

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL – UFMS
Campus de CAMPO GRANDE
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR – PMBqBM - SBBq

ISABELA PAVÃO VARGAS

**Purificação, caracterização bioquímica e imobilização de uma
 β -glucosidase de *Rasamsonia composticola***

CAMPO GRANDE- MS
Maio -2021

ISABELA PAVÃO VARGAS

Purificação, caracterização bioquímica e imobilização de uma β -glucosidase de *Rasamsonia composticola*

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular - PMBqBM - SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador (a): Profa. Dra. Fabiana Fonseca Zanoelo

Campo Grande – MS
Maio – 2021

TERMO DE APROVAÇÃO

ISABELA PAVÃO VARGAS

Purificação, caracterização bioquímica e imobilização de uma β -glucosidase de *Rasamsonia composticola*

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM – SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Biologia Molecular).

28 de Maio de 2021

Comissão Examinadora:

Prof. Dra. Fabiana Fonseca Zanoelo (Presidente)

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-UFMS

Prof. Dr. Douglas Chodi Masui

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-UFMS

Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite

Universidade Federal da Grande Dourados-UGD

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser um Pai sempre presente, misericordioso e amoroso comigo, mesmo sem merecer, pois sem Ele nada teria feito.

Aos meus pais, e irmã por ser a base e o alicerce dessa família que com certeza é o meu maior tesouro, sou eternamente grata!

À todas minhas tias, tios e a minha avó Adelina, que sempre me apoiaram e ajudaram na minha criação.

Ao meu noivo Gustavo, por toda ajuda, carinho, conselhos e apoio em toda a minha vida acadêmica até aqui.

À minha orientadora querida, Fabiana Fonseca Zanoelo, por toda atenção, paciência, compreensão e ensinamentos em todos os anos de orientação, muito obrigada!

À todos professores, técnicos e colegas de laboratório, que ajudaram a solucionar minhas dúvidas durante os experimentos.

Ao Jonh por ser mais que um colega de laboratório que me ajudou muito desde o início da minha vida acadêmica, muito obrigada.

À Clarice por toda atenção e ajuda no cultivo dos fungos.

Às minhas amigas Thaynara e Lais, que contribuíram na minha caminhada, me dando forças, momentos descontraídos e conversas produtivas, obrigada.

A todos os meus amigos (as) que fiz nesses anos de vida acadêmica e a todos que eu tenho fora da faculdade, agradeço por todos os sucos, risos e choros que passamos. Com certeza a minha caminhada foi mais leve com vocês.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul -UFMS pela estrutura acadêmica.

Ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular.

Enfim, a todos que tornaram possível esse feito, meu muito obrigada!

*Confia no Senhor de todo o teu coração e não se apoie na sua
própria inteligência. Lembre-se de Deus em tudo que fizer e
Ele lhe mostrará o caminho.*

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	14
RESUMO	16
ABSTRACT	17
INTRODUÇÃO	18
REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 A biomassa lignocelulósica	21
2.2 Biodegradação dos resíduos lignocelulósicos	22
2.3 β -glucosidases	23
2.4 Produção de enzimas microbianas de interesse industrial e suas aplicações	25
2.4.1 Indústria de Papel	26
2.4.2 Indústria de Alimentos, Sucos e Vinhos	26
2.4.3 Produção do Etanol de Segunda Geração	27
2.5 Imobilização de enzimas	28
2.6 Fungos Filamentosos	30
2.7 O fungo termofílico <i>Rasamsonia composticola</i>	30
OBJETIVOS	32
OBJETIVO GERAL	32
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Cultivo e Manutenção do Microrganismo em Laboratório	33
4.2 Produção de Enzimas em Fermentação em Estado semi-sólido (FES)	33
4.3 Determinação da atividade de β -glucosidase	34
4.4 Quantificação de proteínas	34
4.5 Purificação da β -glucosidase de <i>Rasamsonia composticola</i>	34
4.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante (SDS-PAGE)	35

4.7 Análise por Zimograma	35
4.8 Caracterização Bioquímica da β -glucosidase Purificada	36
4.8.1 Efeito do pH na atividade e na estabilidade da enzima purificada	36
4.8.2 Efeito da temperatura na atividade e na termoestabilidade da enzima purificada	36
4.8.3 Efeito de íons, EDTA e EGTA na atividade enzimática	36
4.8.4 Efeito de solventes orgânicos na atividade enzimática	37
4.8.5 Efeito de surfactantes na atividade enzimática	37
4.8.6 Efeito dos agentes redutores na atividade enzimática	37
4.8.7 Efeito de substratos na atividade enzimática	37
4.8.8 Determinação da atividade de Celobiase por método da Glicose Oxidase (GOD)	38
4.8.9 Efeito de glicose e xilose na atividade β -glucosidase de <i>R. composticola</i> , e a β -glucosidase comercial Bgll de <i>Aspergillus niger</i> (Novozymes 188)	39
4.8.10 Análise dos Parâmetros Cinéticos da β -glucosidase de <i>R. composticola</i> na presença de glicose e xilose	39
4.9 Caracterização Bioquímica da β -glucosidase Imobilizada	39
4.9.1 Ativação do suporte glioxil agarose a partir da resina de agarose	39
4.9.2 Imobilização da enzima purificada	40
4.9.3 Efeito do pH na atividade da enzima imobilizada	40
4.9.4 Efeito da temperatura na atividade da enzima imobilizada	40
4.9.5 Reprodutibilidade dos Resultados	41
RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 Purificação da β -glucosidase de <i>Rasamsonia composticola</i>	42
5.2 Caracterização Bioquímica da β -glucosidase purificada de <i>R. composticola</i>	47
5.2.1 Efeito do pH na atividade e na estabilidade da enzima	47
5.2.2 Efeito da temperatura na atividade e na termoestabilidade da enzima purificada	49
5.2.3. Efeito de íons, EDTA e EGTA na Atividade Enzimática	51
5.2.4 Efeito dos Solventes Orgânicos, Surfactantes e Agentes Redutores na Atividade Enzimática	53

5.2.5 Especificidade aos Substratos	55
5.2.6 Efeito de glicose e xilose na atividade β -glucosidase de <i>R. composticola</i> , e a β -glucosidase comercial BgII de <i>Aspergillus niger</i> (Novozymes 188)	56
5.2.7. Avaliação de Parâmetros Cinéticos	60
5.3 Imobilização com glioxil agarose	61
5.3.1 Imobilização com glioxil agarose na presença de glicose	62
5.3.2 Efeito do pH na atividade da enzima imobilizada	63
CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da celulose (esquerda) e celobiose (direita) (SU & CAI, 2012)	18
Figura 2: Distribuição das microfibrilas dos resíduos lignocelulósicos (Adaptado de BOUDET <i>et al.</i> , 2003)	21
Figura 3: Modelo do complexo celulolítico agindo em sinergia para degradação completa da celulose (Modificado de ADEBAYO & MARTÍNEZ-CARRERA, 2015).....	23
Figura 4: Modelo da imobilização da enzima por ligação covalente multipontual: enzima ligada ao suporte por vários braços espaçadores (GUISAN <i>et al.</i> , 2006).....	29
Figura 5: Perfil Cromatográfico da β -glucosidase de <i>Rasamsonia composticola</i> em (A) DEAE-Fractogel e (B) Phenyl-Sepharose.....	45
Figura 6: Perfil eletroforético SDS-PAGE (10%) e Zimograma da β -glucosidase purificada de <i>Rasamsonia composticola</i> (KWON <i>et al.</i> , 1994)	46
Figura 7: Efeito do pH na atividade da β -glucosidase de <i>R. composticola</i>	47
Figura 8: Efeito da estabilidade ao pH na atividade da β -glucosidase de <i>R. composticola</i>	49

Figura 9: Efeito da temperatura na β -glucosidase de <i>R. composticola</i>	50
Figura 10: Estabilidade térmica da β -glucosidase de <i>R. composticola</i>	51
Figura 11: Efeito de glicose e xilose na atividade β -glucosidase de <i>R. composticola</i>	58
Figura 12: Efeito do pNP-Glu e pNP-Glu associado a glicose e xilose na atividade da β -glucosidase purificada de <i>R</i>	61
Figura 13: Imobilização da β -glucosidase de <i>R. composticola</i> com glioxil agarose.....	62
Figura 14: Imobilização da β -glucosidase de <i>Rasamsonia composticola</i> com glioxil agarose na presença de glicose.....	63
Figura 15: Efeito do pH na β -glucosidase livre e imobilizada de <i>R. composticola</i>	64
Figura 16: Efeito da temperatura na β -glucosidase livre e imobilizada de <i>R. composticola</i>	65

Figura 17: Termoestabilidade na atividade da β -glucosidase imobilizada de *R. composticola*.....66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela de purificação da β -glucosidase de <i>R. composticola</i>	46
Tabela 2: Efeito de sais na atividade da β -glucosidase de <i>R. composticola</i>	53
Tabela 3: Efeito de diferentes compostos químicos na atividade da β -glucosidase de <i>R. composticola</i>	55
Tabela 4: Efeito dos substratos na atividade da β -glucosidase de <i>R.</i> <i>composticola</i>	56
Tabela 5: Parâmetro cinéticos da β -glucosidase de <i>R. composticola</i>	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDA	Batata, dextrose e ágar
Bgl	β -glucosidase I
BglII	β -glucosidase II
BSA	Soroalbumina bovina
CAZy	Carbohydrate Active enzyme
CBH	Celobiohidrolase
DEAE	Dietilaminoetil
EDTA	Ácido Etilenodiamino tetra-acético
EGTA	Ácido aminopolicarboxílico
FES	Fermentação em estado semi-sólido
GH	Glicosil Hidrolase
ISSN	International Standard Serial Number
kDa	Quilodalton
L	Litro
mg/mL	Miligrama por mililitro
M	Molar
mM	Milimolar
mmol	Milimol
η m	Nanômetro
pH	Potencial Hidrogeniônico
<i>p</i> NP-Glc	<i>p</i> -nitrofenil- β -D- glucopiranosídeo
<i>p</i> NP-Xyl	<i>p</i> -Nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
Tris	Hidroximetilaminometano

Triton X-100	<i>t</i> - octilfenoxipolietoxietanol
TEMED	N, N, N', N -Tetrametiletlenodiamina
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μmol	Micromol
U mg^{-1}	Unidades de enzima por miligramas de proteína
U mL^{-1}	Unidades de enzima por mililitro de proteína
U	Unidades de enzima
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
%	Porcentagem

RESUMO

As β -glucosidases são enzimas que fazem parte do complexo celulolítico com a capacidade de atuar sobre materiais lignocelulósicos promovendo sua hidrólise. Essas enzimas são produzidas por microrganismos, principalmente os fungos filamentosos. Possuem variadas aplicações como na indústria de papel e celulose, alimentícia, ração animal e na produção de etanol de segunda geração. O presente trabalho descreve a purificação, características bioquímicas e imobilização de uma β -glucosidase produzida pelo fungo termofílico *Rasamsonia composticola*. A enzima foi purificada utilizando duas etapas cromatográficas, incluindo a troca iônica DEAE-Fractogel e hidrofóbica Phenyl-Sepharose. Foi purificada 19 vezes com rendimento final de 14%. A β -glucosidase purificada apresentou temperatura ótima de 70°C, permanecendo estável em temperaturas de 65 a 70°C durante até 8 horas, pH 5,0, e uma massa molecular de aproximadamente 45 kDa. A enzima não foi estimulada pela maioria dos compostos químicos testados, entretanto foi levemente estimulada pelos detergentes saponina e triton X-100, além dos quelantes EDTA e EGTA e o agente redutor Temed. A enzima apresentou atividade sobre os substratos sintéticos *p*NP-Glc e *p*NP-Xyl, e demonstrou ser tolerante a glicose e estimulada por xilose (1-100 mM). Os parâmetros cinéticos estimados para a β -glucosidase foram de K_m e V_{max} de 2,3 mM e 0,0221 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ para *p*NP-Glc. A eficiência catalítica (K_{cat}/K_m) da enzima foi de $7,7 \times 10^{-11}$. Para *p*NP-Glc + glicose e *p*NP-Glc + xilose a enzima apresentou K_m e V_{max} de 2,33 mM e 0,0271 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ e 2,02 mM e 0,0255 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, respectivamente. A enzima foi imobilizada em glioxil agarose cerca de 40% e 56% na presença de glicose durante 60 minutos. Demonstrou atividade ótima em pH 5,0 e 75°C. A enzima imobilizada apresentou estabilidade nas temperaturas de 75 a 80°C durante 60 minutos de reação. Os resultados demonstram que o fungo *Rasamsonia composticola* pode ser um candidato a contribuir para o conhecimento das propriedades de uma β -glucosidase com grande potencial de aplicação biotecnológica.

Palavras chave: *Rasamsonia composticola*, fungo termofílico, β -glucosidase, caracterização bioquímica.

ABSTRACT

β -glycosidases are enzymes that are part of the cellulolytic complex with the ability to act on lignocellulosic materials, promoting their hydrolysis. These enzymes are produced by microorganisms, mainly filamentous fungi. They have varied applications such as in the pulp and paper industry, food, animal feed and in the production of second generation ethanol. The present work involves the purification, biochemical characteristics and immobilization of a β -glucosidase resistant to the thermophilic fungus *Rasamsonia composticola*. The enzyme was purified using two chromatographic steps, including DEAE-Fractogel and hydrophobic Phenyl-Sepharose ion exchange. It was purified 19 times with a final yield of 14%. A purified β -glucosidase having an optimum temperature of 70 °C, remaining stable at a temperature of 65 to 70 °C for up to 8 hours, pH 5.0, and a molecular mass of approximately 45 kDa. The enzyme was not stimulated by most of the chemical compounds tested, however it was slightly stimulated by the detergents saponin and triton X-100, in addition to the chelators EDTA and EGTA and the reducing agent Temed. The enzyme has activity on the synthetic substrates *p*NP-Glc and *p*NP-Xyl, and is shown to be glucose tolerant and stimulated by xylose (1-100 mM). The estimated kinetic parameters for a β -glucosidase were K_m and V_{max} of 2.3 mM and 0.0221 $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$ for *p*NP-Glc. The catalytic efficiency (K_{cat} / K_m) of the enzyme was 7.7×10^{-11} . For *p*NP-Glc + glucose and *p*NP-Glc + xylose, the enzyme presented K_m and V_{max} of 2.33 mM and 0.0271 $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$ and 2.02 mM and 0.0255 $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg}$, respectively. The enzyme was immobilized in glyoxyl agarose about 40% and 56% in the presence of glucose for 60 minutes. It demonstrated optimal activity at pH 5.0 and 75 °C. The immobilized enzyme is stable at temperatures from 75 to 80 °C during 60 minutes of reaction. The results demonstrate that the fungus *Rasamsonia composticola* can be a candidate to contribute to the knowledge of the properties of a β -glucosidase with great potential for biotechnological application.

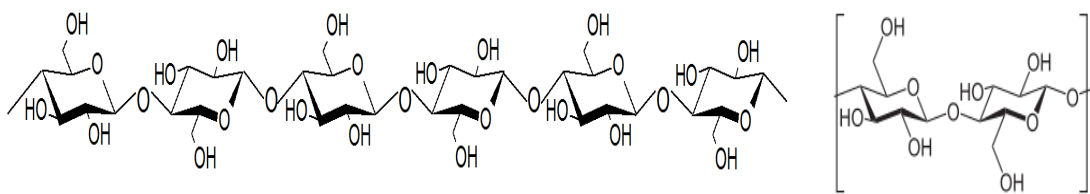
KEYWORDS: *Rasamsonia composticola*, thermophilic fungi, β -glucosidase, biochemical characterization.

1. INTRODUÇÃO

Os resíduos lignocelulósicos geram um grande problema ambiental por não terem um destino de descarte adequado. Com isso, a utilização desses resíduos tem se mostrado uma solução sustentável e econômica para a indústria biotecnológica, como sua utilização na produção de ração animal e etanol de segunda geração (PAMIDIPATI, 2018; LIEW *et al.*, 2018). Esses resíduos são constituídos principalmente de celulose, hemicelulose e lignina, além de pectina, compostos fenólicos, proteínas e outros que estão firmemente aderidos uns aos outros impedindo que haja a ação de enzimas degradativas (SINGHANIA *et al.*, 2013).

Dentre os componentes dos resíduos lignocelulósicos, o mais abundante é a celulose, que é encontrada em todos os organismos vegetais com funções estruturais e de sustentação. A celulose é um polissacarídeo linear constituído de moléculas de celobiose que são dímeros de glicose ligados uns aos outros através de ligações β -1,4-glicosídicas (WOJTUSIK *et al.*, 2019) (Figura 1).

Figura 1. Estrutura química da celulose (esquerda) e celobiose (direita)



Fonte: Adaptado: SU & CAI. 2012

As responsáveis pela hidrólise dessas ligações são as enzimas do complexo celulolítico, que agem a fim de se obter glicose como produto final. Este complexo inclui enzimas como: exoglucanases, celobiohidrolases, endoglucanases e β -glucosidases (BGLs) (SOLHTALAB *et al.*, 2019). Dentre estas, as β -glucosidases (EC 3.2.1.21) fazem parte das glicosil hidrolases (GHs) e estão envolvidas na manutenção das funções fisiológicas normais dos organismos (SANTOS *et al.*, 2019). Estas desempenham um papel único,

convertendo a celobiose em glicose, que é o passo final na hidrólise de celulose (WANG *et al.*, 2013).

