



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – INBIO
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR



LUCIANE GOMES FREIRE

Purificação e caracterização bioquímica de uma β -glucosidase do fungo termófilo *Humicola brevis* var. *thermoidea*

Campo Grande – MS

Março 2020

LUCIANE GOMES FREIRE

Purificação e caracterização bioquímica de uma β -glucosidase do fungo termófilo *Humicola brevis* var. *thermoidea*

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 parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Douglas Chodi Masui

Campo Grande – MS

Março 2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Freire, Luciane Gomes

Purificação e caracterização bioquímica de uma β -glucosidase do fungo termófilo *Humicola brevis* var. *thermoidea*

55 p.

Dissertação de Mestrado, apresentada a Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Orientador: Masui, Douglas Chodi

Fungos Filamentosos, β -glucosidase, Celobiose, Purificação.

TERMO DE APROVAÇÃO

LUCIANE GOMES FREIRE

Purificação e caracterização bioquímica de uma β -glucosidase do fungo termófilo *Humicola brevis* var. *thermoidea*

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 de requisito parcial do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Biologia Molecular).

_____ de _____ de 2020

Comissão Examinadora:

Prof. (a) Dr. (a) Douglas Chodi Masui (orientador)
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-UFMS

Prof. (a) Dr. (a) Fabiana Fonseca Zanoelo
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-UFMS

Prof. (a) Dr. (a) Roberto Ruller
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-UFMS

Prof. (a) Dr. (a) Giovana Cristina Giannesi (suplente)
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-UFMS

AGRADECIMENTOS

Pela minha vida, por tudo conquistado até este momento, por todas as dificuldades, lutas, vitórias e pelas oportunidades que me foram dadas, por ter vivido fases difíceis, que foram matérias-primas de aprendizado.

Não posso deixar de agradecer a minha família, meus irmãos e aos meus pais Luiz e Rosemy, sem os quais não estaria aqui, pelo eterno orgulho, pelo apoio, compreensão, ajuda e por sempre estarem ao meu lado intercedendo por mim, eu sou eternamente grata!

Ao meu orientador Prof. Dr. Douglas Chodi Masui, que ajudou na construção e execução deste trabalho, pela compreensão, auxílio e por estar sempre à disposição.

Aos meus amigos de laboratório, em especial Aline e Isabela pelo companheirismo, ajuda em alguns experimentos, apoio emocional e pela amizade.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-UFMS pela estrutura acadêmica. Ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular.

Agradeço especialmente a Deus... Nele confiei, esperei e conquistei!

RESUMO

A biodegradação da biomassa lignocelulósica, particularmente da celulose, depende de enzimas produzidas principalmente por microorganismos. Entre outras enzimas, as celulasas e β -glucosidasas atuam de forma a liberar unidades de celo-oligossacarídeos e glicose. Porém, a maioria dessas celulasas sofre uma inibição pela ação do seu próprio produto, além de serem fortemente inibidas por glicose. O fungo termófilo *Humicola brevis* var. *thermoidea* mostrou ser um bom produtor de uma β -glucosidase tolerante à glicose e estimulada por xilose, em meio de cultivo sólido, simples e barato, constituído por somente farelo de trigo e água. A clivagem da ligação glicosídica dos celo-oligossacarídeos e celobiose por β -glucosidase estimuladas ou tolerantes à presença de glicose é de grande interesse industrial, pois é uma enzima chave no processo de sacarificação de resíduos lignocelulósicos. Avanços em processos biotecnológicos estão sendo desenvolvidos com objetivo de produzir diferentes produtos químicos e/ou melhorar outros produtos como bioetanol de 2ª geração, nas indústrias de alimentos, panificação, bebidas, têxtil e de papel e celulose. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi a purificação e caracterização bioquímica de uma β -glucosidase de *H. brevis* var. *thermoidea*. A enzima β -glucosidase foi purificada até a sua homogeneidade após 4 passos cromatográficos, onde apresentou um rendimento final de 17% e um fator de purificação de 362,7 vezes. A massa molecular estimada por SDS-PAGE foi de 125kDa. A enzima demonstrou-se resistente a temperaturas mais altas, apresentando a atividade máxima entre 60 e 65°C e declínio após este ponto, apresentou meia-vida após 3 horas a 60°C e manteve-se praticamente estável a partir deste ponto até 8 h. Além disso, os parâmetros avaliados indicam que esta enzima tem sua atividade ótima em pH 5,0 sendo praticamente estável a um pH de 2,5 a 8,0. A maioria dos íons, agentes redutores e quelantes, estimularam a atividade da enzima. Os resultados demonstram que *H. brevis* pode ser um candidato a contribuir para o conhecimento das propriedades de uma enzima com grande potencial de aplicação biotecnológica.

