungal and soil bacterial cultures. *Soil Biol Biochem.* 27: 949-954.
- BUSTO, M.D.; ORTEGA, N.; PEREZ-MATEOS, M. 1997. Effect of immobilization on the stability of bacterial and fungal β -glucosidase. *Process Biochem.* 32: 441-449.
- CAI, Y.J.; BUSWELL, J.A.; CHANG, S.T. 1998. β -Glucosidase components of the cellulolytic system of the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. *Enzyme Microb Technol.* 22: 122-129.
- CHEN, H.; LI, X.; LJUNGDAHL, L.G. 1994. Isolation and Properties of an Extracellular β -Glucosidase from the Polycentric Rumen Fungus *Orpinomyces* sp. Strain PC-2. *Appl Environ Microbiol.* 60: 64-70.
- CHRISTAKOPOULOS, P. et al. 1994. Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase with transglycosylation and exo-glucosidase activities from *Fusarium oxysporum*. *Eur J Biochem.* 224: 379-385.
- DAROIT, D.J.; SIMONETTI, A.; HERTZ, P.F.; BRANDELLI, A. 2008. Purification and Characterization of an Extracellular β -Glucosidase from *Monascus purpureus*. *J Microbiol Biotechnol.* 18: 933-941.
- DEMAIN, A.L. 2009. Biosolutions to the energy problem. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 36:319–332.
- FONSECA, G.G.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C.; GOMBERT, A.K. 2008. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol.* 79: 339–354.
- FUENTES, L.L.G.; RABELO, S.C.; FILHO, R.M.; COSTA, A.C. 2011. Kinetics of Lime Pretreatment of Sugarcane Bagasse to Enhance Enzymatic Hydrolysis. *Appl Biochem Biotechnol.* 163: 612–625 .
- FUKAMIZO, T.; HAYASHI, K.; TAMOI, M.; FUJIMURA, Y.; KUROTAKI, H.; KULMINSKAYA, A.; KITAOKA, M. 2008. Enzymatic hydrolysis of 1,3-1,4- β -glucosyl oligosaccharides by 1,3-1,4- β -glucanase from *Synechocystis* PCC6803: A

- comparison with assays using polymer and chromophoric oligosaccharide substrates. Arch Biochem Biophys. 478: 187–194.
- GAN, Q.; ALLEN, S.J.; TAYLOR, G. 2002. Design and operation of an integrated membrane reactor for enzymatic cellulose hydrolysis. Biochem Eng Journal. 12: 223–229.
- GERMAIN, D.P. 2004. Gaucher's disease: a paradigm for interventional genetics. Clin Genet. 65: 77.86.
- 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 β -glucosidase from *Metschnikowia pulcherrima*. Biotechnol Lett. 30:1469–1475.
- GUEGUEN, Y. et al. 1995. Purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from *Botrytis cinerea*. Enzyme Microb Technol. 17: 900-906.
- GUEGUEN, Y. et al. 1997a. Enhancement of aromatic quality of Mustac wine by the use of immobilized β -glucosidase. J Biotechnol. 55: 151-156.
- GUEGUEN, Y.; CHEMARDIN, P.; LABROT, P.; ARNAUD A.; GALZI, P. 1997b. Purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from a new strain of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from cassava. J Appl Microbiol. 82: 469-476.
- HACKING, A.J.; TAYLOR, I.W.F.; HANAS, C.M. 1984. Selection of yeasts able to produce ethanol from glucose at 40°C. Appl Microbiol Biotechnol. 19: 361–363.
- HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M.F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. 2006. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. Trends Biotechnol. 24: 549-556.
- HAIGHT, M. 2005. Assessing the environmental burdens of anaerobic digestion in comparison to alternative options for managing the biodegradable fraction of municipal solid wastes. Water Sci Technol. 52: 553–559.