As BGLs são categorizadas nas famílias GH1, GH3, GH5, GH9, GH30 e GH116 de um total de 153 listadas atualmente no site (<http://www.cazy.org/>) *Carbohydrate Active enzyme* (CAZy) (LIEW *et al.*, 2018). Além disso, são normalmente classificadas de acordo com a especificidade ao seu substrato: as aril-beta-glicosidases agem sobre os glicosídeos de arila, as celobioses que hidrolisam dissacarídeos de cadeia pequena e as β -glucosidases que possuem atividades em uma ampla gama de substratos (GUO *et al.*, 2015). No entanto, mais recentemente foi proposto uma classificação baseada no efeito da glicose sobre a β -glucosidase, sendo agrupadas da seguinte forma: tolerante à glicose, inibido por altas concentrações de glicose, estimulado por baixas concentrações de glicose e inibido por altas concentrações de glicose ou não inibido por altas concentrações de glicose. A base molecular que desvende a tolerância das β -glucosidases à glicose ainda não é totalmente conhecida, porém esta característica é muito importante quando se trata de conversão da biomassa em larga escala, pois este processo requer enzimas que mantenham altas taxas catalíticas sob altas concentrações de glicose (SANTOS *et al.*, 2019; SALGADO *et al.*, 2018).

Devido a esta diversidade de substratos e a sua capacidade em hidrolisar ligações glicosídicas, as β -glucosidases têm sido alvo de interesse das indústrias (BHATIA *et al.*, 2002). As β -glucosidases são amplamente estudadas e utilizadas para diversas aplicações, incluindo nas indústrias de alimentos, rações, têxteis e papel. Fazem parte de diversos processos biotecnológicos, como na liberação de alguns compostos aromáticos presentes em frutas e produtos de fermentação (SINGHANIA *et al.*, 2013), melhorando sua viscosidade e sabor (CHEN *et al.*, 2013). Outra aplicação importante está envolvida com a produção de etanol de segunda geração (DE ANDRADES *et al.*, 2019).

Uma desvantagem no uso de enzimas em sua forma solúvel é sua separação para posterior aplicação, já que normalmente são solúveis em água e devido a sua natureza proteica, algumas enzimas apresentam instabilidade em determinadas condições reacionais. A imobilização tem sido muito utilizada para aumentar a manutenção e a estabilidade das enzimas, bem como sua

reutilização em vários processos, uma vez que a sua produção e purificação é um processo bastante trabalhoso (MENDES *et al.*, 2011). Essa técnica consiste no confinamento da enzima em um suporte sólido para posterior reutilização, tornando o processo menos dispendioso (GUISAN, 2006).

As enzimas podem ser imobilizadas de duas principais formas, como o aprisionamento e formação de ligação. No aprisionamento adiciona-se a enzima a uma malha polimérica, que será posteriormente polimerizada, mantendo a enzima presa a esta matriz solidificada. O encapsulamento, é quando se utiliza uma matriz, que pode ser de alginato, no qual aprisiona-se a enzima em cápsulas, já o microencapsulamento consiste na imobilização de uma ou diferentes enzimas em microcápsulas (GUISAN, 2006).

Dentre as técnicas de formação de ligação, a adsorção é a interação da enzima com o substrato através de ligações fracas, como forças de van der Waals, ligações de hidrogênio, forças eletrostáticas e forças hidrofóbicas. Existe também imobilização por ligação covalente e ligação cruzada, todas estas técnicas contam com múltiplos fatores para que uma imobilização seja bem sucedida (MENDES *et al.*, 2011).

Atualmente a maior parte das β -glucosidases estudadas e comercializadas, foram isoladas de cepas fúngicas (CRESPIM *et al.*, 2016). Os fungos termofílicos, que crescem em temperaturas elevadas, são importantes recursos biológicos naturais capazes de produzir enzimas termoestáveis, que são utilizadas nas indústrias devido ao fato de produzirem moléculas mais termoestáveis quando comparados aos microrganismos mesofílicos (MAHESHWARI *et al.*, 2000). Um exemplo destes é o *Rasamsonia composticola*, uma espécie de fungo exclusivamente termofílico cuja temperatura ideal para o crescimento está entre 45 a 50°C, e ainda se destaca como um excelente produtor de enzimas dos complexos celulolíticos e hemicelulolíticos (SU & CAI, 2012).

Em vista desses fatos, neste estudo foram realizados a purificação, caracterização bioquímica e imobilização da β -glucosidase do fungo termofílico *Rasamsonia composticola* utilizando resíduos agroindustriais como fonte de carbono.

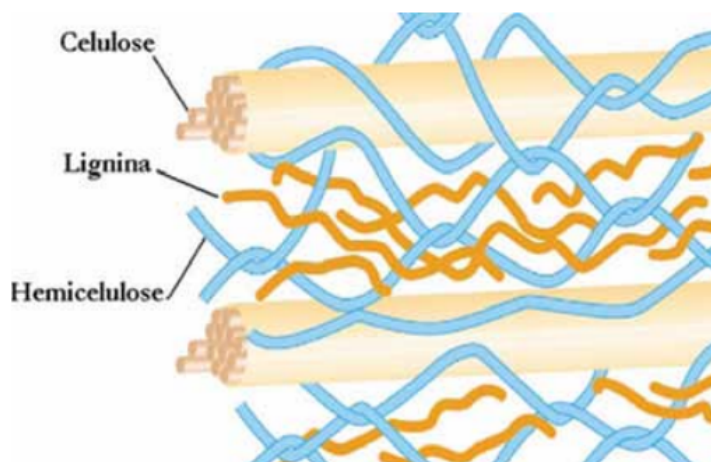
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica está presente nas paredes celulares de plantas e, portanto, é a fonte de energia renovável mais abundante na natureza. Contudo, os resíduos lignocelulósicos têm gerado um grande problema nos dias atuais por não possuírem um destino de descarte adequado (SRIVASTAVA *et al.*, 2019). Nesse contexto, a degradação da biomassa e sua utilização em vários setores da indústria como na produção de ração animal, indústria têxtil, de sucos e vinhos e o etanol de segunda geração é de suma importância (PAMIDIPATI, 2018; LIEW *et al.*, 2018).

São exemplos de biomassa lignocelulósica os resíduos gerados através de atividades agrícolas, municipais, industriais ou florestais. Estes resíduos são constituídos predominantemente por dois polissacarídeos, a celulose (50%) e hemicelulose (20-25%) (SRIVASTAVA *et al.*, 2019). Possuem também, lignina (20-30%), juntamente com uma porção menor de pectina e proteínas (KOUPAIE *et al.*, 2019). A celulose está presente em todas as células vegetais e é formada por moléculas de glicose unidas através de ligações glicosídicas β -1,4 como mostra a Figura 2.

Figura 2. Distribuição das microfibrilas dos resíduos lignocelulósicos



Fonte: Adaptado de BOUDET *et al.*, 2003

A hemicelulose contém aproximadamente 150 unidades de monossacarídeo de repetição (açúcar C5 e C6) e o tipo de açúcar monomérico presente varia de acordo com os tipos de materiais. A celulose é um polímero linear de alto peso molecular, composto de β -D-glicose (5.000-10.000 unidades) ligadas por ligações O-glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4) (TAKELLAPATI *et al.*, 2018). Além disso, a celulose é de natureza altamente cristalina, tornando difícil a sua conversão em açúcares menores através dos processos de hidrólise (BRETHAUER & STUDER, 2015).

Em geral, para completa degradação da biomassa lignocelulósica é necessário um pré-tratamento que pode ser feito através de métodos físicos, químicos ou biológicos utilizando enzimas (PAMIDIPATI, 2018).

2.2 Biodegradação dos resíduos lignocelulósicos

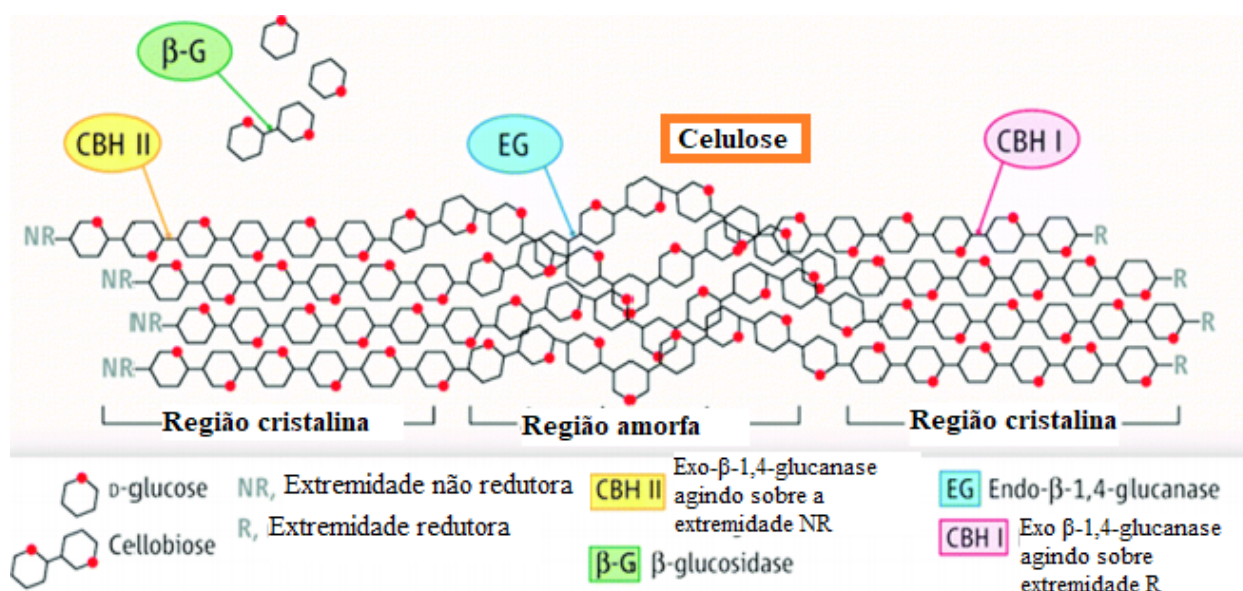
Os métodos físicos utilizados para o pré-tratamento dos resíduos lignocelulósicos envolvem a ruptura das estruturas das lignoceluloses através de uma alta entrada de energia como a extrusão ou cavitação (PATIL *et al.*, 2016). Os métodos químicos mais frequentemente utilizados, envolvem tratamento alcalino e/ou ácido. Embora seja eficaz, os tratamentos químicos não são sustentáveis e possuem um alto custo para produção em larga escala (SRIVASTAVA *et al.*, 2019).

O pré-tratamento biológico baseia-se na inoculação de microrganismos (bactérias ou fungos) produtores de enzimas que degradam os componentes da parede celular dos resíduos lignocelulósicos, tornando o processo ecológico e sustentável (SILVA, 2019). Embora várias enzimas como celulases, hemicelulases, ligninases e pectinases participem ativamente da conversão enzimática da biomassa, o complexo celulolítico é o mais importante na degradação desses resíduos, devido à sua eficiência em realizar a hidrólise completa da celulose em glicose (SINGHANIA *et al.*, 2013).

O complexo celulolítico compreende várias enzimas hidrolíticas que desempenham funções distintas na hidrólise completa da celulose. As endoglucanases (endo-1,4- β -glucanases: EG; EC 3.2.1.4) agem sobre a região amorfa da celulose hidrolisando ligações β -1,4-glicosídicas. As exoglucanases

ou celobiohidrolases (exo-1,4- β -glucanases; CBH; EC 3.2.1.91) atuam na região cristalina da celulose, clivando as ligações glicosídicas a partir da extremidade da molécula, e liberando unidades de glicose e celobiose, sendo divididas em CBH1 (atuam nas extremidades redutoras da molécula) e CBH2 (atuam nas extremidades não redutoras). Por fim, o papel final para completa degradação da celulose é desempenhado pelas β -glucosidases (BGLs EC 3.2.1.21) que atuam sobre a celobiose e os celo-oligossacarídeos, liberando moléculas de glicose (BINOD *et al.*, 2019; SRIVASTAVA *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2013). Um esquema do complexo celulolítico agindo em sinergia para hidrólise da celulose pode ser visualizado na Figura 3.

Figura 3. Modelo do complexo celulolítico agindo em sinergia para degradação completa da celulose.



Fonte: Modificado de ADEBAYO *et al.*, 2015.

2.3 β -glucosidases

As β -glucosidases são enzimas amplamente encontradas em Archeas, Eubacterias, a Eucariotos e estão envolvidas em diferentes processos celulares (LIEW *et al.*, 2018). Esta família de enzimas pode hidrolisar ligações glicosídicas de alquil-, amino- ou aril- β -D-glicosídeos, glicosídeos cianogênicos, dissacarídeos e oligossacarídeos (SALGADO *et al.*, 2018). Em determinadas condições, pode ocorrer a síntese de uma ligação glicosídica entre diferentes

moléculas através da hidrólise reversa ou transglicosilação (BHATIA *et al.*, 2002).

Em bactérias e fungos, as β -glucosidases podem hidrolisar celo-oligosacarídeos e celobiose (KETUDAT & ESENT, 2010), em plantas as β -glucosidases participam do processo de amadurecimento de frutos, na emissão de fragrâncias em flores, na quebra de glicolipídeos e na interação planta-microrganismo e planta-inseto (SINGH *et al.*, 2016). Já nos humanos as β -glucosidases realizam a hidrólise de glicosil ceramidas (glicocerebrosídeos) e outros glicosídeos conjugados (ZHAO & GRABOWSKI, 2002).

Em geral, foram descritos três sistemas de classificação para as β -glucosidases (SINGH *et al.*, 2016; SINGHANIA *et al.*, 2013). No primeiro sistema, a classificação é baseada na especificidade em relação ao substrato, sendo classificada em três grupos distintos; as aril- β -glucosidases, que clivam preferencialmente ligações aril-glicosídeos, como *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (*p*NP-Glu), as celobiasas verdadeiras que desempenham um papel na conversão da celobiose em glicose e as enzimas de ampla especificidade de substrato, que abrangem a maioria das β -glucosidases caracterizadas (BHATIA *et al.*, 2002).

O segundo sistema de classificação, é baseado na identidade da sequência de aminoácidos e na estrutura tridimensional (3D) das enzimas (HENRISSAT, 1991). Essa classificação é amplamente aceita e pode ser acessada através do Carbohydrate Site da Active Enzyme (CAZY) (<http://www.cazy.org/>) (CANTAREL *et al.*, 2009). De acordo com essa classificação as glicosil hidrolases são atualmente divididas em 164 famílias onde as β -glucosidases fazem parte principalmente das famílias GH1 e GH3, tendo menor representação nas famílias GH 2, 5, 9, 30, 39 e 116 (SINGH *et al.*, 2016; TEUGJAS & VALJAME, 2013). Apesar desses sistemas serem amplamente utilizados, não levam em consideração aspectos funcionais importantes das β -glucosidases, como a tolerância ou estimulação pela glicose. A partir disso, foi proposto uma classificação que atendesse as características com base nos efeitos da glicose sobre sua atividade catalítica, que foram divididas em quatro classes: (I) as β -glucosidases fortemente inibidas por baixas concentrações de glicose, (II) β -glucosidases tolerantes à glicose, (III) β -glucosidases estimuladas por baixas concentrações de glicose e inibidas por

altas concentrações de glicose; e (IV) as β -glucosidases não inibidas pela glicose em altas concentrações (SALGADO *et al.*, 2018).

As β -glucosidases da classe I, fortemente inibidas por baixas concentrações de glicose, apresentam valores de K_i (constante de inibição) para glicose inferiores a 0,1 M, já as β -glucosidases da classe II, tolerantes a glicose, apresentam valores de K_i para glicose superiores a 0,1 M. No geral, as β -glucosidases tolerantes à glicose apresentam atividade catalítica máxima em torno de 40 a 65°C e pH de 4,5 a 6,5, e hidrolisam preferencialmente o substrato sintético 4- nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (p NP-Glc) ao invés do seu substrato natural celobiose (SALGADO *et al.*, 2018; BHATIA *et al.*, 2002).

As β -glucosidases da classe III, estimuladas por baixas concentrações de glicose e inibidas por altas concentrações deste monossacarídeo, são encontradas predominantemente nas famílias GH1. A sua estimulação pela concentração de glicose varia dependendo da β -glucosidase e está normalmente na faixa de concentração de 20 a 500 mM. As β -glucosidases de classe IV, não inibidas por altas concentrações de glicose, mantém sua atividade catalítica sempre maior na presença de glicose do que na ausência em toda gama de concentrações de glicose testadas na literatura (SALGADO *et al.*, 2018).

Devido a sua diversidade de substratos e capacidade em hidrolisar e sintetizar ligações glicosídicas, as β -glucosidases possuem um variado conjunto de aplicações biotecnológicas, principalmente pela sua participação na conversão biológica da celulose, e isto destaca a importância dos estudos voltados a catálise e regulação desta enzima, visto que suas propriedades cinéticas limitam sua aplicação em processos biotecnológicos (BHATIA *et al.*, 2002).

2.4 Produção de enzimas microbianas de interesse industrial e suas aplicações

As β -glucosidases produzidas por microrganismos são de grande interesse industrial devido a suas diversas aplicações. Elas têm mostrado um enorme potencial biotecnológico, pois podem ser usadas com diversas finalidades, como degradação de materiais lignocelulósicos, nas indústrias de papel, detergentes, sucos e vinhos, aditivos na ração animal, extração de

compostos flavonoides e na produção de etanol de segunda geração (BHATIA *et al.*, 2002).