Palavras-chave: Fungos Filamentosos, β -glucosidase, Celobiose, Purificação.

ABSTRACT

The biodegradation of lignocellulosic biomass, particularly cellulose, depends on enzymes produced mainly by microorganisms. Among other enzymes, cellulases and β -glucosidases act to release units of cell-oligosaccharides and glucose. However, most of these cellulases are inhibited by the action of their own product, in addition to being strongly inhibited by glucose. The thermophilic fungus *Humicola brevis* var. *thermoidea* proved to be a good producer of a glucose-tolerant β -glucosidase stimulated by xylose, in a solid, simple and inexpensive culture medium, consisting only of wheat bran and water. The cleavage of the glycosidic bond of cell-oligosaccharides and cellobiose by stimulated β -glucosidase or tolerant to the presence of glucose is of great industrial interest, as it is a key enzyme in the process of saccharification of lignocellulosic residues. Advances in biotechnological processes are being developed with the objective of producing different chemical products and / or improving other products such as 2nd generation bioethanol, in the food, bakery, beverage, textile and paper and cellulose industries. In this context, the objective of this work was the purification and biochemical characterization of a β -glucosidase from *H. brevis* var. *thermoidea*. The β -glucosidase enzyme was purified until homogeneous after 4 chromatographic steps, where it presented a final yield of 17% and a purification factor of 362,7 times. The molecular mass estimated by SDS-PAGE was 125kDa. The enzyme proved to be resistant to higher temperatures, showing the maximum activity between 60 and 65°C and declining after this point, showed a half-life after 3 hours at 60°C and remained practically stable from this point until 8 h. In addition, the evaluated parameters indicate that this enzyme has its optimal activity at pH 5,0 and is practically stable at a pH of 2,5 to 8,0. Most ions, reducing and chelating agents, stimulated the enzyme's activity. The results demonstrate that *H. brevis* can be a candidate to contribute to the knowledge of the properties of an enzyme with great potential for biotechnological application.

Keywords: β -glucosidase, Cellobiose, Purification; Filamentous Fungi.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Estrutura química da celulose (A) e celobiose (B)..... | 15 |
| Figura 2 - Modelo de degradação enzimática em celulose com local de ação..... | 17 |
| Figura 3 – Perfil cromatográfico da concentração de proteínas (o) e atividade enzimática (●) da β -glucosidases de <i>H. brevis</i> , após coluna DMAE-Fractogel..... | 31 |
| Figura 4 – Eletroforese em condições não desnaturantes (PAGE) A) Extrato Bruto; B) Coluna DMAE-Fractogel PICO II; C) Coluna DMAE-Fractogel PICO III..... | 32 |
| Figura 5 – Perfil cromatográfico da concentração de proteínas (o) e atividade enzimática (●) da β -glucosidases de <i>H. brevis</i> , após coluna Sephacryl S-200..... | 33 |
| Figura 6 – 1-Eletroforese em condições não desnaturantes (PAGE) - A) Extrato Bruto; B) Coluna Sephacryl S-200..... | 34 |
| Figura 7 – Perfil cromatográfico da concentração de proteínas (o) e atividade enzimática (●) da β -glucosidases de <i>H. brevis</i> , após coluna Phenyl Sepharose. | 35 |
| Figura 8 – Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) 1) Marcador de peso molecular de 10 a 250 kDa (1A); Extrato Bruto (1B); Marcador de peso molecular de 10 a 250 kDa (2A); Coluna DMAE-Fractogel (2B); Coluna Sephacryl S200 (2C); Coluna Phenyl-Sepharose (2D). Uma banda principal com massa molecular de 125 KDa foi obtido por SDS-PAGE (Figura 9). | 36 |
| Figura 9 – Determinação da massa molecular da proteína. Os círculos marcados em preto e o em branco representam o padrão de massa molecular e a β -glucosidase purificada, respectivamente. | 36 |
| Figura 10 – Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e zimograma da β -glucosidase purificada. A) Marcador de peso molecular de 10 a 250 kDa; B) Zimograma..... | 37 |

- Figura 11** – Efeito do pH na atividade β -glucosidase de *H. brevis* purificada. Atividade enzimática avaliada em intervalos de pH variando de 2,5 a 8,0. 38
- Figura 12** – Efeito da estabilidade ao pH na atividade β -glucosidase de *H. brevis* purificada. Atividade enzimática avaliada em intervalos de pH variando de 2,5 a 8,0, durante um período de 24 h. 39
- Figura 13** – Efeito da temperatura na atividade β -glucosidase de *H. brevis* purificada. Atividade enzimática avaliada em temperaturas entre 40 e 80°C, durante um período de 10 minutos. 40
- Figura 14** – Efeito da estabilidade térmica na atividade β -glucosidase de *H. brevis* purificada. A enzima foi incubada nas temperaturas de 55°C (■), 60°C (●) e 65°C (▲) durante um período de 10 a 480 minutos (8h). Alíquotas foram retiradas nos tempos indicados para a dosagem de atividade enzimática. 41