- HAMELINCK, C.N.; van HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A.P.C. 2005. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass Bioenerg.* 28: 384–410.
- HARI, K. S., JANARDHAN, R. T., CHOWDARY, G. V. 2001. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. *Bioresour Technol.* 77, 193–196.
- HASHIMOTO, W. et al. 1998. Molecular cloning of two genes for β -D-glucosidase in *Bacillus* sp. GL1 and identification of one as a gellan-degrading enzyme. *Arch Biochem Biophys.* 360: 1-9.
- HENSING, M.C.; ROUWENHORST, R.J.; HEIJNEN, J.J.; van DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T. 1995. Physiological and technological aspects of large-scale heterologous protein production with yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek.* 67: 261–279.
- HILL, J.; IAN, K. A.; DONALD, G.; GRIFFITHS, D. E. 1991. DMSO-Enhanced Whole Cell Yeast Transformation. *Nucleic Acids Res.* 19: 5791.
- HONG, J.; WANG, Y.; KUMAGAI, H.; TAMAKI, H. 2007. Construction of thermotolerant yeast expressing thermostable cellulase genes. *J Biotechnol.* 130: 114–123.
- HOWARD, R.L.; ABOTSI, E.; JANSEN van RENSBURG E.L.; Howard, S. 2003. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *Afr J Biotechnol.* 2: 602-619.
- HUGHES, D.B.; TUDROSAEN, N.J.; MOYE, C.J. 1984. The effect of temperature on the kinetics of ethanol production by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol Lett.* 6:1–6.
- IEMBO, T. et al. 2002. Production, characterization, and properties of β -glucosidase and β -xylosidase from a strain of *Aureobasidium* sp. *Appl Biochem Microbiol.* 38: 549-552.
- IGARASHI, K.; TANI, T.; KAWAI, R.; SAMEJIMA, M. 2003. Family 3 β -Glucosidase from Cellulose-Degrading Culture of the White-Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium* is a Glucan 1,3- β -Glucosidase. *J Biosci Bioeng.* 95: 572-576.

- JOO, A.R.; JEYA, M. ; LEE, K.M.; LEE, K.M.; MOON, H.J.; KIM, Y.S.; LEE, J.K. 2010. Production and characterization of β -1,4-glucosidase from a strain of *Penicillium pinophilum*. *Process Biochem.* 45: 851-858.
- JØGER, G.; WU, Z.; GARSCHHAMMER, K.; ENGEL, P.; KLEMENT, T.; RINALDI, R.; SPIESS, A.C.; BÜCHS, J. 2010. Practical screening of purified cellobiohydrolases and endoglucanases with α -cellulose and specification of hydrodynamics. *Biotechnol Biofuels.* 3: 18-30.
- JØGER, S. et al. 2001. Production and characterization of β -glucosidases from different *Aspergillus* strains. *World J Microbiol Biotechnol.* 17: 455-461.
- KALIL, S.J.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I. 2000. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. *Process Biochem.* 35: 539-550.
- KANG, S.W. et al. 2004. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol.* 91:153-156.
- KARNCHANATAT, A.; PETSOM, A.; SANGVANICH, P.; PIAPHUKIEW, J.; WHALLEY, A.J.S.; REYNOLDS, C.D.; SIHANONTH, P. 2007. Purification and biochemical characterization of an extracellular β -glucosidase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.:Fr.) Rehm. *FEMS Microbiol Lett.* 270: 162–170.
- KATZ, M.; REESE, E.T. 1968. Production of glucose by enzymatic hydrolysis of cellulose. *Appl Microbiol.* 16: 419–420.
- KIERS, J.; ZEEMAN, A.M.; LUTTIK, M.; THIELE, C.; CASTRILLO, J.I.; STEENSMA, H.Y.; van DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T. 1998. Regulation of alcoholic fermentation in batch and chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis* CBS 23359. *Yeast*, 14: 459-469.
- KIM, S.; DALE, B.E. 2004. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass Bioenerg.* 26: 361-375.