2.4.1 Indústria de Papel

Para separar os resíduos de tinta do papel utiliza-se de processos químicos agressivos ao meio ambiente, como hidróxido de sódio, peróxidos, reagentes quelantes e vários surfactantes que consomem uma grande quantidade de energia e água. Isso porque a tinta usada na impressão é um copolímero de estireno e acrilato e esses polímeros se fundem com fibras de celulose durante a impressão (PALA *et al.*, 2004).

Com isso, o uso de enzimas como as β -glucosidases, nesse setor tem se tornado um processo bem-sucedido por ser um processo econômico e ecológico. As β -glucosidases atuam hidrolisando as fibras de celulose presentes na superfície do papel, e em conjunto com as demais celulasas e xilanases removem os resíduos de tinta. Esse processo também é chamado de *peeling* das fibras ou desfibrilação. Quando comparado com o processo químico, o uso das enzimas também resulta em uma celulose de alta qualidade, melhor qualidade de fibra, melhor brilho e menor quantidade de partículas residuais de sujeira (BAJAJ & MAHAJAN, 2019; MELEIRO *et al.*, 2014).

2.4.2 Indústria de Alimentos, Sucos e Vinhos

Na indústria alimentícia a utilização de gelano, um exopolissacarídeo de origem bacteriana com função espessante, estabilizante, emulsificante e gelificante, é bastante limitada devido a sua alta viscosidade e baixa solubilidade. O uso de β -glucosidases pode ser útil para produção de alimentos que contém gelano de baixa viscosidade. Hashimoto *et al.* (1998) utilizou as β -glucosidases produzidas por *Bacillus* sp. para catalisar a clivagem do trissacarídeo glicosilmanosil-glicose (produzido pela ação da gelano-liase e glicosidases extracelulares) para liberar glicose e ramnosil-glicose, reduzindo assim a viscosidade (HASHIMOTO *et al.*, 1998; BHATIA *et al.*, 2002).

As β -glucosidases também são utilizadas como suplementação na ração animal e juntamente com outras enzimas (celulasas, xilanases, amilases) agem

digerindo a parede celular dos vegetais, liberando açúcar além de outros nutrientes para a célula. A suplementação da ração com enzimas torna os nutrientes da ração mais absorvíveis, e portanto, menos quantidade de alimento é necessária para o ganho de peso dos animais (BHATIA *et al.*, 2002; BEDFORD & PARTRIDGE, 2010; SUJANI & SERESINHE, 2015).

As β -glucosidases também são utilizadas para remoção do amargor dos sucos de frutas cítricas, catalisando a hidrólise da naringina (4,5,7-trihidroxiflavanona-7-ramnoglicosídeo) em prunina (ROITNER *et al.*, 1984).

Alimentos como maçãs, uvas, sucos de frutas e vinhos possuem uma fração livre de terpenóis voláteis, como também precursores de glicosídeos naturais não odoríferos e não voláteis. Estas são fontes importantes de compostos perfumados. A suplementação com β -glucosidases fúngicas na fabricação de vinhos, causa a liberação da porção aglicona aumentando a liberação do aroma, processo que geralmente é lento e incapaz de liberar todo reservatório de sabor, beneficiando assim o processo de vinificação (BHATIA *et al.*, 2002; GUNATA *et al.*, 1985).

2.4.3 Produção do Etanol de Segunda Geração

Com o surgimento da necessidade de energia alternativa devido à crise mundial de combustíveis fósseis, a utilização de β -glucosidases na produção de bioetanol ou etanol de segunda geração, ganhou destaque nos últimos anos, por ser a enzima chave para a hidrólise celulósica (SINGHANIA *et al.*, 2013; TAHERZADEH & KARIMI, 2008).

A hidrólise enzimática da celulose é um processo complexo, que envolve um conjunto de enzimas que trabalham em sinergia em várias etapas, sendo a última etapa uma reação de catálise da β -glucosidase sobre a celobiose (LYND *et al.*, 2002). A celobiose é um forte inibidor das celobiohidrolases e endocelulases, e a ação das β -glucosidases pode reduzir o seu efeito inibitório (SINGHANIA *et al.*, 2013).

O processo de produção de biocombustível celulósico inclui a quebra da biomassa lignocelulósica em glicose, seguida pela produção de biocombustível por meio do processo de fermentação (SRIVASTAVA *et al.*, 2019).

Com a suplementação de β -glucosidases para remoção da celobiose há uma melhora na eficiência da conversão de biomassa em etanol, pois a uma redução do feedback de inibição e repressão das celulases mediadas pela celobiose (SINGHANIA *et al.*, 2013). Por este motivo, para atingir o objetivo na produção de etanol de segunda geração, muitos pesquisadores têm trabalhado em diferentes cepas de microrganismos produtores de β -glucosidases, dentre eles os fungos filamentosos, a fim de se obter uma β -glucosidase eficaz no processo de produção de bioetanol (SRIVASTAVA *et al.*, 2019).

2.5 Imobilização de enzimas

As enzimas são catalisadores com propriedades excepcionais (alta atividade, seletividade e especificidade) que podem ser utilizadas para aquisição de uma grande variedade de produtos de interesse industrial. Contudo, para serem aplicadas em diferentes setores da indústria, as enzimas em geral devem ser estáveis a altas temperaturas, de fácil recuperação e reutilização para tornar o processo economicamente viável (MATEO *et al.*, 2010).

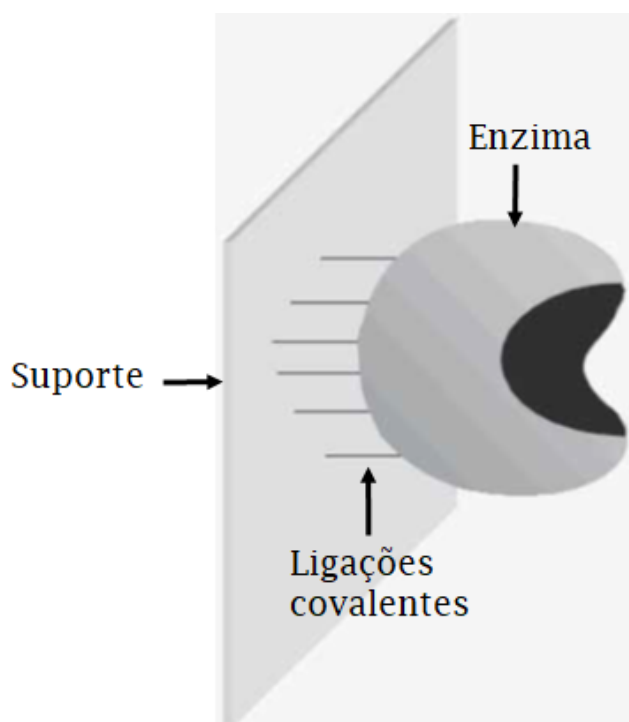
O termo “imobilização enzimática” é usado para denotar enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em uma determinada região com a manutenção de sua atividade catalítica e que pode ser utilizada repetidamente (ZERBINI *et al.*, 2020). Uma enzima imobilizada pode apresentar várias vantagens em relação à enzima livre, como uma maior estabilidade, atividade e diminuição ou até mesmo eliminação de alguns tipos de inibição. Além disso, a imobilização possibilita a reutilização da mesma enzima, em alguns casos diversas vezes, e essa característica faz com que seu custo fique diluído, tornando o processo economicamente viável (MATEO *et al.*, 2005; GUIBAN, 2006).

A imobilização enzimática, ainda que seja uma técnica poderosa para a estabilização de enzimas, deve ser desenvolvida de forma adequada, ou pode levar a perda total de atividade enzimática (LÓPEZ *et al.*, 2005).

Os suportes de glioxil têm sido descritos como um sistema de imobilização muito adequado para produzir proteínas via ligação covalente multipontual (MATEO *et al.*, 2010). Esse tipo de imobilização visa imobilizar e

estabilizar enzimas simultaneamente através de ligações da enzima a um suporte rígido através de muitas ligações covalentes por meio de “braços espaçadores” curtos (MATEO *et al.*, 2010; GRAZU *et al.*, 2006) como mostra a Figura 4.

Figura 4. Modelo da imobilização da enzima por ligação covalente multipontual: enzima ligada ao suporte por vários braços espaçadores.



Fonte: Modificado de GUIBAN *et al.*, 2006.

A imobilização de enzimas em suportes de glioxil em condições alcalinas promove uma orientação no suporte que a enzima fica imobilizada através de sua superfície ou regiões contendo maior número de resíduos de lisina. Essa orientação ocasiona uma intensa ligação covalente multipontual (GUIBAN, 2006) Empregando esse suporte é possível então, orientar a enzima de várias formas, permitindo a obtenção do derivado mais estável e adequado ao uso industrial pretendido (MATEO *et al.*, 2010; GUIBAN, 2006).

2.6 Fungos Filamentosos

Os fungos filamentosos são organismos heterotróficos (decompositores de matéria orgânica ou parasitas) que crescem rapidamente sobre diferentes tipos de solo e apresentam uma diversidade evidente no que se refere a sua morfologia, bioquímica e fisiologia, cuja importância para processos biotecnológicos é incontestável. Podem ser classificados de acordo com sua temperatura ótima de crescimento como mesófilos, termofílicos e termotolerantes (SILVA *et al.*, 2006, VANDAMME *et al.*, 2009).

Os fungos filamentosos termofílicos crescem em altas temperaturas e são preferíveis em processos industriais, uma vez que suas enzimas possuem atividade catalítica capazes de agir em condições extremas de pH e temperatura. Além disso, seus compostos de interesse podem ser obtidos a um baixo custo de produção (MAHESHWARI *et al.*, 2000).

As enzimas termoestáveis são interessantes, devido ao aumento da temperatura nos processos industriais desestabilizar a parede celular e melhorar a penetração da enzima, além de reduzir o risco de contaminação microbiana (TURNER *et al.*, 2007; COLLINS *et al.*, 2005). Diversos fungos filamentosos têm a capacidade de expressar diferentes isoformas da β -glucosidase, dependendo das condições de cultivo e/ou fonte de carbono, assim a descoberta de novas β -glucosidases fúngicas são de grande importância (MAHESHWARI *et al.*, 2000).

Os fungos filamentosos mais utilizados na produção de β -glucosidases, são pertencentes ao gênero *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Penicillium* e *Fusarium* (SINGHANIA *et al.*, 2013).

2.7 O fungo termofílico *Rasamsonia composticola*

A espécie termofílica utilizada neste trabalho é o fungo *R. composticola*. O gênero *Rasamsonia* é composto por seis espécies, na qual cinco destas foram transferidas do gênero *Talaromyces* ou *Geosmithia* (HOUBRAKEN *et al.*, 2012).

Rasamsonia composticola foi isolado pela primeira vez de uma compostagem de palha de arroz e esterco bovino em Yunnan na China por Yuan-Ying Su e Lei Cai. Sua caracterização e isolamento foram publicados na revista *Mycol Progress* em 2012. Sua classificação taxonômica atualizada,

baseada em dados do site *Mycobank* segue a seguinte ordem decrescente de classificação: Fungi, Dikarya, Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycetes, Eurotiomycetidae, Eurotiales, Trichocomaceae e *Rasamsonia* (MYCOBANK, 2020).

As espécies de *Rasamsonia* são morfológicamente caracterizadas pelo ascomato esférico marrom-oliva com as paredes de conidióforos amorfos (HOUBRAKEN *et al.*, 2012). O fungo *R. composticola* é um fungo termofílico pois apresenta temperatura ótima de crescimento na faixa de 45 a 50°C, sendo o máximo de crescimento a 55°C e o mínimo a 30°C. Pode ocorrer tanto na forma assexuada, com a formação de esporos assexuais ramificados, e sexuada através de ascósporos hialinos ou globóides dentro de estruturas chamadas de ascos (SU & CAI, 2012).

Rasamsonia composticola está mais intimamente relacionada com *Rasamsonia emersonii* compartilhando cerca de 92 a 93% de identidade nas sequências ITS e TUB2, respectivamente (SU & CAI, 2012). Ele também foi definido como um organismo GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*), em 2014.

O fungo *R. composticola* foi cedido pela UNESP de São José do Rio Preto, onde estudos preliminares demonstraram que possui uma grande capacidade em produzir enzimas, dentre elas as β -glucosidases. Por se tratar de uma espécie nova, identificada no ano de 2012 por Su e Cai, o fungo possui características promissoras a serem exploradas e descritas na literatura. Diante disso, foram realizadas neste trabalho a purificação, caracterização bioquímica e imobilização da β -glucosidase do fungo termofílico *R. composticola* utilizando resíduos agroindustriais como fonte de carbono.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Purificação, caracterização bioquímica e imobilização de uma β -glucosidase do fungo termofílico *R. composticola*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i) Purificar a enzima β -glucosidase
- ii) Caracterizar bioquimicamente a enzima purificada, quanto ao efeito do pH e temperatura, estabilidade térmica e ao pH, especificidade por substratos, sais, surfactantes, solventes orgânicos e efeito da glicose e xilose
- iii) Determinar as constantes cinéticas de Michaelis-Menten (K_m) e velocidade máxima (V_{max})
- iv) Analisar o grau de purificação por eletroforese em condição desnaturante (SDS-PAGE) e Zimograma
- v) Imobilizar a β -glucosidase em suporte de Glioxil-agarose
- vi) Avaliar a termoestabilidade e estabilidade ao pH da enzima imobilizada

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivo e Manutenção do Microrganismo em Laboratório

O fungo *R. composticola*, isolado e identificado molecularmente de acordo com Murray e Thompson (1980) na UNESP de São José do Rio Preto - SP, foi gentilmente cedido à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e preservado em laboratório por meio de repiques periódicos. Os repiques em meio sólido foram mantidos em tubos de ensaio contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA) em estufa bacteriológica a 50°C por um período de 5-7 dias. Posteriormente, foram armazenados em geladeira à 4°C, podendo ser utilizados por um período de até 30 dias.

4.2 Produção de Enzimas em Fermentação em Estado semi-sólido (FES)

Para produção das enzimas, o fungo *R. composticola* foi crescido em frascos Erlenmeyers de 1.000 mL contendo 20 g de fonte de carbono (farelo de trigo e farelo de arroz, na proporção 1:1) e 40 mL de água deionizada para manutenção da umidade. O material foi devidamente autoclavado por 20-30 min a 127 °C. Os conídios foram obtidos a partir de uma suspensão aquosa, acrescentando-se 10 mL de água destilada estéril no tubo raspando-se a superfície da cultura com uma pipeta. O volume de 10 mL dessa suspensão contendo 10⁸ conídios foram utilizados para inóculo no meio semi-sólido. Os frascos após o inóculo foram mantidos em estufa bacteriológica à 50 °C durante 96 horas. A umidade do cultivo foi mantida em torno de 70% e monitorada utilizando-se um termohigrômetro.

Após o período, os meios foram ressuspensos em 100 mL de água destilada e homogeneizadas levemente com um bastão de vidro em banho de gelo por 20 minutos e filtrados em peneira de nylon. A amostra foi centrifugada por 20 minutos a 10.000 g a 4 °C e seu sobrenadante utilizado como fonte de enzima extracelular.

4.3 Determinação da atividade de β -glucosidase

A atividade de β -glucosidase foi determinada inicialmente a temperatura de 60 °C em tampão acetato de sódio 100 mM final, pH 5,0, contendo o substrato sintético *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (*p*NP-glc) 2 mM em volume final de 250 μ L. Para o início da reação foi adicionado 10 μ L da enzima diluída 10 vezes, a 60 °C durante 10 minutos. Posteriormente a reação foi interrompida pela adição de 60 μ L da solução de tetraborato de sódio saturado. Controles sem a adição da enzima foram utilizados a fim de se estimar a hidrólise não catalisada pela enzima. A leitura da absorbância foi realizada em Leitor de Microplacas (Spectramax Plus 384- Molecular Devices) a 410 nanômetros (nm) contra um branco que representa o tempo zero da reação. Uma unidade de atividade enzimática (1U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 μ mol de nitrofenol por minuto de reação.

4.4 Quantificação de proteínas

A concentração de proteína foi determinada empregando-se o método de Bradford (1976) a 590 nm utilizando-se albumina bovina sérica (BSA) como padrão. A unidade de concentração de proteína foi definida em mg de proteína/mL.

4.5 Purificação da β -glucosidase de *Rasamsonia composticola*

Inicialmente para purificação da β -glucosidase de *R. composticola* foram realizados testes de precipitação com etanol gelado e sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄ nas concentrações de 30 a 80%. O extrato bruto (10 mL) foi submetido a precipitação e conservado “overnight” sob refrigeração à 4 °C. Logo após, o material foi centrifugado a 10.000 g (10-20 minutos), seu sobrenadante descartado e seu “*pellet*” seco à temperatura ambiente utilizando-se concentrador de amostra (*Speed vacuum* concentrador eppendorf). Depois de seco a amostra foi dialisada contra água para remoção de sais e então utilizado para dosagem protéica e atividade β -glucosidásica.

Dessa forma, a padronização da purificação do extrato bruto de *R. composticola* envolveu procedimentos clássicos de cromatografia por troca

aniônica e hidrofóbica. Inicialmente, cerca de 250 mL de extrato bruto foi previamente equilibrado em tampão Tris-HCl 10 mM em pH 8,0 e aplicado em coluna de troca iônica DEAE-Fractogel (Merck) (1,5 x 5 cm), pré-equilibrada com o mesmo tampão e eluída com gradiente de 0-2 M de NaCl. Frações de 1 mL foram coletadas por tubo, e submetidas a leitura de proteína a 280 nm e atividade de β -glucosidase. Os tubos contendo maior atividade enzimática foram reunidos e dialisados contra água.