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Purificação da β -glucosidase de <i>Humicola brevis</i> | 31 |
| Tabela 2 - Efeito de íons na atividade da β -glucosidase de <i>H. brevis</i> purificada..... | 42 |
| Tabela 3 - Efeito de íons na atividade da β -glucosidase de <i>H. brevis</i> purificada..... | 43 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------------------|---|
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| BDA | Batata, dextrose e ágar |
| BSA | Soroalbumina bovina |
| CBH | Celobiohidrolase |
| DMAE | Dimetilaminoetil |
| EDTA | Ácido Etilenodiamino tetra-acético |
| EGTA | Àcido aminopolicarboxílico |
| GH | Hidrolases de Glicosídeos |
| kDa | Quilo Dalton |
| L | Litro |
| mg/mL | Miligrama por mililitro |
| mmol | Milimol |
| nm | Nanômetro |
| PAGE | Eletroforese em Gel de Poliacrilamida |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |
| <i>p</i> NP-Glu | <i>p</i> -nitrofenil-β-D glucopiranosídeo |
| SDS | Dodecil Sulfato de Sódio |
| Tris | Hidroximetilaminometano |
| ug | Micrograma |
| uL | Microlitro |
| umol | Micromol |
| U mg ⁻¹ | Unidades por miligramas de proteína |
| U mL ⁻¹ | Unidades por mililitro de proteína |
| 1U | Unidades de atividade enzimática |
| °C | Grau Celsius |
| % | Porcentagem |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 13 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 15 |
| 2.1 A biomassa lignocelulósica | 15 |
| 2.2 Biodegração de materiais lignocelulósicos | 16 |
| 2.3 As β -glucosidases | 17 |
| 2.4 Produção de enzimas microbianas de interesse industrial e suas aplicações | 19 |
| 2.5 Fungos Filamentosos | 20 |
| 2.6 O fungo termófilo <i>Humicola brevis</i> | 21 |
| 3. OBJETIVOS | 23 |
| 3.1. OBJETIVO GERAL | 23 |
| 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 23 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 24 |
| 4.1 Organismo e manutenção da linhagem | 24 |
| 4.2 Crescimento em meio semi-sólido | 24 |
| 4.3 Extração enzimática | 24 |
| 4.4 Determinação da atividade β -glucosidase | 24 |
| 4.5 Dosagem de proteína | 25 |
| 4.6 Purificação da β -glucosidase | 25 |
| 4.7 Análise eletroforética | 26 |
| 4.8 Análise por zimograma | 27 |
| 4.9 Efeito do pH na atividade e na estabilidade da enzima purificada | 27 |
| 4.10 Efeito da temperatura na atividade e na termoestabilidade da enzima purificada | 28 |
| 4.11 Efeito de diferentes íons na atividade enzimática | 28 |
| 4.12 Efeito de inibidores na atividade enzimática (quelantes e agentes redutores) | 28 |
| 4.13 Efeito de surfactantes na atividade enzimática | 29 |
| 4.14 Efeito de solventes orgânicos na atividade enzimática (solventes) | 29 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 30 |
| 6. CONCLUSÃO | 44 |
| 7. PERSPECTIVAS FUTURAS | 44 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 45 |

1 - INTRODUÇÃO

A degradação da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentecíveis atrai atenção e têm sido utilizadas em aplicações biotecnológicas, pois representam uma fonte alternativa para produção de diferentes produtos químicos e/ou melhoria de outros produtos, como suplementos na alimentação animal, nas indústrias de panificação, bebidas, têxteis e de branqueamento de polpa de celulose (POLIZELI *et al.*, 2005; KUMAR; SINGH; SINGH, 2008; DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009; KUHAD; GUPTA; SINGH, 2011). Além disso, a demanda crescente de energia e o esgotamento de combustíveis fósseis tem sido alvo de discussão, sendo que estudos são direcionados para a busca de fontes alternativas de produção de energia mais amigáveis ao meio ambiente (TIWARI; MISRA; SANGWAN, 2013; SRIVASTAVA *et al.*, 2019).

Na natureza, a biodegradação da lignocelulose envolve a ação de enzimas produzidas por uma variedade de microrganismos, como fungos e bactérias, aeróbicos e anaeróbicos, mesófilos e termófilos (BHAT; BHAT, 1997). Essa biomassa é constituída principalmente pela celulose, o biopolímero orgânico mais abundante na terra, além de hemicelulose e lignina. A clivagem de suas ligações glicosídicas por enzimas desempenha um papel crucial em processos biológicos em organismos vivos (TIWARI; MISRA; SANGWAN, 2013).