- LACHANCE, M.A. 1998. *Kluyveromyces van der Walt* emend. *van der Walt*. In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W. (Eds.), *The Yeasts. A Taxonomic Study*. Elsevier, Amsterdam, pp. 227–247.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680–685.
- LE TRAON-MASSON, M.P.; PELLERIN, P. 1998. Purification and characterization of two β -D-glucosidases from an *Aspergillus niger* enzyme preparation: affinity and specificity toward glucosylated compounds characteristic of the processing of fruits. *Enzyme Microb Technol*. 22: 374–382.
- LI, Y.K.; LEE, J.A. 1999. Cloning and expression of β -glucosidase from *Flavobacterium meningosepticum*: a new member of family B β -glucosidase. *Enzyme Microb Technol*. 24: 144–150.
- LIU, S.Q. 2002. A review – Malolactic fermentation in wine – beyond deacidification. *J Appl Microbiol*. 92: 589–601.
- LLORENTE, B.; MALPERTUY, A.; BLANDIN, G.; ARTIGUENAVE, F.; WINCKER, P.; DUJON, B. 2000. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 12. *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*. *FEBS Lett*. 487: 71–75.
- LYND, L.R.; LASER, M.S.; BRANSBY, D.; DALE, B.E.; DAVISON, B.; HAMILTON, R.I. 2008. How biotech can transform biofuels. *Nat Biotechnol*. 26:169–172.
- LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; VAN ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*. 66: 506–577.
- LYND, L.R.; ZYL, W.H.; MCBRIDE, J.E.; LASER, M. 2005. Consolidated Bioprocessing Of Cellulosic Biomass: An Update. *Curr Opin Biotechnol*. 16: 577–583.
- MAMMA, D.; HATZINIKOLAOU, D.G.; CHRISTAKOPOULUS, P. 2004. Biochemical and catalytic properties of two intracellular β -glucosidases from the fungus *Penicillium decumbens* active on flavonoid glucosides. *J Mol Catal B Enzym*. 27:183–190.

- MARGARITIS, A.; BAJPAI, P. 1982. Direct fermentation of D-xylose to ethanol by *Kluyveromyces marxianus* strains. Appl Environ Microbiol. 44:1039–1041.
- MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresour Technol. 96: 673-686.
- NASCIMENTO, C.V.; SOUZA, F.H.M.; MASUI, D.C.; LEONE, F.A.; PERALTA, R.M.; JORGE, J.A.; FURRIEL, R.P.M. 2009. Purification and Biochemical Properties of a Glucose-Stimulated β -D-Glucosidase Produced by *Humicola grisea* var. *thermoidea* Grown on Sugarcane Bagasse. J Microbiol. 48: 53-62.
- NEMETH, K. et al. 2003. The glycosylation by small intestinal epithelial cell β -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. Eur J Nutr. 42: 29-42.
- NONKLANG, S.; ABDEL-BANAT, B.M.A.; CHA-AIM, K.; HOSHIDA, N.M.H.; LIMTONG, S.; YAMADA, M.; AKADA, R. 2008. High-Temperature Ethanol Fermentation And Transformation With Linear DNA In The Thermotolerant Yeast *Kluyveromyces Marxianus* DMKU3-1042. Appl Environ Microbiol. 74: 7514–7521.
- OH, K.B. et al. 1999. Isolation and properties of an extracellular β -glucosidase from a filamentous fungus, *Cladosporium resinae*, isolated from kerosene. Biosci Biotechnol Biochem. 63: 281-287.
- OLIVA, J.M.; BALLESTEROS, I.; NEGRO, M.J.; MANZANARES, P.; CABAÑAS, A.; BALLESTEROS, M. 2004. Effect of binary combinations of selected toxic compounds on growth and fermentation of *Kluyveromyces marxianus*. Biotechnol Prog. 20: 715–720.
- OLIVA, J.M.; SÁEZ, F.; BALLESTEROS, I.; GONZÁLEZ, A.; NEGRO, M.J.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M. 2003. Effect of lignocellulosic degradation compounds from steam explosion pretreatment on ethanol fermentation by thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. Appl Biochem Biotechnol. 141–153.