Posteriormente, a amostra foi pré-equilibrada em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 com acréscimo de 2 molar de NaCl e aplicada em coluna de interação hidrofóbica Phenyl Sepharose (*cross linked*, G&E) (1 x 9,8 cm), equilibrada com o mesmo tampão da amostra e eluída com gradiente de 2-0 M de NaCl. Foram coletadas frações de 1 mL por tubo, que foram dosados quanto à atividade enzimática e leitura de proteína a 280 nm. Os tubos que apresentaram maior atividade enzimática foram reunidos, dialisados contra água e utilizados para análise de pureza, e caracterização enzimática.

4.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante (SDS-PAGE)

A pureza das frações obtidas a cada passo cromatográfico foi analisada por eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE 10%) de acordo com o método descrito por Laemmli (1970). Foram aplicadas aproximadamente 10,7 μ g de proteína, e os géis foram corados com nitrato de prata (BLUM *et al.*, 1987). As proteínas foram aplicadas no gel e a migração das bandas foi comparada com peso molecular de 30 a 110 kDa. Os marcadores moleculares utilizados foram: β -Galactosidase (110 kDa), Fosforilase B (60 kDa), Albumina sérica bovina (45 kDa) e Anidrase Carbônica (30kDa) (Sigma-Aldrich C4861).

4.7 Análise por Zimograma

A detecção da atividade β -glucosidásica foi realizada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%), como descrito no item 4.6. Após a corrida, o gel foi incubado durante 30 minutos em isopropanol 10% para a remoção do SDS presente no gel. Em seguida o gel foi incubado à 50 °C com esculina

0,1% e cloreto férrico 0,03% (KWON *et al.*, 1994) para visualização da banda de atividade.

4.8 Caracterização Bioquímica da β -glucosidase Purificada

4.8.1 Efeito do pH na atividade e na estabilidade da enzima purificada

O pH ótimo para a atividade da β -glucosidase purificada foi determinado incubando-se 10 μ L da enzima, inicialmente à 60 °C com diferentes valores de pH utilizando-se tampão McIlvaine (1921) variando o pH de 3,0 a 8,0 com incremento de 0,5 para cada pH. A estabilidade ao pH foi analisada incubando-se a enzima em tampão McIlvaine pH 3,0 a 8,0 (com incremento de 0,5) com sob refrigeração (4 °C) durante os tempos de 15 minutos a 24 horas.

Todos os testes foram realizados em triplicata conforme descrito no item 4.3. Os resultados foram expressos em atividade relativa, considerando a maior atividade como 100%.

4.8.2 Efeito da temperatura na atividade e na termoestabilidade da enzima purificada

A temperatura ótima para a enzima purificada foi investigada em temperaturas de 50 a 75 °C, com variação de 5 °C. A estabilidade térmica foi determinada incubando-se a enzima diluída em água em diferentes intervalos de tempo (15 minutos a 8 horas). Posteriormente, a atividade enzimática foi dosada nas condições ótimas de pH e temperatura. Os resultados foram expressos em atividade relativa, sendo o controle 100% a temperatura com maior valor de atividade enzimática.

4.8.3 Efeito de íons, EDTA e EGTA na atividade enzimática

A atividade de β -glucosidase purificada foi avaliada na presença de íons nas concentrações de 1 e 5 mM, nas condições ótimas de ensaio. A ação quelante do ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e ácido aminopolicarboxílico (EGTA) também foi analisada nas mesmas concentrações. Posteriormente, a atividade enzimática foi realizada nas condições ótimas de pH e temperatura. Os resultados foram expressos em

atividade relativa, sendo o controle 100% sem adição de sais e/ou EDTA e EGTA.

4.8.4 Efeito de solventes orgânicos na atividade enzimática

Para avaliar o efeito de solventes orgânicos, a enzima foi incubada na proporção de 1:1 com os solventes: Acetona, Acetonitrila, Etanol e Metanol em concentrações de 5 e 10%. A mistura foi incubada em temperatura ambiente por 1 hora. Posteriormente, a atividade de β -glucosidase foi dosada conforme condições ótimas de ensaio. Os resultados foram expressos em atividade relativa, sendo o controle 100% sem adição de solvente.

4.8.5 Efeito de surfactantes na atividade enzimática

O efeito dos surfactantes na atividade de β -glucosidase foi analisado na presença de Saponina, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e Triton X-100 previamente diluídos na concentração final de 5%. A enzima e os surfactantes, na proporção 1:1, foram incubados durante 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente a atividade enzimática foi estimada conforme condições ótimas de ensaio, e os resultados foram expressos em atividade relativa, sendo o controle 100% sem adição de surfactantes.

4.8.6 Efeito dos agentes redutores na atividade enzimática

O efeito dos compostos Mercaptoetanol e Temed foram testados na atividade da β -glucosidase nas concentrações de 1 e 5 mM. A enzima foi incubada durante 10 minutos com as substâncias, e atividade enzimática realizada conforme condições ótimas de ensaio. Os resultados foram expressos em atividade relativa, sendo o controle 100% sem adição de inibidores.

4.8.7 Efeito de substratos na atividade enzimática

A atividade de β -glucosidase foi realizada utilizando-se os seguintes substratos: Celobiose, Amido, celulose microcristalina (Avicel), Carboximetil

celulose (CMC), Pectina, Xilana, Maltose, Sacarose, Lactose, Trealose a 1% e o substrato sintético *p*-Nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (*p*NP-Xyl) devidamente diluídos em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. A dosagem deu-se através da reação com ácido 3',5' dinitrosalicílico (DNS), descrito por Miller (1959), onde 10 μ L de amostra enzimática foi incubada com 90 μ L de tampão com substrato a 70°C durante 5 e 10 minutos. Posteriormente, foi adicionado 100 μ L de DNS, e as amostras foram fervidas durante 10 minutos. A leitura da absorbância foi realizada em Leitor de Microplacas a 540 nanômetros (nm) contra um branco que representa o tempo zero da reação. Os testes foram feitos em triplicata e os resultados expressos em atividade relativa. Para o substrato *p*-Nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (*p*NP-Xyl) a metodologia utilizada está descrita no item 4.3.

4.8.8 Determinação da atividade de Celobiase por método da Glicose Oxidase (GOD)

Inicialmente incubou-se a enzima com o substrato celobiose 50 mM diluído em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 na proporção 1:1 a 70°C durante 10 minutos. Logo em seguida, adicionou-se 1 mL do reagente GOD e incubou-se a reação em banho-maria a 37 °C durante 10 minutos. Em seguida, a glicose liberada foi estimada através do método da glicose-oxidase (BERGMEYER *et al.*, 1974) utilizando o *Kit Labtest® Glicose PAP ref 84. O produto da reação, antipirilquinonimina vermelha, proporcional à glicose liberada pela enzima, foi detectado em 505 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de glicose por minuto. A atividade específica foi definida como a relação entre o número de unidades e a massa de proteína, em miligramas, presente no meio de reação.

4.8.9 Efeito de glicose e xilose na atividade β -glucosidase de *R. composticola*, e a β -glucosidase comercial BgII de *Aspergillus niger* (Novozymes 188)

Foram avaliados o efeito de glicose e xilose sobre atividade da β -glucosidase purificada de *R. composticola*, e a β -glucosidase comercial BgII de *A. niger*, principal componente do preparado comercial rico em β -glucosidasas (NOVOZYMES SP 188; NOVO NORDISK A/S, BRAGSVAERD, DANMARK). Suas atividades foram avaliadas conforme descrito no item 4.3. Foram adicionados ao meio de reação glicose e xilose nas concentrações de 1–100 mM. Os resultados foram expressos em atividade relativa, sendo o controle 100 % sem adição de glicose e xilose.

4.8.10 Análise dos Parâmetros Cinéticos da β -glucosidase de *R. composticola* na presença de glicose e xilose

As características cinéticas da β -glucosidase foram determinadas pelo cálculo da equação de Michaelis-Menten. Todos os ensaios foram feitos em microplacas nas condições ótimas de pH e temperatura. Foi utilizado o substrato sintético *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (*p*NP-Glc, Sigma-Aldrich, USA), glicose e xilose nas concentrações de 0,25 –7 mM.

Os resultados obtidos foram ajustados a uma regressão não-linear e os parâmetros cinéticos foram calculados utilizando-se o software SigrafW (LEONE *et al.*, 2005). O gráfico apresentado foi realizado utilizando o GraphPad Prims 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4.9 Caracterização Bioquímica da β -glucosidase Imobilizada

4.9.1 Ativação do suporte glioxil agarose a partir da resina de agarose

A resina estoque de agarose cross-linked (CL6B) foi lavada com água deionizada e filtrada com bomba a vácuo. A resina (105 g) foi suspensa em água em volume final de 180 mL. A suspensão foi misturada com homogeneização branda com 50 mL de NaOH 1,7 mol.L⁻¹ e borohidreto de sódio (NaBH₄). Logo após, a solução foi tratada com glicidol (36 mL) adicionado lentamente (gota a gota) em banho de gelo onde permaneceu sendo agitada cuidadosamente em temperatura ambiente por 18 horas. Ao

final, a suspensão contendo gliceril-agarose formada foi lavada com água deionizada e seca utilizando a bomba a vácuo. Para oxidação da gliceril-agarose em glioxil-agarose, 10 g de gliceril agarose foi adicionada a solução de 50 mL de periodato de sódio (NaIO_4) 100 mM e agitada cuidadosamente por 2 horas à temperatura ambiente. O suporte de glioxil-agarose obtido foi lavado com água deionizada, seco e estocado a 4°C.

4.9.2 Imobilização da enzima purificada

A imobilização da enzima em suporte monofuncional de glioxil-agarose foi realizada inicialmente pelo ajuste da solução de 5 mL da enzima purificada em 5 mL da solução de bicarbonato de sódio 100 mM, pH 10,0. A solução de proteína obtida foi adicionada a 1 g de suporte de glioxil-agarose e cuidadosamente agitada a temperatura ambiente. Periodicamente, amostras foram coletadas (amostra suspendida e filtrada) e a atividade enzimática medida. Quando a imobilização foi completada, o derivado foi reduzido por 30 minutos com 1 mg.mL⁻¹ de NaBH_4 , lavado com água deionizada, seco e estocado a 4°C. Alternativamente, a enzima foi imobilizada na presença de glicose 50 mM, nas mesmas condições descritas acima.

4.9.3 Efeito do pH na atividade da enzima imobilizada

O pH ótimo para a atividade da enzima foi determinado em diferentes soluções tampão (pH 3,0 a 8,0) em concentração final de 50 mM contendo *p*NP-Glc 2 mM como descrito no item 4.3. Os resultados foram expressos em atividade relativa.

4.9.4 Efeito da temperatura na atividade da enzima imobilizada

A temperatura ótima para atividade enzimática foi determinada na temperatura de 60° a 80°C. A estabilidade térmica foi estudada por incubação da enzima em diferentes intervalos de tempo (10 -60 minutos) a temperatura de 65 a 75°C. A atividade residual foi determinada.

4.9.5 Reprodutibilidade dos Resultados

Os resultados obtidos representam as médias e desvio padrão de pelo menos 3 experimentos independentes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Purificação da β -glucosidase de *Rasamsonia composticola*

Para se conhecer as propriedades bioquímicas e cinéticas de uma enzima como pH e temperatura ótimos, K_m e V_{max} , é necessário antes passar por um processo de purificação. Após a manutenção da linhagem de *R. composticola*, e o crescimento em meio semi-sólido, previamente padronizado, para a obtenção do extrato bruto rico em β -glucosidases, deu-se início ao processo de purificação a fim de se obter uma maior quantidade de enzima purificada ao final do processo. Inicialmente, o extrato bruto foi submetido a dois métodos de precipitação utilizando-se sulfato de amônio $(NH_4)_2SO_4$ e etanol gelado nas concentrações de 30 a 80%. Contudo, os métodos de precipitação não se mostraram eficientes para a purificação da β -glucosidase, e não foram utilizados nos experimentos subsequentes (dados não apresentados).

Com isso, as amostras obtidas a partir do extrato bruto, passaram por dois métodos cromatográficos, em resina troca aniônica e hidrofóbica, DEAE-Fractogel e Phenyl-Sepharose, respectivamente (Figura 5a e 5b) até a obtenção de uma β -glucosidase purificada. O resumo das etapas de purificação é apresentado na Tabela 1.

Ao aplicar uma quantidade do extrato bruto de 381 U totais na resina de troca iônica DEAE-Fractogel, foram obtidos dois picos de atividade enzimática, um antes e outro após o gradiente. A enzima que não interagiu com a coluna foi denominada BGL I (tubos 40-75), e a enzima eluída com solução salina (aproximadamente 1 M de NaCl) foi denominada BGL II (tubos 250-261) como apresentado na Figura 5a. A BGL II apresentou 93% de recuperação, 351 U totais e um fator de purificação de 13 vezes após essa etapa cromatográfica, e por isso escolhido para dar continuidade com o processo de purificação.

Com isso, os tubos contendo as frações da BGL II foram reunidos, dialisados contra água e equilibrados com tampão Tris-HCl 10 mM com 2 M de NaCl pH 8,0 para aplicação na Phenyl-Sepharose previamente equilibrada com mesmo tampão (Figura 5b). O valor de purificação após a aplicação e

eluição na coluna hidrofóbica foi de 19 vezes com um rendimento de 14%, como demonstrado na Tabela 1.

O rendimento e o fator de purificação foram superiores ao valor obtido pela purificação de duas β -glucosidases do fungo *Aspergillus* sp. YDJ216 que obteve um fator de purificação de 5,6 e um rendimento de 3,4% para ambas enzimas (OH, 2018). Nesse caso, a quantidade de processos cromatográficos pode ter implicado para um melhor rendimento da β -glucosidase de *R. composticola*, já que foi purificada em apenas duas etapas, enquanto o fungo *Aspergillus* sp. YDJ216 precisou de quatro etapas cromatográficas (OH, 2018).

Dessa maneira, conclui-se que com apenas 2 etapas cromatográficas, que incluíram resina de troca aniônica e hidrofóbica, foram eficientes na purificação da β -glucosidase de *R. composticola*. São raras as β -glucosidase que são purificadas com apenas uma ou duas etapas cromatográficas, como é o caso da β -glucosidase *unbgl* que obteve 94,7% de pureza (LU *et al.*, 2013). Quanto maior o número de etapas cromatográficas maior o custo e tempo para obtenção da enzima purificada. Dessa maneira, a padronização do processo de purificação da β -glucosidase de *R. composticola* realizado neste trabalho permite a obtenção de grande quantidade de enzimas purificadas a um baixo custo e bom rendimento.

O primeiro critério de pureza empregado foi a análise eletroforética da β -glucosidase em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE 10%). Como observado na Figura 6, a β -glucosidase de *R. composticola* foi purificada até a homogeneidade apresentando uma única banda protéica após coloração com nitrato de prata. O perfil eletroforético da amostra contendo a atividade no gel (Figura 6) também corrobora com a hipótese de que trata-se da mesma enzima. De acordo com a migração da proteína no gel, a massa molecular estimada é de aproximadamente 45 kDa.

Vários autores relatam diferentes massas moleculares para as β -glucosidases de microrganismos, que podem variar de 12 até 350 kDa (BHATIA *et al.*, 2002). Esses valores foram semelhantes aos encontrados nas β -glucosidases dos fungos *Humicola grisea*, *Scytalidium thermophilum* e *Humicola insolens* (PERALTA *et al.*, 1997; ZANOELO *et al.*, 2004; MELEIRO *et al.*, 2017), que apresentaram massas moleculares de 55 kDa, 40 kDa e 45 kDa, respectivamente. Algumas cepas do fungo filamentosso *Aspergillus*, conhecido

por sua alta produção enzimática, produz β -glucosidases com massas moleculares que variam de 43 kDa de *Aspergillus ochraceus* MTCC 1810 (ASHA *et al.*, 2016), 50 e 125 kDa de *Aspergillus nidulans* (KWON *et al.*, 1992) 96 kDa (WITTE *et al.*, 1989), até 123 kDa de *Aspergillus niger* KCCM 11239, respectivamente (CHANG *et al.*, 2012).

Essas diferenças entre as massas moleculares dos fungos, podem ser atribuídas a alguns fatores, dentre eles a presença de glicosilação, e modificação pós-traducional da proteína. No entanto, apenas um estudo mais detalhado das posições e conteúdo de carboidratos traria informações conclusivas a este respeito (MELEIRO *et al.*, 2017). Diante disso, a massa molecular da β -glucosidase de *R. composticola*, conforme determinado no presente estudo, encontra-se dentro da faixa média em comparação com os valores acima relatados.

Figura 5. Perfil Cromatográfico da β -glucosidase de *R. composticola* em (A) DEAE-Fractogel e (B) Phenyl-Sepharose. (o) Absorbância em 280 nm (●) Atividade enzimática em 410 nm (U/mL).