O “complexo celulolítico” (WARREN, 1996) é um sistema que abrange várias enzimas que agem sinergicamente para degradar a celulose. Este reúne as enzimas endoglucanases, as exoglucanases e as β -glucosidases (BHATIA; MISHRA; BISARIA, 2002; SAHA, 2004; KUMAR; SINGH; SINGH, 2008; SINGHANIA *et al.*, 2010).

A maioria das β -glucosidases (celobiasas) descritas na literatura é fortemente inibida por glicose. Durante a degradação da celulose por endo- e exoglucanases, ocorre o acúmulo de celo-oligossacarídeos, o que inibe essas enzimas por mecanismo de inibição pelo produto de reação. As β -glucosidases quebram esses celo-oligossacarídeos liberando glicose, revertendo a inibição catabólica pelo produto. O problema é que a maioria das β -glucosidases geralmente é inibida por glicose. Entretanto, estudos preliminares já mostraram que β -glucosidases de *H. brevis* são tolerantes à glicose (MASUI *et al.*, 2012). Assim, nos últimos anos, há grande interesse por β -glucosidases estimuladas ou tolerantes à presença de glicose, pois esta é uma enzima chave visando sua utilização em processos de sacarificação de resíduos lignocelulósicos, procurando atingir um maior grau de sacarificação da celulose em processos industriais. Resultados anteriores mostraram que os gêneros *Humicola* e

Scytalidium são excelentes produtores de β -glucosidases estimuladas por glicose e xilose, que parecem constituir uma nova família de enzimas, característica de fungos termófilos (ZANOELO *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2010; NASCIMENTO *et al.*, 2010; SALGADO *et al.*, 2018). A ativação destas β -glucosidases por glicose, é um aspecto particularmente interessante, considerando a presença simultânea de celulose e hemicelulose em resíduos hemicelulósicos. Por outro lado, é extremamente intrigante o mecanismo de ativação da atividade destas β -glucosidases pela glicose.

O maior desafio para a aplicação biotecnológica das enzimas é seu alto custo de produção, a busca por metodologias que possam reduzir o custo de produção de enzimas e microrganismos com alta taxa de crescimento que sejam capazes de se desenvolver em fontes baratas e de fácil acesso é a atual abordagem para mudar esse paradigma (NASCIMENTO *et al.*, 2010). Desta forma são necessários estudos de purificação e caracterização bioquímica, tornando clara a importância prática e acadêmica dos resultados pretendidos.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A biomassa lignocelulósica

As matérias-primas lignocelulósicas são as fontes renováveis mais abundantes na natureza, incluindo resíduos agroindustriais e urbanos, além de madeiras (angiospermas e gimnospermas). O conjunto lignocelulósico dos sistemas florestais representa 20% da reserva de carbono terrestre (KUMAR; SINGH; SINGH, 2008).

Os materiais lignocelulósicos apresentam-se como uma matriz complexa, composta de três tipos de polímeros: a celulose (50%), a hemicelulose (20-25%) e a lignina (20-30%). A celulose é um polímero não ramificado de moléculas de glicose unidas por ligações *O*-glicosídicas do tipo β -1,4 (Figura 1A) (KUMAR; SINGH; SINGH, 2008).

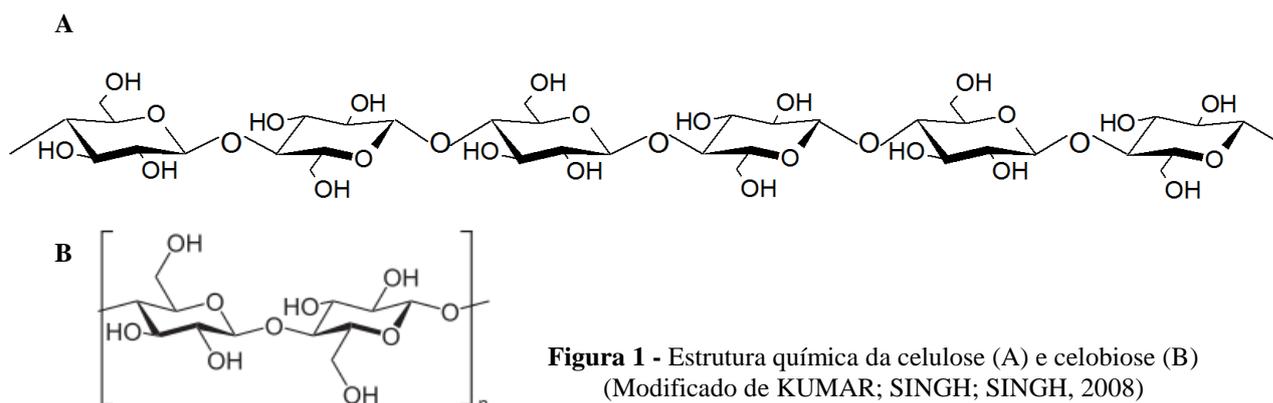


Figura 1 - Estrutura química da celulose (A) e celobiose (B)
(Modificado de KUMAR; SINGH; SINGH, 2008)