- OLSEN, S.N.; LUMBY, E.; McFARLAND, K.; BORCH, K.; WESTH, P. 2011. Kinetics of Enzymatic High-Solid Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass Studied by Calorimetry. *Appl Biochem Biotechnol.* 163: 626-635.
- ORTEGA, N.; BUSTO, M.D.; PEREZ-MATEOS, M. 2001. Kinetics of cellulose saccharification by *Trichoderma reesei* cellulases. *Int Biodeter Biodegr.* 47: 7-14.
- PAL, S.; BANIK, S.P.; GHORAI, S.; CHOWDHURY, S.; KHOWALA, S. 2010. Purification and characterization of a thermostable intra-cellular β -glucosidase with transglycosylation properties from filamentous fungus *Termitomyces clypeatus*. *Bioresour Technol.* 101: 2412–2420.
- PANDEY, M.; MISHRA, S. 1995. Cloning and expression of β -glucosidase gene from the yeast *Pichia etchellsii*. *J Ferment Bioeng.* 80: 446-453.
- PECOTA, D.C.; RAJGARHIA, V.; DA SILVA, N.A. 2007. Sequential gene integration for the engineering of *Kluyveromyces marxianus*. *J Biotechnol.* 127: 408–416.
- PONTOH, J.; LOW, N.H. 2002. Purification and characterization of β -glucosidase from honey bees (*Apis mellifera*). *Insect Biochem Mol Biol.* 32: 679-690.
- PORRO, D.; SAUER, M.; BRANDUARDI, P.; MATTANOVICH, D. 2005. Recombinant protein production in yeasts. *Mol Biotechnol.* 31: 245–259.
- RAJOKA, M.I.; MALIK, K.A. 2005. Double mutants of *Cellulomonas biazotea* for production of cellulases and hemicellulases following growth on straw of a perennial grass. *World J Microbiol Biotechnol.* 21: 1063-1066.
- REDDY, N.; YANG, Y. 2005. Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications. *Trends Biotechnol.* 23:22–27.
- RIOU, C. et al. 1998. Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Appl Environ Microbiol.* 64: 3607-3614.

- RUIZ-TERÁN, F.; PEREZ-AMADOR, I.; LÓPEZ-MUNGUÍA, A. Enzymatic extraction and transformation of glucovanillin to vanillin from vanilla green pods. *J Agric Food Chem.* 49: 5207-5209.
- RYU, D.D.Y.; MANDELS, M. 1980. Cellulases: biosynthesis and applications. *Enzyme Microb Technol.* 2: 91-102.
- SAHA, B.C.; BOTHAST, R.J. 1996. Production, Purification, and Characterization of a Highly Glucose-Tolerant Novel β -Glucosidase from *Candida peltata*. *Appl Environ Microbiol.* 62: 3165-3170.
- SAITOH, S.; TANAKA, T.; KONDO, A. 2008. Breeding of industrial diploid yeast strain with chromosomal integration of multiple β -glucosidase genes. *J Biosci Bioeng.* 106: 594–597.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 3a. Edição.
- SÁNCHEZ, O.J.; CARDONA, C.A. 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour Technol.* 99: 5270–5295.
- SÁNCHEZ-TORRES, P.; GONZÁLEZ-CANDELAS, L.; RAMÓN, D. 1998. Heterologous expression of a *Candida molischiana* anthocyanin- β -glucosidase in a wine yeast strain. *J Agric Food Chem.* 46: 354-360.
- SARRY, J.E.; GUNATA, Z. 2004. Plant and microbial glycoside hydrolases: volatile release from glycosidic aroma precursors. *Food Chem.* 87: 509-521.
- SASANUMA, I.; HIRAKAWA, G. 2010. Purification and characterization of a β -glucosidase from the root parasitic plant *Orobancha minor* Sm. *Biosci Biotechnol Biochem.* 74: 646-648.
- SESTELO, A.B.F.; POZA, M.; VILLAT, G. 2004. β -Glucosidase activity in a *Lactobacillus plantarum* wine strain. *World J Microbiol Biotechnol.* 20: 633-637.
- SHEN, X.; XIA, L. 2004. Production and immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger* ZU-07. *Process Biochem.* 39: 1363-1367.