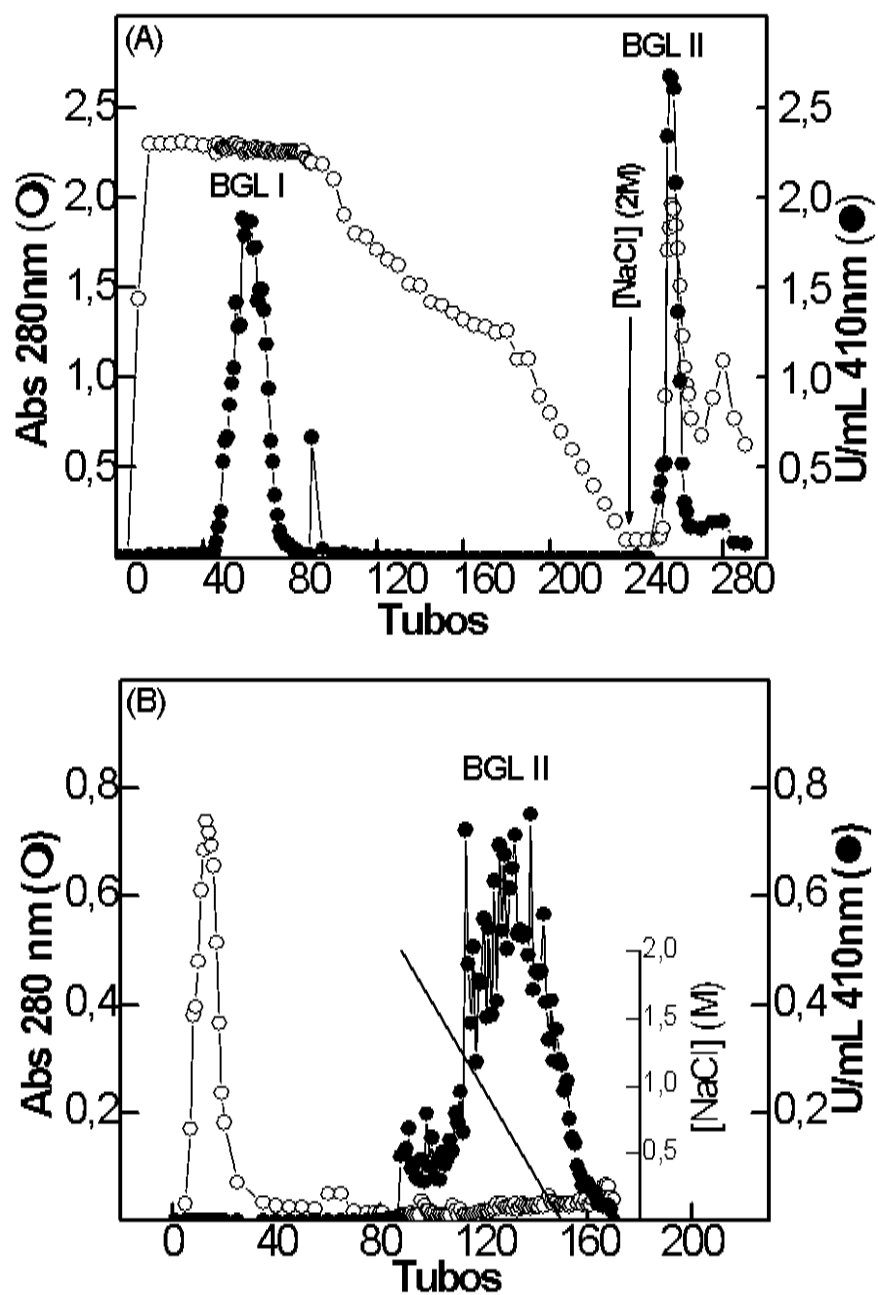


Figura 6. Perfil eletroforético SDS-PAGE (10%) da β -glucosidase purificada de *R. composticola*. (a) Padrão de peso molecular; (b) Extrato bruto; (c) DEAE-Fractogel; (d) Phenyl-Sepharose (gel corado com prata) e (e) zimograma corado com esculina 0,1% e cloreto férrico 0,03% (KWON *et al.*, 1994).

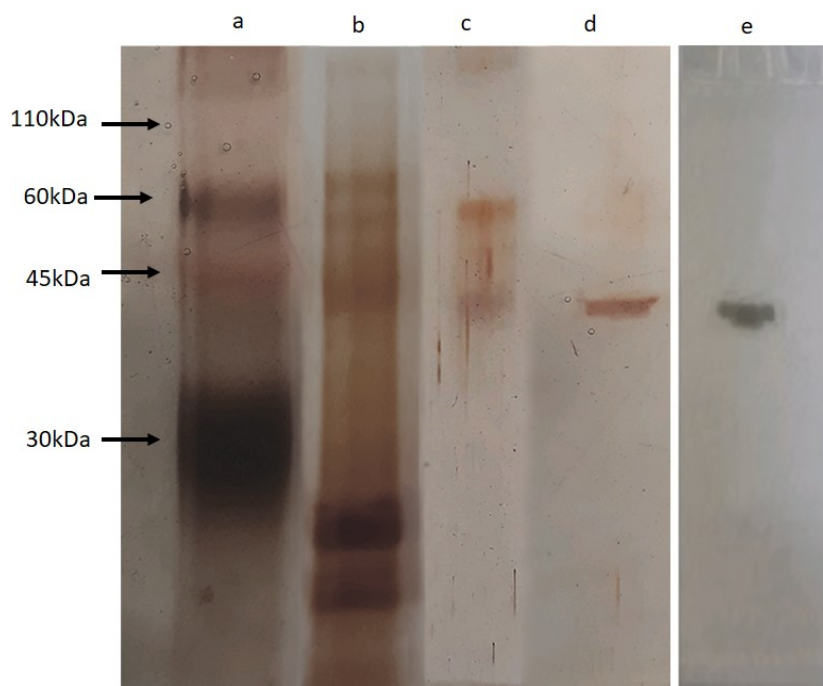


Tabela 1. Tabela de purificação da β -glucosidase de *R. composticola*

Amostra	Atividade Total (U)	Proteínas Totais (mg)	Atividade Específica (U/mg)	Rendimento (%)	Purificação (vezes)
Extrato Bruto	381	64	6	100	1
DEAE- Fractogel	354	4,7	75	93	13
Phenyl-Sepharose	55	0,5	112	14	19

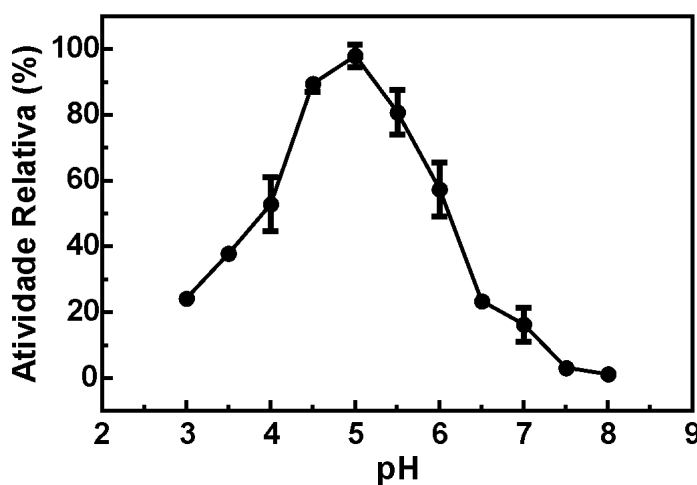
5.2 Caracterização Bioquímica da β -glucosidase purificada de *R. composticola*

5.2.1 Efeito do pH na atividade e na estabilidade da enzima

Neste trabalho, o pH ótimo determinado para a enzima purificada foi de 5,0 (0,36 U/mL) (Figura 7), mesmo valor de pH ótimo do seu extrato bruto (dados não mostrados). Ao passar a faixa de pH para 5,5 a enzima manteve 72% (0,35 U/mL) de sua atividade relativa e em pH 6,0, 50% (0,24 U/mL). Contudo, a enzima perdeu quase completamente a sua atividade catalítica quando o pH foi aumentado para 7,5, demonstrando apresentar um caráter ácido.

Valores de pHs ótimos na região ácida, parece ser uma característica aparente das β -glucosidase fúngicas, como observado em *A. niger* (NARASIMHA *et al.*, 2016), *Humicola brevis* (MASUI *et al.*, 2012) e *A. versicolor* (OLIVEIRA *et al.*, 2018), que apresentaram pHs 5,0 e 6,0, respectivamente.

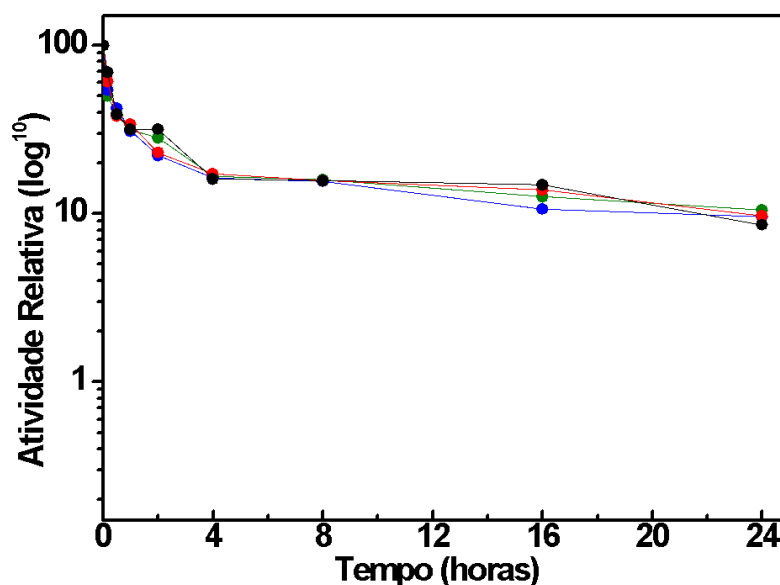
Figura 7. Efeito do pH na atividade da β -glucosidase de *R. composticola*. A atividade da enzima foi estimada à 60°C utilizando tampão Mcllvaine (pH 3,0 ao 8,0).



O pH do meio reacional interfere diretamente na interação do substrato ao sítio ativo da enzima, e conseqüentemente no processo catalítico. Ao utilizarmos faixas de pHs diferentes, a enzima altera a sua conformação e pode tornar-se mais suscetível a ligação com o substrato, conferindo atividade ao local ativo, enquanto a dissociação de outros grupos pode dificultar a atividade enzimática (MELEIRO *et al.*, 2017).

A estabilidade ao pH foi avaliada após a incubação da enzima em tampão por um período de 24 horas nos pHs 5,0- 6,5. A enzima purificada manteve 50% de sua atividade após 30 minutos de incubação nos pHs 5,0 e 5,5; e 69 % em pH 6,0 e 6,5 (Figura 8). Contudo, permaneceu estável com 30% de sua atividade em todos pHs avaliados por um período de 60 minutos. De 4 a 8 horas a enzima se manteve com 20% de sua capacidade catalítica em todos os pHs avaliados, chegando a 10% em 24 horas. O mesmo não acontece para a β -glucosidase do fungo termofílico *Humicola insolens*, que permaneceu estável no pH 5,0 a 8,0 durante 24 horas (SOUZA *et al.*, 2010). Contudo, a grande maioria das β -glucosidases fúngicas apresentam pHs ótimos variando de 4,0 a 6,5 e são geralmente estáveis em uma ampla faixa de pH.

Figura 8. Estabilidade ao pH na atividade da β -glucosidase de *R. composticola*. Atividade residual avaliada em intervalos de pH variando de 5,0 a 6,5 durante o período de 24 horas. Legenda: ● pH 5,0; ● pH 5,5; ● pH 6,0; ● pH 6,5.



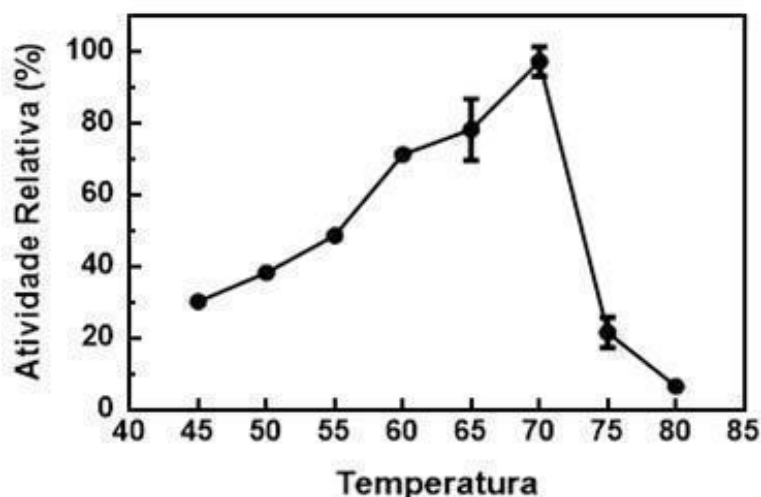
5.2.2 Efeito da temperatura na atividade e na termoestabilidade da enzima purificada

A atividade enzimática da β -glucosidase purificada de *R. composticola* apresentou um aumento gradativo nas temperaturas de 45 a 65°C atingindo seu ótimo em 70°C como observado na Figura 9. A temperatura de 65°C, a enzima manteve 78% (0,26 U/mL) da sua atividade e 71% (0,23 U/mL) a 60°C. Contudo, quando aumentou a temperatura para 75°C, a enzima permaneceu ativa com 21% de sua capacidade catalítica, mantendo 6% de atividade a 80°C. A temperatura ótima da β -glucosidase de *R. composticola* foi semelhante a outras β -glucosidases dos fungos *Aspergillus terreus* e *Aspergillus fumigatus* Z5 (YAN *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2012).

Em geral a temperatura ótima para atividade das β -glucosidases de fungos termofílicos se encontram na faixa de 55-75°C, e sua temperatura ótima elevada é uma característica atraente para sua aplicação em processos biotecnológicos visto que o uso de enzimas em altas temperaturas diminui

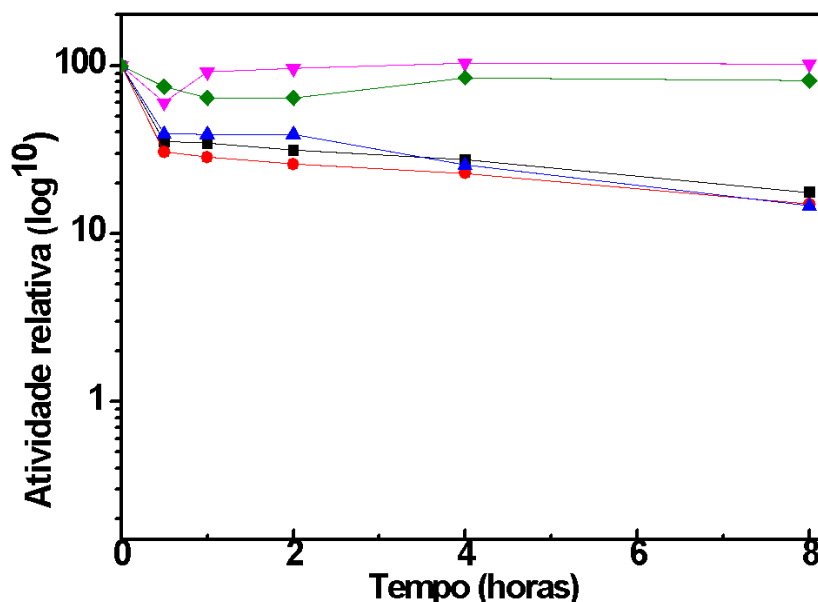
possíveis contaminações microbianas e um possível aumento da capacidade hidrolítica (BHATIA *et al.*, 2002).

Figura 9. Efeito da temperatura na β -glucosidase de *R. composticola*. A enzima foi incubada em temperaturas de 45 a 80°C, com variação de 5°C.



Também foi realizado o teste de termoestabilidade incubando-se a enzima sem o substrato em diferentes temperaturas (50 - 70°C) e intervalos de tempos (30 min - 8 horas), e os resultados podem ser observados na Figura 10. Nos primeiros 30 minutos de incubação a enzima apresentou atividade de 35, 31 e 39% nas temperaturas de 50 a 60°C, respectivamente. Contudo, na temperatura de 65°C a enzima manteve 60% de atividade e a 70°C, 74% de atividade. Com 1 hora de incubação a 65°C a enzima apresentou 91% de atividade, permanecendo estável com 103% após 4 horas e 102% após 8 horas de incubação. A 70°C a enzima se manteve estável com 64% de atividade durante o período de 1 a 2 horas de incubação. No entanto, após 4 horas de incubação a enzima apresentou 84% de atividade, mantendo-se estável até 8 horas de incubação.

Figura 10. Estabilidade térmica da β -glucosidase de *R. composticola*. A enzima foi incubada nas temperaturas de 50 a 75°C. Posteriormente a atividade residual foi realizada nas condições ótimas de pH e temperatura. Legenda: ■ 50°C; ● 55°C; ▲ 60°C; ▼ 65°C; ◆ 70°C.



5.2.3. Efeito de íons, EDTA e EGTA na Atividade Enzimática

De acordo com um estudo feito por Guengerich (2016) cerca de 40% das enzimas possuem metais como parte de sua estrutura, e a interação desses metais com o sítio ativo da enzima pode influenciar na atividade catalítica tanto positiva quanto negativamente. Esses metais ou íons são conhecidos como co-fatores. Foram avaliados o efeito de sais e os agentes quelantes EDTA e EGTA na atividade da β -glucosidase de *R. composticola*, nas concentrações de 1 e 5 mM.

Dentre todos os compostos avaliados apenas os agentes quelantes realizaram o estímulo enzimático nas concentrações avaliadas, sendo que em 1 mM atividade aumentou 6 e 9% para EDTA e EGTA, respectivamente. Em 5 mM o EDTA estimulou 34% da atividade enzimática, enquanto o EGTA estimulou em 38% (Tabela 2). Isso pode ser ocasionado pois os quelantes capturam íons metálicos do meio formando complexos, dessa forma a retirada desses íons do meio de reação pode ter contribuído para que a enzima fique

mais ativa. Por outro lado, os demais efetores (íons) avaliados, realizaram uma pequena inibição na concentração de 1 mM e uma alta inibição em 5 mM, como AgNO_3 , HgCl_2 , NaCl , MnCl_2 , KCl e MgSO_4 . Esses resultados foram semelhantes aos encontrados pela β -glucosidase dos fungos *Aspergillus niger* (NARASIMHA *et al.*, 2016) dos quais teve inibição de atividade de 30% pelos sais HgCl_2 e AgNO_3 e fungo *Neocallimastix patriciarum* do rúmen de búfalo (WHANG *et al.*, 2012) dos quais sofreram inibição da atividade enzimática entre 60% para todos os sais testados.