A forma estendida da celulose é a conformação mais estável da molécula, devido à configuração β das ligações glicosídicas, originando cadeias longas e retas. Nessa conformação, cada monômero de glicose apresenta uma rotação de 180° em relação aos vizinhos, de modo que a celobiose, unidade básica repetitiva da molécula, é constituída por duas moléculas de glicose unidas por ligação β -1,4 com um ângulo de rotação de 180° uma em relação à outra (Figura 1B) (KUMAR; SINGH; SINGH, 2008). O comprimento de cada cadeia varia de 100 a 1400 resíduos e o alinhamento de várias cadeias celulósicas origina fibras supramoleculares cristalinas, de alta resistência tensional (BÉGUIN; AUBERT, 1994; KUMAR; SINGH; SINGH, 2008; BRETHAUER; STUDER, 2015).

A maioria das hemiceluloses ocorre como heteropolissacarídeos, consistindo de uma cadeia linear de resíduos de monossacarídeos unidos por ligações β -1,4 formando uma

estrutura principal composta por um tipo específico de resíduo, a partir da qual surgem as ramificações laterais de cadeias curtas de outros açúcares. Classificam-se de acordo com o açúcar predominante na cadeia principal e na ramificação lateral, que podem ser pentoses, hexoses, xilose, arabinose, manose, glicose e galactose (WONG, 1988; BAJPAI, 1997; SRIVASTAVA *et al.*, 2019; BIELY; VRSANSKÁ; CLAEYSSSENS, 1991; CASTRO; PEREIRA, 2010). As hemiceluloses estão associadas com a celulose, a lignina e também com a pectina e estas são mais fáceis de serem hidrolisadas que a celulose, pois possuem massa molecular mais baixa e ramificações com cadeias laterais curtas (SINGH; BATRA; SOBTI, 2001; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

2.2 Biodegração de materiais lignocelulósicos

Na natureza, a biodegradação da lignocelulose envolve a ação simultânea de enzimas produzidas por uma variedade de microrganismos, como fungos filamentosos e bactérias, mesófilos e termófilos (BHAT; BHAT, 1997). Alguns microrganismos produzem enzimas capazes de degradar a celulose; o conjunto dessas enzimas, que atuam sinergicamente, é denominado “sistema enzimático celulolítico” ou “complexo celulolítico” (WARREN, 1996). O complexo celulolítico compreende várias enzimas hidrolíticas: as endoglucanases (endo-1,4- β -glucosidases: EG; EC 3.2.1.4) atuam na região amorfa do polímero, liberando principalmente oligossacarídeos, além de celobiose e glicose; as exoglucanases (exo-1,4- β -glucosidases; CBH; EC 3.2.1.91) atuam na região cristalina da celulose, clivando as ligações glicosídicas a partir das extremidades da molécula, e liberam unidades de glicose e celobiose, sendo divididas em CBH1 (atuam nas extremidades redutoras da molécula) e CBH2 (atuam nas extremidades não redutoras); e por fim, as β -glucosidases (EC), que atuam sobre celooligossacarídeos curtos e celobiose, liberando glicose (ENOKI; ITAJURA; TANAKA, 1997; GOYAL; GHOSH; EVELEIGH, 1991; BHAT; BHAT, 1997; ÖGEL *et al.*, 2001; SAHA, 2004; ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006; ADEBAYO; MARTÍNEZ-CARRERA, 2015; NIGAM *et al.*, 2018).