- SINGHANIA R.R.; SUKUMARAN, R.K. et al. 2010. Advancements and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme Microb Technol.* 46: 541-549.
- SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. 1985. Measurement of protein using biciconinic acid. *Anal Biochemical.* 150: 76-85.
- SPAGNA, G. et al. 2000. Stabilization of a β -glucosidase from *Aspergillus niger* by binding to an amine agarose gel. *J Mol Catal B Enzym.* 11: 63-69.
- STENBERG, K., BOLLÓK, M., RÉCZEY, K., GALBE, M., ZACCHI, G. 2000. Effect of substrate and cellulase concentration on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated softwood for ethanol production. *Biotechnol Bioeng.* 68: 205– 210.
- STEPHANOPOULOS, G.N.; ARISTIDOU, A.A.; NIELSEN, J. 1998. *Metabolic Engineering: Principles and Methodologies*. San Diego: Academic Press.
- SUN, Y.; CHENG, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol.* 83:1-11.
- TAMOI, M.; KUROTAKI, H.; FUKAMIZO, T. 2007. β -1,4-Glucanase-like protein from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 is a β -1,3-1,4-glucanase and functions in salt stress tolerance. *Biochem J.* 405: 139–146.
- TOMÁS-PEJÓ, E.; GARCÍA-APARICIO, M.; NEGRO, M.J.; OLIVA, J.M.; BALLESTEROS, M. 2009. Effect of different cellulase dosages on cell viability and ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* in SSF processes. *Bioresour Technol.* 100: 890–895.
- van MARIS, A.J.A.; ABBOTT, D.A.; BELLISIMI, E.; van den BRINK, J.; KUYPER, M.; LUTTIK, M.A.H.; WISSELINK, H.W.; SCHEFFERS, W.A.; van DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T. 2006. *Alcoholic Fermentation of Carbon Sources In Biomass*

Hydrolysates By *Saccharomyces Cerevisiae*: Current Status. Antonie Van Leeuwenhoek. 90: 391-418.

WALKER, L.P.; WILSON D.B.; IRWIN D.C. 1990. Measuring fragmentation of cellulose by *Thermomonospora fusca* cellulase. Enzyme Microb Technol. 12:378–386.

WALLECHA, A.; MISHRA, S. 2003. Purification and characterization of two β -glucosidases from a thermo-tolerant yeast *Pichia etchellsii*. Biochim Biophys Acta. 1649: 74-84.

WEI, D.L. et al. 1996. Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from the wood-grown fungus *Xylaria regalis*. Curr Microbiol. 33: 297-301.

WEN, Z.; LIAO, W.; CHEN, S. 2004. Hidrolysis of animal manure lignocellulosics for reducing sugar production. Bioresour Technol. 91: 31-39.

WILSON, D.B. 2009. Cellulases and biofuels. Curr Opin Biotechnol. 20: 295-299.

WOODWARD, J.; WISEMAN, A. 1982. Fungal and other β -D-glucosidases: their properties and applications. Enzyme Microb Technol. 4: 73-79.

XIAO, Z.; ZHANG, X.; GREGG, D.J.; SADDLER, J.N. 2004. Effects of sugar inhibition on cellulases and β - glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. Appl Biochem Biotechnol. 115: 1115–1126.