O ZnCl e o CuSO_4 realizaram uma alta inibição em ambas concentrações avaliadas (1 e 5 mM). O CuSO_4 tem poder oxidante nas pontes dissulfeto e pode promover a formação de pontes dissulfeto alternativas tanto intra como intermoleculares e essa interação na maioria das enzimas leva a redução de atividade (FORTKAMP & KNOB 2014). Resultados semelhantes foram observados para a glucosidase do fungo *Aspergillus oryzae* que foram inibidas em 83% por ZnCl e 97% por CuSO_4 (RIOU *et al.*, 1998). Os resultados obtidos sugerem que a β -glucosidase de *R. composticola* não é íon-dependente.

Tabela 2. Efeito de íons na atividade da β -glucosidase de *R. composticola*.

Efeito de íons, EDTA e EGTA na Atividade Enzimática		
Reagente	Atividade β-glucosidase (%)	
	1 mM	5 mM
Controle	100	100
CoCl ₂	57±1,3	36±0,03
ZnCl	10±0,2	7±2,18
NiSO ₄	51±3,1	37±3,2
CuSO ₄	10±0,8	1,2±0,01
HgCl ₂	58±0,3	11±0,4
SrCl ₂	65±0,2	63±0,9
MgSO ₄	84±0,2	61±0,1
FeCl ₃	51±0,5	25±0,1
CaCl ₂	75±0,2	72±0,15
LiCl	66±0,3	56±0,7
AgNO ₃	94±0,5	24±0,3
KCl	92±0,2	57±0,11
MnCl ₂	82±0,6	44±0,4
NaCl	94±0,6	67±0,15
EDTA	106±0,1	134±0,1
EGTA	109±0,3	138±0,05

Condições: A atividade da β -glucosidase foi determinada por incubação da enzima purificada na presença de vários íons e/ou EDTA e EGTA em concentrações de 1 e 5 mM, em pH 5,0 a 70°C. Controle: sem adição de íons ou EDTA e EGTA.

5.2.4 Efeito dos Solventes Orgânicos, Surfactantes e Agentes Redutores na Atividade Enzimática

Cada enzima interage com os solventes orgânicos de maneira única, de modo que a interação com os solventes pode afetar a estrutura enzimática tanto positiva quanto negativamente (DOUKYU & OGINO, 2010). Dentre todos os solventes orgânicos avaliados, acetona e acetonitrila apresentaram uma inibição 33 e 46%, respectivamente na concentração de 5% (Tabela 3).

Por outro lado, etanol e metanol apresentaram uma leve inibição nas concentrações de 5%, (12 e 30%, respectivamente) e uma alta inibição na concentração de 10% (41 e 58%).

Esses resultados diferem dos encontrados pela β -glucosidase do fungo *Aspergillus oryzae*, do qual foi estimulada por etanol em 15%, aumentando sua hidrólise em condições ótimas (RIOU *et al.*, 1998). A inibição por solventes orgânicos pode ter sido ocasionado por modificações da na estrutura da proteína ocasionado por rupturas de ligações não covalente por um solvente menos polar que a água, alterando o desequilíbrio químico da catálise (DORDICK, 1992).

Ainda assim, a β -glucosidase de *R. composticola* apresentou estimulação de 45,5% com o agente redutor TEMED na concentração final de 1 mM e 72,2% a 10 mM (Tabela 3). Já o mercaptoetanol apresentou estimulação de 55,8% na concentração de 1 mM, no entanto foi inibida quase completamente na concentração de 10 mM. Para os surfactantes, a enzima foi estimulada em 20,6% e 14,45% para saponina e Triton X-100, respectivamente em uma concentração de 5% (Tabela 3). No entanto, como esperado, o detergente aniônico (SDS) teve um forte efeito inibitório, como observado para a maioria das hidrolases de glicosídeos (KETUDAT & ESEN, 2010).

A diminuição da atividade por SDS pode ser explicada através da natureza química da molécula por se tratar de uma molécula anfipática, com uma longa cauda hidrofóbica e uma cabeça hidrofílica aniônica. A porção hidrofóbica do SDS se liga em resíduos hidrofóbicos da enzima e pode levar a uma desestabilização da molécula, e a porção hidrofílica faz com que a superfície da enzima fique negativa ocasionando a desnaturação proteica (DOUKYU & OGINO, 2010).

Tabela 3. Efeito de diferentes compostos químicos na atividade da β -glucosidase de *R. composticola*.

Agentes Redutores	Atividade β -glucosidase (%)	
	1 mM	10 mM
Controle	100	100
TEMED	145,5 \pm 1,6	172,2 \pm 1,2
Mercaptoetanol	155,8 \pm 0,4	5,0 \pm 0,7
Solventes	Atividade β -glucosidase (%)	
	5%	10%
Controle	100	100
Acetona	67 \pm 0,4	55 \pm 1,4
Acetonitrila	54 \pm 1,4	49 \pm 1,1
Etanol	88 \pm 0,9	59 \pm 0,9
Metanol	70 \pm 1,2	42 \pm 0,7
Surfactantes	Atividade β -glucosidase (%)	
Controle		100
Saponina		120,60 \pm 1,3
SDS		49,16 \pm 1,3
Triton X-100		114,45 \pm 1,2

5.2.5 Especificidade aos Substratos

A especificidade ao substrato da β -glucosidase foi analisada utilizando os substratos sintéticos *p*NP-Xyl e *p*NP-Glc (controle) e alguns substratos naturais descritos na Tabela 4. A enzima não apresentou atividade em nenhum dos substratos testados a não ser os substratos sintéticos *p*NP-Glc (controle) e *p*NP-Xyl (Tabela 4).

Pode-se sugerir então que a β -glucosidase purificada de *R. composticola* é um tipo de aril- β -glucosidase uma vez que cliva preferencialmente ligações aril-glicosídeos, como *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (*p*NP-Glc) (SALGADO *et al.*, 2018). Essas observações indicam também que a β -glucosidase de *R. composticola* tem uma forte atividade para substratos com uma ligação glicosídica β - (1 \rightarrow 4), sugerindo que a enzima seja uma β -glucosidase específica.

Tabela 4. Efeito dos substratos na atividade da β -glucosidase de *R. composticola*

Substrato	Atividade relativa (%)
Controle	100
pNP- Xyl	12 \pm 4,6
CMC	ND
Amido	ND
Celobiose	ND
Avicel	ND
Pectina Maçã	ND
Pectina Cítrica	ND
Xilana	ND
Maltose	ND
Sacarose	ND
Lactose	ND
Trealose	ND

5.2.6 Efeito de glicose e xilose na atividade β -glucosidase de *R. composticola*, e a β -glucosidase comercial BgII de *Aspergillus niger* (Novozymes 188)

Diferentes concentrações de glicose e xilose foram adicionadas na mistura de reação (utilizando pNP-Glc como substrato) a fim de se avaliar o efeito desses açúcares sobre a atividade da β -glucosidase purificada. Neste experimento foram testados a β -glucosidase purificada de *R. composticola*, e a enzima comercial BgII de *A. niger*, principal componente do preparado comercial rico em β -glucosidases (NOVOZYMES SP 188; NOVO NORDISK A/S, BRAGSVAERD, DANMARK).

Os dados apontam que a β -glucosidase de *R. composticola* deste estudo, manteve 95 e 93% de sua atividade com 1 e 5 mM de glicose, respectivamente. No entanto, permaneceu estável mantendo até 89% de sua capacidade hidrolítica em uma concentração de 10 a 100 mM de glicose (Figura 11 A). Já a enzima comercial BgII N188, não apresentou estabilidade a glicose, perdendo mais de 50% de sua atividade catalítica com 10 mM de glicose, chegando a 11% em 100 mM de glicose. De acordo com os resultados

apresentados, a β -glucosidase de *R. composticola* apresentou maior tolerância a altas concentrações de glicose mantendo mais de 90% de sua capacidade hidrolítica do que o preparado comercial enzimático BgII N188. Além disso, a β -glucosidase desse estudo apresentou maior afinidade em hidrolisar o substrato sintético *p*NP-Glc, e por isso faz parte do grupo GH1 segundo a literatura.

Embora a grande maioria das β -glucosidases microbianas apresentam inibição por glicose, o que é um fator limitante no uso dessas enzimas industrialmente, várias β -glucosidases possuem tolerância a glicose como as enzimas dos fungos *Aspergillus oryzae*, *Scytalidium thermophilum*, *Exiguobacterium antarcticum* B7, *Anoxybacillus flavithermus* subsp. *yunnanensis* E13 T e *Humicola insolens* (RIOU *et al.*, 1998; ZANOELO *et al.*, 2004; CRESPIM *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2017; MELEIRO *et al.*, 2017).

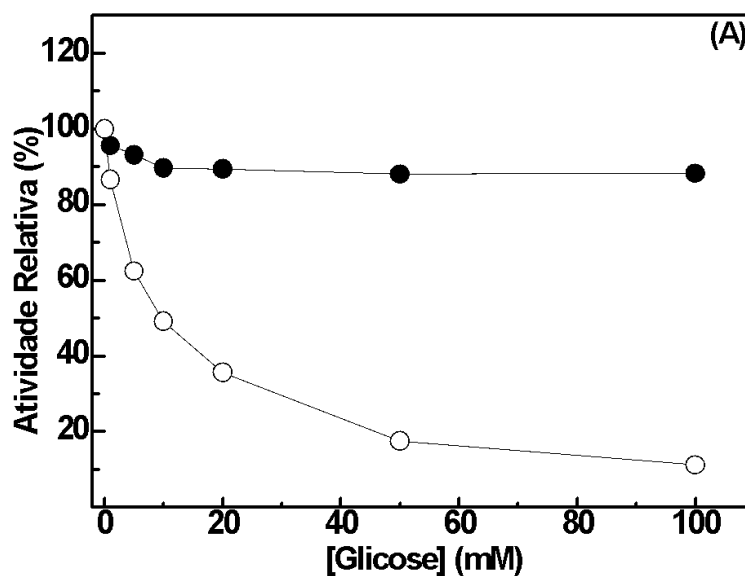
Normalmente as β -glucosidases tolerantes à glicose podem ser utilizadas para liberar compostos aromáticos de precursores de glicosídeos sem sabor na indústria de vinhos, como a enzima do fungo *Aspergillus oryzae* (RIOU *et al.*, 1998) que foi capaz de liberar compostos relacionados ao sabor, como geraniol, nerol e linalol, de um mosto de uva com pH 2,9. Também são importantes no processo de sacarificação da celulose e produção de biocombustível, visto que muitas enzimas são inibidas pelo seu produto de reação e tem sua atividade comprometida (SINGHANIA *et al.*, 2013).

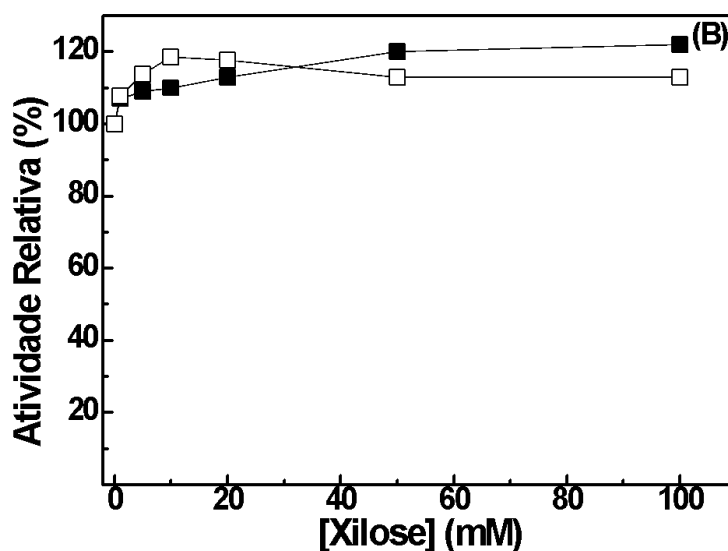
De acordo com Salgado *et al.* (2018) todas as β -glucosidases tolerantes e/ou estimuladas por glicose descobertas são membros das famílias GH1 e GH3. Essas enzimas apresentam um ciclo catalítico que ocorre em duas etapas: glicosilação e deglicosilação, juntamente com um mecanismo de deslocamento duplo envolvendo dois grupos carboxila (resíduos de glutamato ou aspartato) que preserva a configuração do carbono anomérico no produto glicona (ZACHEL & WITHERS, 2000; MARANA, 2006; SALGADO *et al.*, 2018).

Na etapa de glicosilação, um grupo carboxila atua como ácido, doando um próton para o oxigênio na ligação O-glicosídica, para formação de um glicosil-enzima, liberando aglicona como produto, o segundo grupo carboxila forma um intermediário glicosil-enzima. Na etapa de deglicosilação, o grupo

carboxila que atuou anteriormente como um ácido, agora atua como uma base sequestrando um próton de um grupo nucleofílico de um molécula aceptora localizada na região do sítio ativo. Este nucleófilo pode ser água (hidrólise) ou outro aceitador, como um monossacarídeo, dissacarídeo, aril-, álcool alquílico ou álcool monoterpênico (transglicosilação) que ataca o intermediário glicosil-enzima restaurando a enzima livre com a liberação concomitante de um segundo produto, completando assim o ciclo catalítico (MARANA, 2006; MELEIRO *et al.*, 2017; SALGADO *et al.*, 2018).

Figura 11. Efeito de glicose e xilose na atividade β -glucosidase de *R. composticola*, e a enzima comercial BglI de *Aspergillus niger* (Novozymes 188). Legenda: (A) Efeito da glicose, ● glicose (RC); □ glicose (N188); (B) Efeito da xilose, ■ xilose (RC); □ xilose (N188).





Com relação a xilose, a β -glucosidase de *R. composticola* apresentou uma estimulação de 7% a 1 mM chegando a 22% em 100 mM de xilose conforme mostra a Figura 11 (B). Já a enzima comercial BglI N188, também apresentou uma estimulação de 7% a 1 mM e 18% a 10 mM, contudo a 100 mM apresentou estimulação de 13%, conforme mostra a Figura 11 (B).

Vários efeitos contribuem para a estimulação de xilose/glicose, entre eles interações alostéricas, competição entre o substrato e os monossacarídeos para ligação a diferentes locais na molécula de enzima e estimulação da atividade de transglicosilação. As β -glucosidases tolerantes a xilose também foram caracterizadas como as de *Scytalidium thermophilum*, *Pyrococcus furiosus* e *Thermotoga petrophila*, *Humicola grisea var thermoidea* e *Humicola insolens* (ZANOELO *et al.*, 2004; COTA *et al.*, 2015; NASCIMENTO *et al.*, 2010; SOUZA, *et al.*, 2010, 2013).

Essa característica, também é de grande interesse biotecnológico, principalmente na produção de etanol de segunda geração, uma vez que a sua produção depende da hidrólise eficiente e de baixo custo da celulose e hemicelulose, presente na matéria lignocelulósica, com subsequente fermentação das hexoses liberadas e pentoses (KOPPRAM *et al.*, 2014; MELEIRO *et al.*, 2017). Portanto, há um interesse contínuo na busca de

β -glucosidases estimuladas por glicose e xilose para aumentar a eficiência da hidrólise da biomassa celulósica.

5.2.7. Avaliação de Parâmetros Cinéticos

Após a purificação da β -glucosidase produzida pelo fungo *R. composticola*, e caracterização bioquímica da enzima, foi avaliado as constantes cinéticas K_m e $V_{m\acute{a}x}$, para um maior esclarecimento das propriedades intrínsecas desta enzima. O substrato utilizado foi aquele que a enzima apresentou maior atividade, que foi pNP-Glc (0,25- 7 mM) e pNP-Glc (2 mM) na presença de glicose e xilose (50 mM).

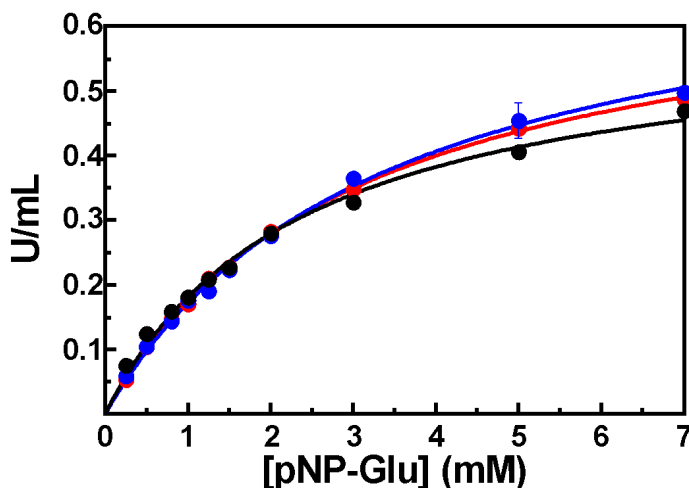
Na Figura 12 está ilustrado a representação de Michaelis-Menten com o substrato pNP-Glc, pNP-Glc+glicose e pNP-Glc+xilose para atividade de β -glucosidase. A enzima com o pNP-Glc apresentou valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ de 2,35 mM e 0,0221 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, com o K_{cat} de $1,83 \times 10^{-10} \text{ s}^{-1}$ conforme mostra a Tabela 5. Na presença de glicose a enzima apresentou valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ de 2,33 mM e 0,0271 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ com K_{cat} de $1,01 \times 10^{-10}$.