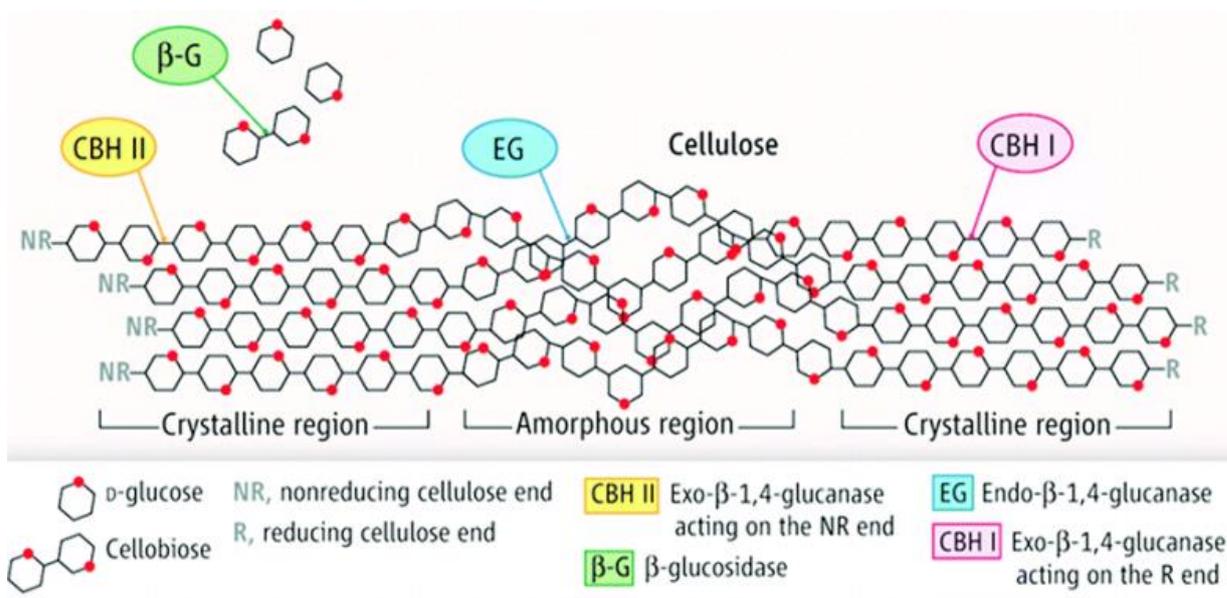


Figura 2 - Modelo de degradação enzimática em celulose com local de ação.

(Modificado de ADEBAYO; MARTÍNEZ-CARRERA, 2015)

2.3 As β-glucosidases

As celulasas são as enzimas responsáveis pela degradação da celulose, sendo divididas em β-1,4-endoglucanase, exoglucanase e β-glucosidases, as quais atuam em sinergismo (SATYAMURTHY *et al.*, 2011; BINOD *et al.*, 2019).

Para utilização de enzimas, independentemente do método de cultivo ou o organismo a ser utilizado, é necessário avaliar as condições ideais de aplicação para um bom resultado na produção, pois cada organismo possui sua condição especial para expressão enzimática, e essa otimização pode contribuir para diminuir os custos e aumentar a produção das enzimas de interesse industrial (CORRÊA *et al.*, 2014).

É grande a busca por novas enzimas microbianas capazes de atuar eficientemente sobre celulose e hemicelulose, principalmente, para a produção de açúcares para a obtenção do etanol celulósico, nas indústrias de alimentos, bebidas, têxtil, de papel e celulose (CASTRO; PEREIRA, 2010; MOLONEY *et al.*, 1985).

Neste sentido, a fim de aumentar a utilização das enzimas como biocatalisadores industriais é obrigatório obter enzimas com estabilidades operacionais melhoradas (ASGHER *et al.*, 2014), pois a maioria dos processos industriais ocorrem em altas temperaturas, principalmente, devido às altas taxas de reação, diminuição da viscosidade nos processos

fluidos, maior solubilidade do substrato e menor risco de contaminação por organismos indesejados (BRUINS; JANSSEN; BOOM, 2001; LEITE; GOMES, 2007; MÓL *et al.*, 2019).

As hidrolases de glicosídeos (mais de 2000 já foram identificadas) são classificadas em 164 famílias (SRIVASTAVA *et al.*, 2019), com base na similaridade das suas seqüências de nucleotídeos e padrões de enovelamento, segundo um modelo proposto por Henrissat e colaboradores (HENRISSAT; BAIROCH, 1996; HENRISSAT; DAVIES, 1997; revisto por BHATIA; MISHRA; BISARIA, 2002). Outro sistema de classificação para as β -glucosidases é baseado na especificidade do substrato da enzima sendo divididas em três grupos; (1) aril- β -glucosidases, que clivam preferencialmente aril-glicosídeos, como *p*-nitrofenil- β -D glucopiranosídeo (*p*NP-Glu), (2) celobiasas verdadeiras, que hidrolisam a celobiose em glicose, ou (3) enzimas com ampla especificidade de substrato, que atuam em uma ampla variedade de substratos, grupo que engloba a maioria das β -glucosidases (SINGH; VERMA; KUMAR, 2016; SINGHANIA *et al.*, 2013). Apesar desses sistemas de classificação serem muito utilizados, não levam em consideração muitos aspectos funcionais importantes das β -glucosidases, como tolerância à glicose e estimulação à glicose. Neste sentido, posteriormente foi proposto categorizar essas enzimas com base no efeito da glicose em sua atividade catalítica, entretanto, foram divididas em quatro classes: (I) 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) β -glucosidases não inibidas pela glicose em altas concentrações (SALGADO *et al.*, 2018).