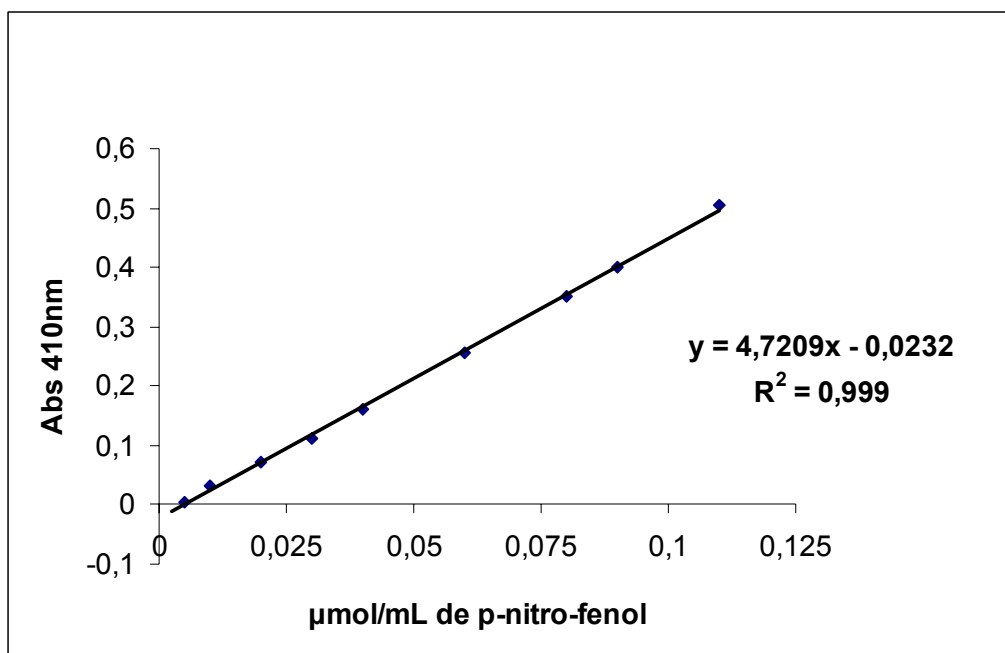
YAN, T.R.; LIAU, J.C. 1998. Synthesis of cello-oligosaccharides from cellobiose with β -glucosidase II from *Aspergillus niger*. Biotechnol Lett. 20: 591-594.

YIN, L.J.; HUANG, P.S. et al. 2010a. Isolation of cellulose-producing bacteria and characterization of the cellulase from the isolated bacterium *Cellulomonas* sp. YJ5. J Agric Food Chem. 58: 9833-9837.

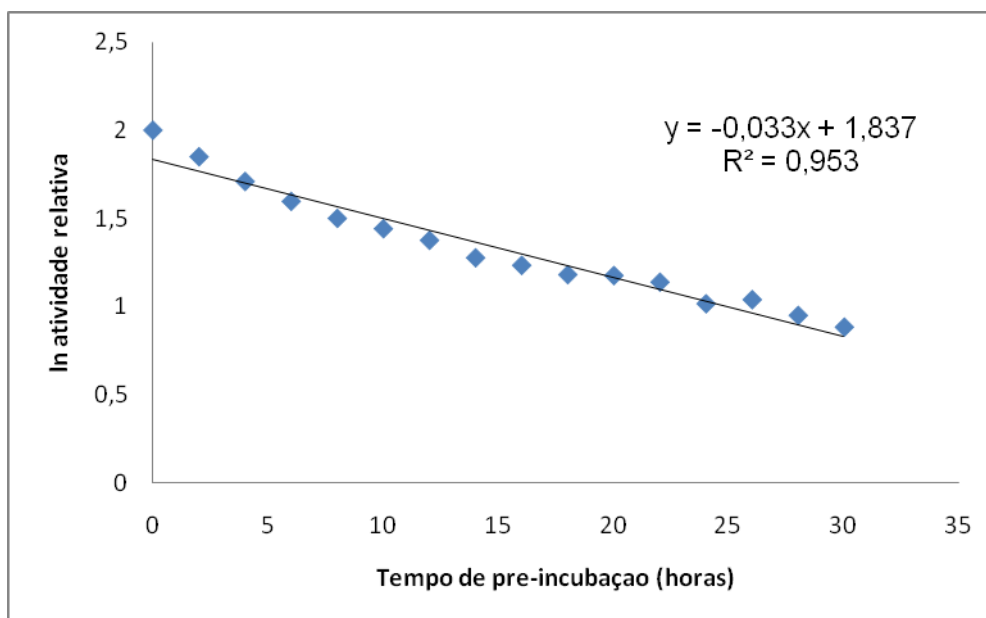
YIN; TIE; MIAO, L.; GUAN, F.; WANG, G.; PENG, Q.; LI, B.; GUAN, G.; LI, Y. 2010b. Optimized Medium Improves Expression and Secretion of Extremely Thermostable Bacterial Xylanase, XynB, in *Kluyveromyces lactis*. J Microbiol Biotechnol. 20: 1471-1480.