No entanto, na presença de xilose a enzima apresentou K_m e $V_{m\acute{a}x}$ 2,021 mM e 0,0255 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ apresentado maior afinidade ao substrato quando comparado com os resultados anteriores e melhor taxa de renovação e eficiência catalítica (K_{cat} $1,89 \times 10^{-10}$; K_{cat}/K_m $9,35 \times 10^{-11}$) corroborando com os resultados anteriores que demonstram uma estimulação da enzima por xilose. Os valores calculados para a hidrólise de pNP-Glc estão na faixa relatada para outras β -glucosidases de fungos termofílicos (MELEIRO *et al.*, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2010; ZANOELO *et al.*, 2004).

Tabela 5. Parâmetro cinéticos da β -glucosidase de *R. composticola*

Parâmetros cinéticos				
	$K_m(\text{mM})$	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	$K_{cat} (\text{s}^{-1})$	K_{cat}/K_m
pNP-Glu	2,35	0,0221	$1,83 \times 10^{-10}$	$7,7 \times 10^{-11}$
pNP-Glu + Glicose	2,33	0,0271	$1,01 \times 10^{-10}$	$4,31 \times 10^{-11}$
pNP-Glu + Xilose	2,02	0,0255	$1,89 \times 10^{-10}$	$9,35 \times 10^{-11}$

Figura 12. Efeito do *p*NP-Glc e *p*NP-Glc associado a glicose e xilose na atividade da β -glucosidase purificada de *R. composticola*. Legenda: ● *p*NP-Glc; ● *p*NP-Glc+ glicose; ● *p*NP-Glc + xilose.

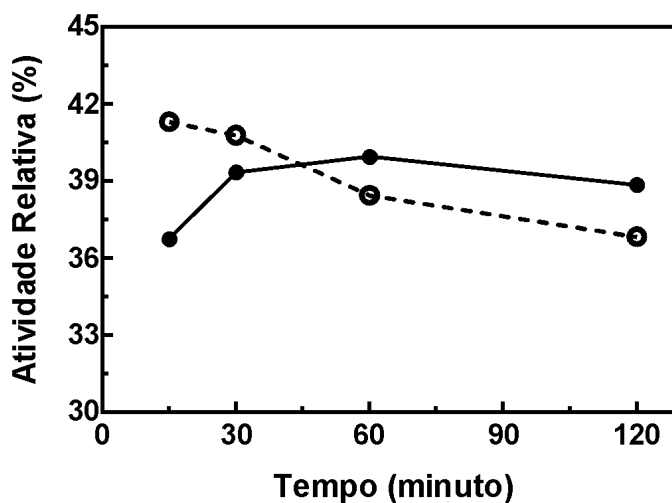


5.3 Imobilização com glioxil agarose

Os testes preliminares de imobilização da β -glucosidase em suporte de glioxil agarose foram realizados incubando a enzima em bicarbonato de sódio 100 mM, pH 10,0 durante 24 horas a temperatura ambiente visto que, a imobilização rápida de proteínas em suportes glioxil ocorre apenas em valores de pHs alcalinos (GUISAN, 2006). Após 24 horas de incubação a β -glucosidase manteve 100% de sua atividade (dados não mostrados). A alta estabilidade permitiu que a enzima fosse submetida a imobilização covalente multipontual em pH 10,0, condição ideal para a imobilização em glioxil.

Com isso, a enzima foi incubada com o suporte glioxil agarose, a temperatura ambiente, por diferentes intervalos de tempo (15 a 120 minutos). O rendimento da imobilização foi de 40% em 60 minutos, como apresentado na Figura 13. O maior tempo de imobilização (120 minutos) exerceu influência negativa na atividade da enzima, o que pode ser atribuído à formação de múltiplas ligações covalentes no suporte enzimático pode levar a alterações conformacionais na estrutura da enzima, contribuindo para sua inativação (BORGES, 2014).

Figura 13. Imobilização da β -glucosidase de *R. composticola* com glioxil agarose. Legenda: \circ enzima livre; \bullet enzima imobilizada

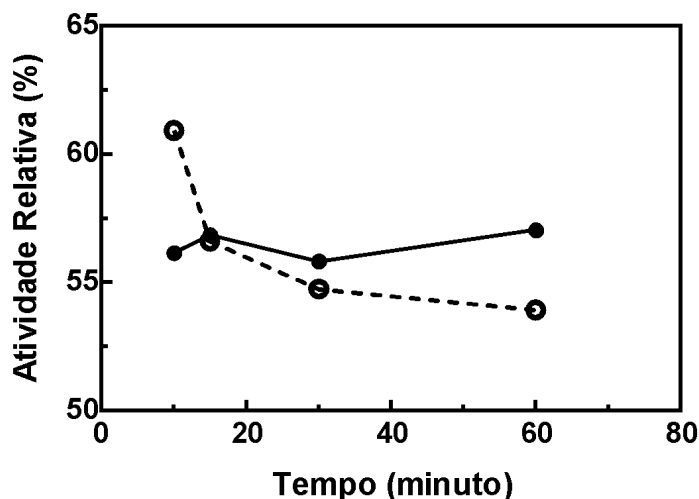


5.3.1 Imobilização com glioxil agarose na presença de glicose

Na tentativa de imobilizar a enzima de *R. composticola* em uma conformação já ativada, foram realizadas imobilizações em suporte glioxil-agarose na presença de glicose 1 mM a temperatura ambiente por diferentes intervalos de tempo (15 a 60 minutos). A imobilização na presença de glicose foi de 56% em 60 minutos, como mostra a Figura 14.

Analisando a Figura 14 podemos observar que o rendimento de imobilização do extrato enzimático na presença de glicose foi 16% maior em relação à imobilização sem glicose. Isso ocorre pois a glicose durante o processo de imobilização pode ajudar a preservar a atividade da enzima imobilizada, pois evita a formação de ligações covalentes que levam a distorção do sítio ativo da enzima (TARDIOLI, 2003).

Figura 14. Imobilização da β -glucosidase de *Rasamsonia composticola* com glioxil agarose na presença de glicose. Legenda: ○ enzima livre; ● enzima imobilizada



5.3.2 Efeito do pH na atividade da enzima imobilizada

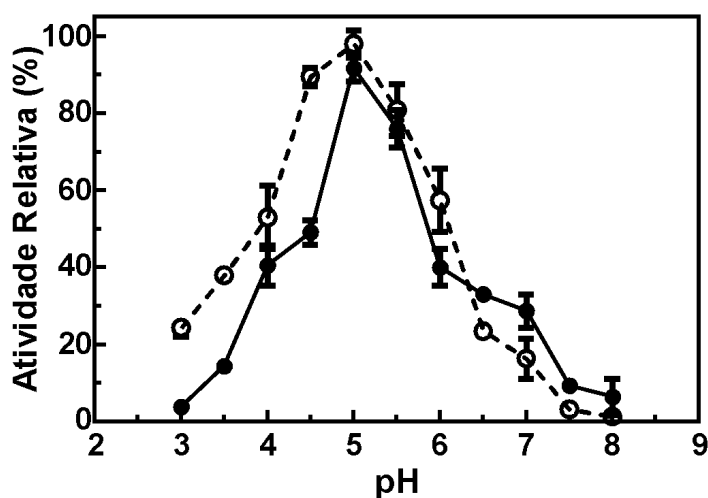
O efeito do pH na atividade enzimática da enzima livre e imobilizada pode ser observado na Figura 15. Como mostrado no gráfico, o pH ótimo no qual a atividade da enzima imobilizada corresponde a 100% é pH 5,0, mesmo valor para a enzima livre. Tanto a enzima livre quanto a imobilizada apresentam valores de atividade baixo em pHs ácidos (pH 3,0- 3,5). Em pH 4,5 a enzima livre apresentou atividade de 90% enquanto a enzima imobilizada apresentou metade desse valor, cerca de 49% de atividade.

A atividade enzimática para ambas as formas voltou a ter uma queda em pHs mais elevados na faixa de 5,5 a 8,0. Entretanto, essa queda se mostrou menos acentuada para a enzima imobilizada que apresentou em pH 6,5 uma atividade enzimática de 33% ao contrário da enzima livre que teve sua atividade reduzida em 23%, aproximadamente, sendo a enzima imobilizada mais estável em pHs elevados.

A imobilização não acarretou em mudança de pH ótimo para a forma livre e imobilizada, apresentando pH 5,0 para ambas e também perfis de pH muito parecidas, característica similar ao obtido por Zerbini *et al.* (2020) que observou mesmo perfil de pH só que com seu ótimo em 5,5 para a enzima livre

e imobilizada. Geralmente, o processo de imobilização pode ocasionar a variação do pH da enzima, por mudar a superfície e o microambiente da enzima, podendo afetar sua natureza e afetar o pH da enzima imobilizada (DE OLIVEIRA *et al.*, 2018). O fato de não se observar a mudança de pH na enzima imobilizada pode ser encontrada por outros autores (AHMED *et al.*, 2013; ZERBINI *et al.*, 2020).

Figura 15. Efeito do pH na β -glucosidase livre e imobilizada de *R. composticola*. Legenda: \circ enzima livre; \bullet enzima imobilizada

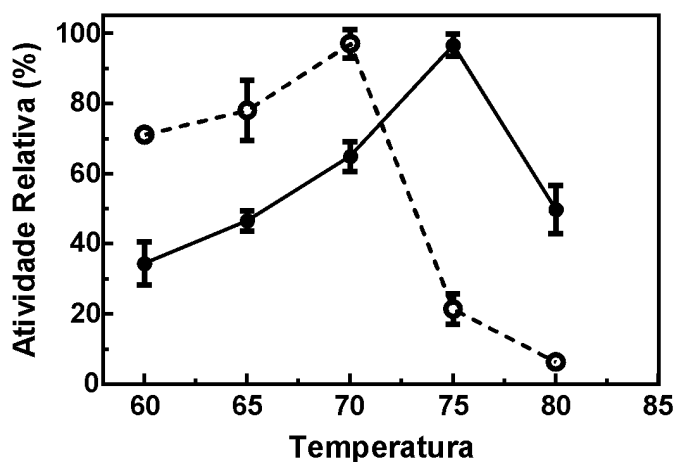


5.3.3 Temperatura ótima e termoestabilidade na atividade da enzima imobilizada

O efeito da temperatura na atividade da enzima imobilizada e livre pode ser observado na Figura 16. Foi possível observar que a enzima imobilizada apresentou atividade máxima (100%) em uma temperatura de 75°C enquanto a enzima livre possui seu ótimo a 70°C.

Observa-se que a 80°C a enzima imobilizada manteve 50% de sua atividade enquanto a enzima livre chegou a quase zero, mantendo apenas 6% de sua atividade catalítica. Por outro lado, a temperaturas abaixo de 75°C a atividade da enzima livre foi superior à da imobilizada.

Figura 16. Efeito da temperatura na β -glucosidase livre e imobilizada de *R. composticola*. Legenda: \circ enzima livre; \bullet enzima imobilizada



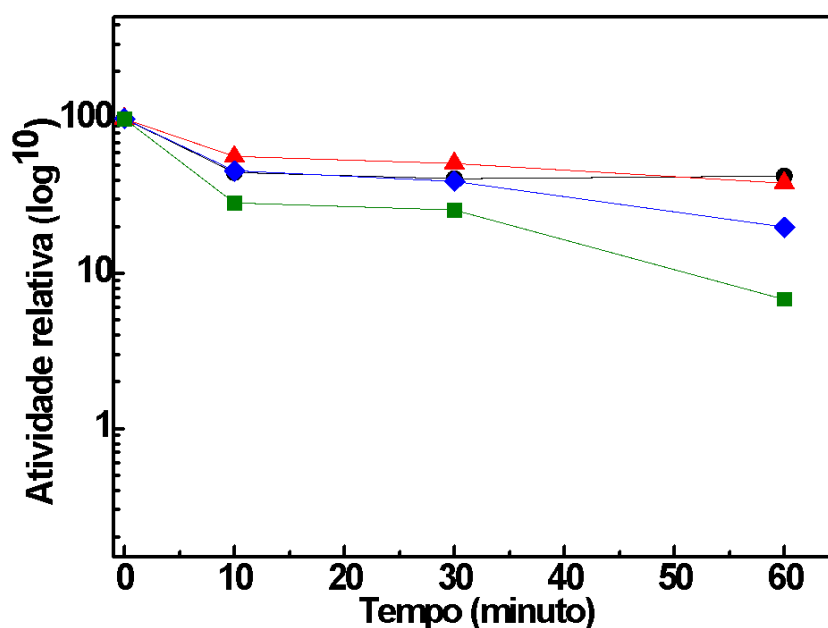
A estabilidade a temperatura da enzima imobilizada foi avaliada pela incubação da enzima em água sob as mesmas condições usadas para a enzima livre. A 65°C com 60 minutos de incubação a enzima imobilizada apresentou 42% de atividade, enquanto que a enzima livre apresentou atividade superior a 91% chegando a 102% em 8 horas de incubação (Figura 17). A 70°C a enzima livre se manteve estável com 64% de atividade em 60 minutos de incubação e a imobilizada 40% de atividade.

Contudo, a temperaturas de 75°- 80°C a enzima imobilizada manteve-se estável durante 30 minutos de incubação, com 40 e 25% de sua atividade, respectivamente, chegando a 20 e 7% de atividade com 60 minutos de incubação. No geral, a enzima imobilizada apresentou maior estabilidade em temperaturas elevadas (75-80°C) quando comparada à enzima livre que perdeu completamente atividade nessas temperaturas. Isso pode ocorrer pois a ligação da enzima com o suporte, induziu uma rigidez e redução na mobilidade da enzima, que protege suas estruturas em condições adversas como altas temperaturas (GUISAN *et al.*, 2006).

A melhora na estabilidade térmica de β -glucosidases após a imobilização por ligação covalente foi relatada anteriormente, como a enzima imobilizada de *Aspergillus niger* (VERMA *et al.*, 2013), imobilizada em nanopartículas magnéticas ativadas com glutaraldeído que foi 5 vezes mais

estável a 70°C do que a enzima livre. Para a enzima imobilizada em nanopartículas de óxido de silício de *Agaricus arvensis*, mostraram que a meia vida a 65°C aumentou cerca de 288 vezes quando comparada à enzima livre (SINGH *et al.*, 2011). Ahmed *et al.*, (2013) imobilizou a α -glucosidase de *Aspergillus niger* em esponja ativada com glutaraldeído, mas a enzima imobilizada não apresentou melhora significativa na estabilidade, quando comparada à enzima livre. Dessa forma, portanto, entende-se que o grau de estabilização de uma enzima depende do microrganismo no qual ela se origina bem como o tipo de suporte utilizado, temperatura, pH entre outros fatores.

Figura 17. Termoestabilidade na atividade da β -glucosidase imobilizada de *R. composticola*. Legenda: ● 65°C; ▲ 70°C; ◆ 75°C; ■ 80°C.



6. CONCLUSÃO

A enzima β -glucosidase produzida pelo fungo termofílico *Rasamsonia composticola* foi purificada em dois processos cromatográficos cerca de 19 vezes com um rendimento final de 14% e demonstrou atividade ótima em faixa de pH ácido (5,0) e altas temperaturas (70 °C), permanecendo estável em temperaturas de 65 – 70°C durante 8 horas. O peso molecular estimado é de aproximadamente 45 kDa. A enzima não foi estimulada pela maioria dos compostos químicos testados, entretanto foi levemente estimulada pelos detergentes saponina e triton X-100 além dos quelantes EDTA e EGTA e os agentes redutores Temed e mercaptoetanol. Além disso, demonstrou ser tolerante a glicose e estimulada por xilose, porém sem atividade de celobiase, sugerindo ser uma aril- β -glucosidase, que clivam preferencialmente ligações aril-glicosídeos, como *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (*p*NP-Glc) pertencente à família das hidrolases de glicosil GH1.

Os parâmetros cinéticos estimados para a enzima purificada foram de K_m e V_{max} de 2,3 mM e 0,0221 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ para *p*NP-Glc. A eficiência catalítica (K_{cat}/K_m) da enzima foi de $7,7 \times 10^{-11}$. Para *p*NP-Glc + glicose e *p*NP-Glc + xilose a enzima apresentou K_m e V_{max} de 2,33 mM e 0,0271 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ e 2,02 mM e 0,0255 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, respectivamente.

A enzima foi imobilizada em glioxil agarose cerca de 40% e 56% glioxil agarose na presença de glicose durante 60 minutos. Demonstrou atividade ótima em pH 5,0, mesmo pH da enzima livre e temperatura ótima em 75°C, cerca de 5°C a mais que a enzima livre. A enzima imobilizada apresentou maior estabilidade nas temperaturas de 75–80°C durante 60 minutos de reação, aspecto muito importante para sua utilização em processos industriais, como a sacarificação dos materiais lignocelulósicos e produção de bioetanol. Diante desses dados, pode-se afirmar que a β -glucosidase produzida pelo fungo *Rasamsonia composticola* demonstra características bioquímicas interessantes para uma possível aplicação em processos biotecnológicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEBAYO, E.; MARTINEZ-CARRERA, D. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 52-67, 2015. ISSN 1684-5315.

AHMED, S. A. *et al.*, Biochemical studies on immobilized fungal α -glucosidase. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v.30, n.4, p. 747-758. 2013.