As β -glucosidases são um grupo importante entre as hidrolases de glicosídeos, e estão reunidas nas famílias GH1 e GH3 (TEUGJAS; VÄLJAMÄE, 2013; SINGH; VERMA; KUMAR, 2016). A família 1 inclui 62 β -glucosidases, originárias de arqueobactérias, plantas e mamíferos; a estrutura tridimensional de várias destas enzimas já foi resolvida, revelando um padrão comum de disposição de α -hélices e β -folhas, além da presença de vários resíduos de aminoácidos altamente conservados, localizados nas proximidades do sítio ativo. Na família 3 estão classificadas 2362 hidrolases de glicosídeos, originárias de bactérias, bolores e leveduras, mas somente 4 delas tiveram sua estrutura tridimensional determinada até o momento. (JENKINS *et al.*, 1995; BHATIA; MISHRA; BISARIA, 2002).

Estudos biofísicos e estruturais de β -glucosidases estimuladas por glicose, seguidos de uma análise comparativa com outras β -glucosidases que não apresentam esta propriedade, podem contribuir para esclarecer quais as características estruturais que conferem a estas

enzimas a propriedade de estímulo pelo produto. A β -glucosidase pode acelerar a decomposição da celulose e melhorar o rendimento de glicose, catalisando a etapa de limitação da taxa de hidrólise da celobiose (TEUGJAS; VÄLJAMÄE, 2013; NG *et al.*, 2011).

2.4 Produção de enzimas microbianas de interesse industrial e suas aplicações

Enzimas produzidas por microrganismos são preferidas para uso industrial, em relação às enzimas de origem animal e vegetal, devido à sua ampla diversidade bioquímica, susceptibilidade de manipulação genética, sua grande variedade catalítica, além de serem obtidas em elevadas quantidades, com preço relativamente reduzido, possuindo bastante homogeneidade e qualidade, além do mais apresentam quase todas as características desejáveis para aplicação biotecnológica (RAO *et al.*, 1998; KUMAR; TAKAGI, 1999).

Essas enzimas têm sido utilizadas mundialmente nas indústrias para as mais diversas aplicações, como indústria de algodão e papel, detergentes, extração de sucos, aditivos para ração animal, extração de compostos químicos como flavonoides, produção de etanol de segunda geração, na indústria de bebidas, na produção de vinho, também ajuda na remoção do composto aromático dos precursores dos glicosídeos presentes nos sucos e mostos de frutas, no aroma do chá e no suco de frutas, entre outras, garantindo um grande mercado financeiro para essas enzimas (SU *et al.*, 2010; FAN *et al.*, 2011; KEERTI *et al.*, 2014; GUPTA, 2016; DELGADO *et al.*, 2019; SERRA; FUNCH; FORSTER, 2019).

Dependendo da aplicação onde a enzima será utilizada, é necessário que esta esteja em sua forma bruta ou pura. A sua forma bruta, devido ao seu baixo custo de produção, é a forma preferida pelos setores industriais (CHAPMAN; ISMAIL; DINU, 2018). Já a sua forma purificada permite ao pesquisador descobrir suas características físico-químicas, estruturais e biológicas sem que haja a interferência por inibidores ou contaminantes que estavam presentes no extrato bruto de onde foi retirada inicialmente. Os processos cromatográficos são, de longe, a técnica mais comum quando se deseja produtos com alta pureza e alto rendimento. (GOMES *et al.*, 2017; MÓL *et al.*, 2019). Estes métodos fornecem a base para o conhecimento dos processos biológicos envolvendo seres vivos, auxiliando no contínuo aperfeiçoamento da indústria biotecnológica, que não seria possível com a utilização do extrato bruto, uma vez que determinados processos necessitam de um alto grau de pureza (MCATEE *et al.*, 2016; BOYCE; WALSH, 2018).

O processo de fermentação, do ponto de vista bioquímico, é um procedimento metabólico de obtenção de energia a partir de compostos orgânicos (BOURDICHON *et al.*, 2012) sendo uma técnica muito utilizada para a conservação de alimentos e bebidas. Fungos filamentosos produzem enzimas de interesse que são utilizadas na indústria alimentícia (humana e animal) como produtos fermentados e bebidas alcoólicas, contribuem na indústria farmacêutica, estão presentes no processo de biodegradação e tratamento biológico de efluentes, nas indústrias têxtil de papel e celulose, nos quais a utilização auxiliaria na redução do impacto ambiental ocasionado pelo descarte incorreto dos materiais lignocelulósicos, na produção de enzimas de interesse industrial e na biotransformação. Eles também são utilizados em larga escala na área de gerenciamento de resíduos agroindustriais e ecológicos, pois mantêm o equilíbrio do ambiente, decompondo restos vegetais (ABREU; ROVIDA; PAMPHILE, 2015; KUMAR; SINGH; SINGH, 2008).