- YOSHINO, M. 1987. A graphical method for determining inhibition parameters for partial and complete inhibitors. *Biochem J.* 248: 815–820.
- YUN, S.I. et al. 2001. Purification and some properties of a β -glucosidase from *Trichoderma harzianum* type C-4. *Biosc Biotechnol Biochem.* 65: 2028-2032.
- ZANOELO, F.F. et al. 2004. B-glucosidase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose. *FEMS Microbiol Lett.* 240: 137-143.
- ZHANG, J.; YUAN, H.; WEN, T.; XU, F.; DI, Y.; HUO, K.; LI, Y.Y. 2003. Cloning of the KcURA3 gene and development of a transformation system for *Kluyveromyces cicerisporus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 62: 387–391.
- ZHANG, Y-H.P.; HIMMEL, M.E.; MIELENZ, J.R. 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnol Adv.* 24: 452–481.
- ZHANG, Y-H.P.; LYND, L.R. 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulose systems. *Biotechnol Bioeng.* 88: 797–824.

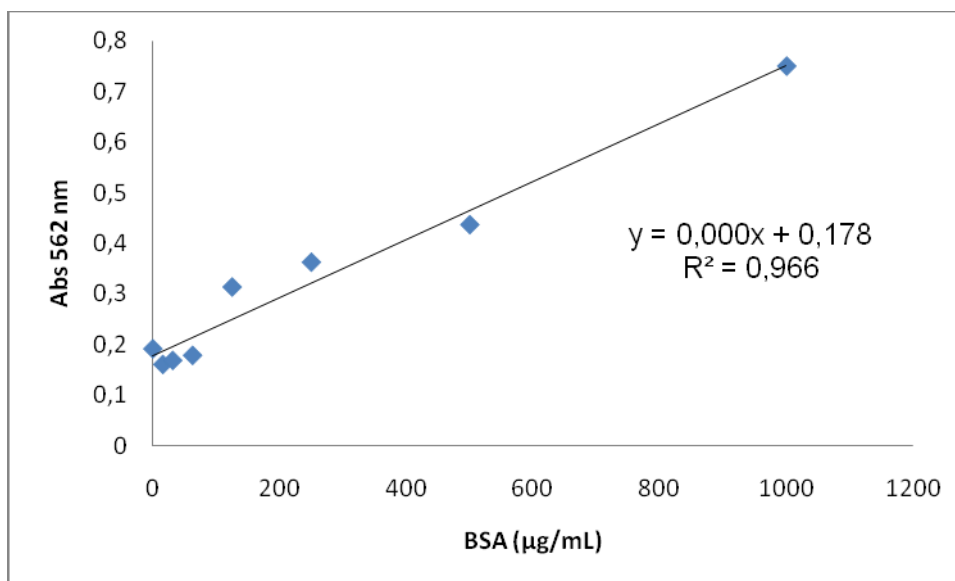
ANEXOS



Anexo I: Gráfico Absorvância 420nm x Concentração de p-nitrofenol em µmol/ml. Curva padrão utilizada para estimativa do valor de atividade de celulase pelo método do p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo descrito na metodologia.