ANDRADES, D. D. *et al.* Physico-chemical properties, kinetic parameters, and glucose inhibition of several beta-glucosidases for industrial applications. **Process Biochemistry**, v. 78, p. 82-90, 2019. ISSN 1359-5113.

ASHA, P.; DIVYA, J.; BRIGHT SINGH, I. S. Purification and characterisation of processive-type endoglucanase and β -glucosidase from *Aspergillus ochraceus* MTCC 1810 through saccharification of delignified coir pith to glucose. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 245-248, 2016. ISSN 0960-8524.

BAJAJ, P.; MAHAJAN, R. Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 21, p. 8711-8724, 2019. ISSN 1432-0614.

BEDFORD, M.; PARTRIDGE, G. Feed Enzymes, the Future: Bright Hope or Regulatory Minefield? In: M. R. BEDFORD e PARTRIDGE, G. **Enzymes in Farm Animal Nutrition**. 2. ed. Londres, 2010. p.304.

BERGMEYER, H. *et al.* D-glucose determination with glucose oxidase and isomerase. **Methods of enzymatic analysis**, v. 3, p. 1205-1212, 1974.

BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial β -Glucosidases: Cloning, Properties, and Applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 375-407, 2002. ISSN 0738-8551.

BINOD, P. *et al.* Enzymes for second generation biofuels: Recent developments and future perspectives. **Bioresource Technology Reports**, v. 5, p. 317-325, 2019. ISSN 2589-014X.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **ELECTROPHORESIS**, v. 8, n. 2, p. 93-99, 1987. ISSN 0173-0835.

BORGES, D. G, *et al.* Enhanced saccharification of sugarcane bagasse using soluble cellulase supplemented with immobilized β -glucosidase. **Bioresource Technology**, v. 167, p.206-213. 2014. ISSN 0960-8524

BOUDET, A. M. Towards an understanding of the supramolecular organization of the lignified wall. **The plant cell wall**. Oxford Blackwell. p. 155-182. 2003.ISSN. 1517-8498.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976. ISSN 0003-2697.

BRETHAUER, S.; STUDER, M. H. Biochemical Conversion Processes of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals - A Review. **CHIMIA International Journal for Chemistry**, v. 69, n. 10, p. 572-581, 2015.

CAIRNS, J. R. K.; ESEN, A. β -Glucosidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 20, p. 3389-3405, 2010. ISSN 1420-9071.

CANTAREL, B. L. *et al.* The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. suppl_1, p. D233-D238, 2008. ISSN 0305-1048.

CHANG, K. H. *et al.* Purification and characterization of a ginsenoside Rb1-hydrolyzing β -glucosidase from *Aspergillus niger* KCCM 11239. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 9, p. 12140-12152, 2012.

CHEN, K.-I. *et al.* Enrichment of two isoflavone aglycones in black soymilk by using spent coffee grounds as an immobiliser for β -glucosidase. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1, p. 79-85, 2013. ISSN 0308-8146.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 3-23, 2005. ISSN 0168-6445.

COTA, J. *et al.* Comparative analysis of three hyperthermophilic GH1 and GH3 family members with industrial potential. **New Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 13-20, 2015. ISSN 1871-6784.

CRESPIM, E. *et al.* A novel cold-adapted and glucose-tolerant GH1 β -glucosidase from *Exiguobacterium antarcticum* B7. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 375-380, 2016. ISSN 0141-8130.

DORDICK, J. S. Designing Enzymes for Use in Organic Solvents. **Biotechnology Progress**, v. 8, n. 4, p. 259-267, 1992. ISSN 8756-7938.

DOUKYU, N.; OGINO, H. Organic solvent-tolerant enzymes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 3, p. 270-282, 2010. ISSN 1369-703X.

FORTKAMP, D.; KNOB, A. High xylanase production by *Trichoderma viride* using pineapple peel as substrate and its application in pulp biobleaching. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 22, 2014. ISSN 1684-5315.

GUENGERICH, F. P. Metals in Biology 2016: Molecular Basis of Selection of Metals by Enzymes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 40, p. 20838-20839, 2016.

GUISAN, J. M. *et al.* The Science of Enzyme Immobilization. In: J. M. GUI SAN; BOLIVAR, J. M., *et al.* **Immobilization of Enzymes and Cells: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer US, 2020. p.1-26.

GUNATA, Y. Z. *et al.* The aroma of grapes I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. **Journal of Chromatography A**, v. 331, p. 83-90, 1985. ISSN 0021-9673.

GUO, Y. *et al.* Expression and characterization of a novel β -glucosidase, with transglycosylation and exo- β -1,3-glucanase activities, from *Rhizomucor miehei*. **Food Chemistry**, v. 175, p. 431-438, 2015. ISSN 0308-8146.

GRAZU, V. *et al.* Glyoxyl agarose as a new chromatographic matrix. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38 p.960–966, 2006. ISSN 0141-0229.

HASHIMOTO, W. *et al.* Molecular Cloning of Two Genes for β -d-Glucosidase in *Bacillus* sp. GL1 and Identification of One as a Gellan-Degrading Enzyme. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 360, n. 1, p. 1-9, 1998. ISSN 0003-9861.

HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 280, n. 2, p. 309-316, 1991. ISSN 0264-6021.

HOUBRAKEN, J.; SPIERENBURG, H.; FRISVAD, J. C. *Rasamsonia*, a new genus comprising thermotolerant and thermophilic *Talaromyces* and *Geosmithia* species. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, n. 2, p. 403-421, 2012. ISSN 1572-9699.

KOPPRAM, R. *et al.* Lignocellulosic ethanol production at high-gravity: challenges and perspectives. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 46-53, 2014. ISSN 0167-7799.

KOUPAIE, E. H. *et al.* Enzymatic pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biomethane production - A review. **Journal of Environmental Management**, v. 233, p. 774-784, 2019. ISSN 0301-4797.

KWON, K.-S.; GYOO KANG, H.; CHIL HAH, Y. Purification and characterization of two extracellular β -glucosidases from *Aspergillus nidulans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 97, n. 1-2, p. 149-153, 1992. ISSN 0378-1097.

KWON, K.-S. *et al.* Detection of β -Glucosidase Activity in Polyacrylamide Gels with Esculin as Substrate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 12, p. 4584-4586, 1994.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **nature**, v. 227, p. 680-685, 1970. ISSN 0028-0836.

LEONE, F. A. *et al.* SigrafW: An easy-to-use program for fitting enzyme kinetic data. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 33, n. 6, p. 399-403, 2005. ISSN 1470-8175.

LIEW, K. J. *et al.* Purification and characterization of a novel GH1 beta-glucosidase from *Jeotgalibacillus malaysiensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 1094-1102, 2018. ISSN 0141-8130.

LIU, D. *et al.* Characterization of a thermostable β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X33. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 1, p. 25, 2012. ISSN 1475-2859.

LIU, Y. *et al.* Increased enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse by a novel glucose- and xylose-stimulated β -glucosidase from *Anoxybacillus flavithermus* subsp. *yunnanensis* E13T. **BMC Biochemistry**, v. 18, n. 1, p. 4, 2017. ISSN 1471-2091.

LU, J. *et al.* Expression and characterization of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from a soil metagenome. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 45, n. 8, p. 664-673, 2013. ISSN 1672-9145.

LYND, L. *et al.* Microbial Cellulase Utilization: Fundamental and Biotechnology, Microbial Molecule. **Biological review**, v. 66, p. 560-577, 2002.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 461-488, 2000.

MARANA, S. R. Molecular basis of substrate specificity in family 1 glycoside hydrolases. **IUBMB Life**, v. 58, n. 2, p. 63-73, 2006. ISSN 1521-6543.

MASUI, D. C. *et al.* Production of a xylose-stimulated β -glucosidase and a cellulase-free thermostable xylanase by the thermophilic fungus *Humicola brevis* var. *thermoidea* under solid state fermentation. **World Journal of**

Microbiology and Biotechnology, v. 28, n. 8, p. 2689-2701, 2012. ISSN 1573-0972.

MATEO, C.; BOLIVAR, J. M.; GODOY, C. A.; MARTIN, J. R.; PASSELA, B. C.; CURIEL, J. A.; MUNHOZ, R.; GUIBAN, J. M.; LORENTE, G. F. Improvement of Enzyme Properties with a Two-Step Immobilization Process on Novel Heterofunctional Supports. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451-1463. 2010. ISSN 0141-0229.

MCILVAINE, T. C. A BUFFER SOLUTION FOR COLORIMETRIC COMPARISON. **Journal of Biological Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 183-186, 1921.

MELEIRO, L. P. *et al.* Engineering the GH1 β -glucosidase from *Humicola insolens*: Insights on the stimulation of activity by glucose and xylose. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0188254, 2017.

MELEIRO, L. P, ZIMBARDI, A. L. R. L, SOUZA, F. H. M *et al.* A Novel β -Glucosidase from *Humicola insolens* with High Potential for Untreated Waste Paper Conversion to Sugars.. **Appl Biochem Biotechnol** v.173, p. 391–408. 2014.

MENDES, A. A. *et al.* Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, p. 831-840, 2011. ISSN 0100-4042.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959. ISSN 0003-2700.

MURRAY, M.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic acids research**, v.8, n. 19, p. 4321-4326, 1980.

NARASIMHA, G. *et al.* Purification and Characterization of β -Glucosidase from *Aspergillus niger*. **International Journal of Food Properties**, v. 19, n. 3, p. 652-661, 2016. ISSN 1094-2912.

NASCIMENTO, C. V. *et al.* Purification and biochemical properties of a glucose-stimulated β -D-glucosidase produced by *Humicola grisea* var. *thermoidea* grown on sugarcane bagasse. **The Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 53-62, 2010. ISSN 1976-3794.

OH, J. M. *et al.* Characterization of two extracellular β -glucosidases produced from the cellulolytic fungus *Aspergillus* sp. YDJ216 and their potential applications for the hydrolysis of flavone glycosides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, p. 595-603, 2018. ISSN 0141-8130.

OLIVEIRA, J.; NUNES-SILVA, C. G.; SANTAROSA, P. S. Determinação das Características Físico-químicas da Atividade β -glucosidase presente no Complexo Enzimático de *Aspergillus versicolor*. **Scientia Amazonia**, v. 1, p. 94-103, 2018. ISSN 2238.1910.

PALA, H.; MOTA, M.; GAMA, F. M. Enzymatic versus chemical deinking of non-impact ink printed paper. **Journal of Biotechnology**, v. 108, n. 1, p. 79-89, 2004. ISSN 0168-1656.

PAMIDIPATI, S.; AHMED, A. Cellulase stimulation during biodegradation of lignocellulosic residues at increased biomass loading. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 37, n. 4, p. 261-267, 2019. ISSN 1024-2422.

PATIL, P. N. *et al.* Intensification of biogas production using pretreatment based on hydrodynamic cavitation. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 30, p. 79-86, 2016. ISSN 1350-4177.

PERALTA, R. M. *et al.* A highly thermostable β -glucosidase activity from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*: purification and biochemical characterization. **FEMS Microbiology Letters**, v. 146, n. 2, p. 291-295, 1997. ISSN 0378-1097.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA, 2001.

RIOU, C. *et al.* Purification, Characterization, and Substrate Specificity of a Novel Highly Glucose-Tolerant β -Glucosidase from *Aspergillus oryzae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 3607-3614, 1998.

ROITNER, M.; SCHALKHAMMER, T.; PITTNER, F. Characterisation of naringinase from *Aspergillus niger*. **Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly**, v. 115, n. 10, p. 1255-1267, 1984. ISSN 1434-4475.

SALGADO, J. C. S. *et al.* Glucose tolerant and glucose stimulated β -glucosidases – A review. **Bioresource Technology**, v. 267, p. 704-713, 2018. ISSN 0960-8524.

SANTOS, C. A. *et al.* An engineered GH1 β -glucosidase displays enhanced glucose tolerance and increased sugar release from lignocellulosic materials. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 4903, 2019. ISSN 2045-2322.

SILVA, M. D. L. C. D. *et al.* Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, v. 29, p. 85-92, 2006. ISSN 0100-4042.

SILVA, R. A. **Comparação de alternativas de pré-tratamentos em biomassa lignocelulósica**. 2019. 18f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Tecnologias da Cadeia Produtiva do Biogás). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira.

SINGH, G.; VERMA, A.; KUMAR, V. Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of β -glucosidases. **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 3, 2016. ISSN 2190-572X.

SINGH, R. K.; ZHANG, Y. W.; NGUYEN, N. P. T. *et al.* Covalent immobilization of β -1,4-glucosidase from *Agaricus arvensis* onto functionalized silicon oxide nanoparticles. **Appl Microbiol Biotechnol** v. 89, p. 337-344. 2011.

SINGHANIA, R. R. *et al.* Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 500-507, 2013. ISSN 0960-8524.

SOLHTALAB, M.; FLANNELLY, D. F.; ARISTILDE, L. Substrate binding versus escape dynamics in a pH-affected fungal beta-glucosidase revealed by molecular dynamics simulations. **Carbohydrate Research**, v. 472, p. 127-131, 2019. ISSN 0008-6215.

SOUZA, F. H. M. *et al.* Glucose and xylose stimulation of a β -glucosidase from the thermophilic fungus *Humicola insolens*: A kinetic and biophysical study. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 94, p. 119-128, 2013. ISSN 1381-1177.

SOUZA, F. H. M. *et al.* Purification and biochemical characterization of a mycelial glucose- and xylose-stimulated β -glucosidase from the thermophilic

fungus *Humicola insolens*. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 2, p. 272-278, 2010. ISSN 1359-5113.

SRIVASTAVA, N. *et al.* Microbial Beta Glucosidase Enzymes: Recent Advances in Biomass Conversion for Biofuels Application. **Biomolecules**, v. 9, n. 6, p. 220, 2019. ISSN 2218-273X.

SU, Y.-Y.; CAI, L. *Rasamsonia composticola*, a new thermophilic species isolated from compost in Yunnan, China. **Mycological Progress**, v. 12, n. 2, p. 213-221, 2013. ISSN 1861-8952.

SUJANI, S.; SERESINHE, R. Exogenous enzymes in ruminant nutrition: A review. **Asian Journal of Animal Sciences**, v. 9, n. 3, p. 85-99, 2015. ISSN 1819-1878.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 9, p. 1621-1651, 2008. ISSN 1422-0067.

TAKKELLAPATI, S.; LI, T.; GONZALEZ, M. A. An overview of biorefinery-derived platform chemicals from a cellulose and hemicellulose biorefinery. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 20, n. 7, p. 1615-1630, 2018. ISSN 1618-9558.

TEUGJAS, H.; VÄLJAMÄE, P. Selecting β -glucosidases to support cellulases in cellulose saccharification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 105, 2013. ISSN 1754-6834.

TURNER, P.; MAMO, G.; KARLSSON, E. N. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. **Microbial Cell Factories**, v. 6, n. 1, p. 9, 2007. ISSN 1475-2859.

VANDAMME, E. J. Agro-Industrial Residue Utilization for Industrial Biotechnology Products. In: P. SINGH NEE' NIGAM e PANDEY, A. **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation: Utilisation of Agro-Residues**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009. p.3-11.

VERMA, M. L; CHAUDHARY, R.; TSUZUKI, T.; BARROW, C.J; PURI, M. Immobilization of β -glucosidase on a magnetic nanoparticle improves thermostability: **Application in cellobiose hydrolysis, Bioresource Technology**, v.135, p.2-6. 2013. ISSN 0960-8524.

WANG, M. *et al.* The structural and biochemical basis for cellulose biodegradation. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 88, n. 4, p. 491-500, 2013. ISSN 0268-2575.

WANG, T.-Y. *et al.* Functional characterization of cellulases identified from the cow rumen fungus *Neocallimastix patriciarum* W5 by transcriptomic and secretomic analyses. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 24, 2011. ISSN 1754-6834.

WITTE, K.; WARTENBERG, A. Purification and properties of two β -glucosidases isolated from *Aspergillus niger*. **Acta Biotechnologica**, v. 9, n. 2, p. 179-190, 1989. ISSN 0138-4988.

WOJTUSIK, M. *et al.* Thermal and operational deactivation of *Aspergillus fumigatus* β -glucosidase in ethanol/water pretreated wheat straw enzymatic hydrolysis. **Journal of Biotechnology**, v. 292, p. 32-38, 2019. ISSN 0168-1656.

YAN, F.-Y. *et al.* Characterization of β -glucosidase from *Aspergillus terreus* and its application in the hydrolysis of soybean isoflavones. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**, v. 17, n. 6, p. 455-464, 2016. ISSN 1862-1783.

ZANOELO, F. F. *et al.* β -Glucosidase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose. **FEMS Microbiology Letters**, v. 240, n. 2, p. 137-143, 2004. ISSN 0378-1097.

ZECHEL, D. L.; WITHERS, S. G. Glycosidase Mechanisms: Anatomy of a Finely Tuned Catalyst. **Accounts of Chemical Research**, v. 33, n. 1, p. 11-18, 2000. ISSN 0001-4842.

ZERBINI, M. T. **Imobilização e caracterização bioquímica da enzima β -glucosidase (BG-Lfa2) em polímero de alginato de sódio.** 2020. Dissertação mestrado. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

ZHANG, X.-Z.; ZHANG, Y.-H. P. Cellulases: characteristics, sources, production, and applications. **Bioprocessing technologies in biorefinery for sustainable production of fuels, chemicals, and polymers**, v. 1, p. 131-146, 2013.

ZHAO, H.; GRABOWSKI, G. A. Gaucher disease: perspectives on a prototype lysosomal disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, n. 4, p. 694-707, 2002. ISSN 1420-9071.