Anexo II: Gráfico semi-logarítmico da atividade relativa x tempo de pré-incubação (à 60°C) em horas. Curva padrão utilizada para estimativa do tempo de meia-vida da BGL extracelular em horas.



Anexo III: Gráfico Absorvância 562 nm x concentração de soro albumina sérica (BSA) em µg/mL. Curva padrão utilizada para estimativa da concentração de proteínas solúveis totais.

	GL	SQ	SQ adj	QM adj	F	p
Regressão	6	190,094	190,094	31,6824	10,18	0,000
Linear	3	9,253	9,253	3,0845	0,99	0,415
Quadrática	3	180,841	180,841	60,2803	19,38	0,000
Erro residual	22	68,447	68,447	3,1112		
Falta de ajuste	8	60,795	60,795	7,5994	13,90	0,000
Erro Puro	14	7,652	7,652	0,5466		
Total	28	258,541				

Anexo IV: Tabela da Análise de Variância (ANOVA) da regressão dos dados obtidos na otimização da produção da BGL extracelular por *K. marxianus* UFV-3 (seção 4.1). **GL:** graus de liberdade. **SQ:** soma de quadrados. **SQ adj:** soma de quadrados ajustada. **QM adj:** Quadrado médio. **F:** valor calculado para o teste F da ANOVA. **p:** valor de probabilidade de erro na rejeição de H_0 .

	Coef	T	p
Constante	10,8913	16,797	0,000
Temp	0,4222	0,586	0,564
pH	-0,5069	-0,704	0,489
glicose	1,0522	1,461	0,158
Temp*Temp	-7,0741	-5,201	0,000
pH*pH	-8,5291	-6,271	0,000
glicose*glicose	-3,2335	-2,377	0,027

Anexo V: Tabela dos coeficientes codificados (**Coef**) com respectivo valor calculado para o teste T (**T**) e propabilidade de erro de rejeição de H_0 (**p**), determinados a partir dos dados obtidos na otimização da produção da BGL extracelular por *K. marxianus* UFV-3 (seção 4.1).

	GL	SQ	SQ adj	QM adj	F	p
Regressão	4	2416,10	2416,10	604,03	16,85	0,001
Linear	2	23,17	23,17	43,47	1,21	0,347
Quadrática	2	2392,93	2392,93	1196,47	33,37	0,000
Erro residual	8	286,84	286,84	35,85		
Falta de ajuste	4	270,07	270,07	67,52	16,10	0,010
Erro Puro	4	16,77	16,77	4,19		
Total	12	2702,94				

Anexo VI: Tabela da Análise de Variância (ANOVA) da regressão dos dados obtidos na determinação de temperatura e pH ótimos para atividade da BGL extracelular por *K. marxianus* UFV-3 (seção 4.2). **GL:** graus de liberdade. **SQ:** soma de quadrados. **SQ adj:** soma de quadrados ajustada. **QM adj:** Quadrado médio. **F:** valor calculado para o teste F da ANOVA. **p:** valor de probabilidade de erro na rejeição de H_0 .

	Coef	T	P
Constante	44,541	16,924	0,000
pH	-5,062	-1,515	0,168
temperatura	-1,720	-0,571	0,584
pH*pH	-28,932	-6,174	0,000
temperatura*temperatura	-29,674	-6,503	0,000

Anexo VII: Tabela dos coeficientes codificados (**Coef**) com respectivo valor calculado para o teste T (**T**) e probabilidade de erro de rejeição de H_0 (**p**), determinados a partir dos dados obtidos na determinação de temperatura e pH ótimos para atividade da BGL extracelular por *K. marxianus* UFV-3 (seção 4.2).