2.5 Fungos Filamentosos

Na natureza, organismos decompositores exercem papel fundamental na degradação da matéria orgânica do substrato. Os fungos filamentosos são os principais decompositores da biosfera. Estes microrganismos decompõem os cadáveres, os excrementos, restos de vegetais, ou seja, toda matéria orgânica dispersa no solo. A matéria orgânica incorporada nos organismos, libera dióxido de carbono na atmosfera e retorna ao solo os compostos nitrogenados e outras substâncias, para serem reutilizadas por plantas e animais (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007). Como excelentes decompositores, os fungos produzem grande quantidade de enzimas para a quebra das moléculas orgânicas, o que os torna agentes importantes nas áreas médica e industrial (DEMAIN; SANCHEZ, 2009).

Dentre os fungos, os filamentosos são preferidos, devido à facilidade de extração enzimática, pois estes possuem forma extracelular, isto é, secretada do meio de cultura (BENASSI *et al.*, 2014; POLIZELI *et al.*, 2005), o que facilita a recuperação do bioproduto do meio fermentado. Além disso, seus compostos de interesse podem ser obtidos a um baixo custo de produção. Portanto, os fungos são fontes importantes de vários compostos economicamente significantes, incluindo peptídeos, vitaminas, ácidos orgânicos, antibióticos, substâncias para a indústria farmacêutica, alimentícia, química e biotecnológica (CHAMBERGO; VALENCIA, 2016; KUMAR; SINGH; SINGH, 2008).

Apenas algumas espécies de fungos têm a capacidade de se desenvolver a temperaturas entre 45 e 55°C. Esses fungos compreendem formas termofílicas e termotolerantes, que são distintos com base no seu mínimo e máximo de temperatura de crescimento (COONEY; EMERSON, 1964). As enzimas termoestáveis são interessantes porque a elevação da temperatura da reação (até um certo limite) geralmente aumenta a taxa de reação e reduz o risco de contaminação microbiana (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005).

Diversos fungos filamentosos têm a propriedade de expressar diferentes isoformas da β -glucosidase, dependendo das condições de cultura ou fontes de carbono (SINGHANIA *et al.*, 2011), assim, a descoberta e caracterização bioquímica de novas β -glucosidases fúngicas são de grande importância (XIA *et al.*, 2016).

2.6 O fungo termófilo *Humicola brevis*

A linhagem de *Humicola brevis* var. *thermoidea* utilizada neste trabalho foi obtida do *American Type Culture Collection* (ATCC) Nº 28402. Trata-se de um fungo termófilo, ou seja, cresce em altas temperaturas. Sua velocidade máxima de crescimento ocorre entre 37-60°C, enquanto as temperaturas mínima e máxima em que foi observado crescimento foram de 23 e 65°C, respectivamente. A termofilia é uma característica altamente desejável para a utilização industrial de microrganismos, bem como de suas enzimas, as quais, devido à maior termoestabilidade tendem a ser preservadas de uma possível inativação térmica em operações de transporte e/ou manuseio.

O rendimento do processo de sacarificação da celulose pode ser melhorado com metodologias relacionando o uso de β -glucosidases tolerantes ao produto final (ZANOELO *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2010; NASCIMENTO *et al.*, 2010). Resultados preliminares obtidos em nosso laboratório mostraram que *H. brevis* var. *thermoidea* é um bom produtor de uma β -glucosidase estimulada em até 2 vezes por glicose, a qual é secretada para o meio extracelular quando o microrganismo é cultivado tanto em meio líquido como semi sólido (farelo de trigo e água 1:2, m:v). O fato de *H. brevis* secretar a enzima para o meio de cultivo é muito interessante, pois as β -glucosidases estimuladas por glicose descritas na literatura estão ligadas ao micélio ou ao espaço periplasmático (ZANOELO *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2010; NASCIMENTO *et al.*, 2010). A glicosilação é uma alteração pós-traducional muito comum

em enzimas de fungos termófilos e seu grau pode ter influência pela fonte de carbono, na qual foi relatado anteriormente para *Chaetomium thermophilum* var *coprophilum* (VENTURI, *et al.*, 2002), também em *Humicola grisea* var *thermoidea* (PERALTA *et al.*, 1997). Assim, os dados sugerem fortemente que este microrganismo pode representar uma fonte promissora de uma β -glucosidase bastante termoestável e com características particularmente interessantes para uma possível aplicação na hidrólise de materiais lignocelulósicos.

Três β -glucosidases produzidas pelo fungo *Humicola insolens* mostraram que essas enzimas são altamente tolerantes à inibição da glicose, compartilham características termofílicas e neutras, mas variam nas especificidades do substrato (XIA *et al.*, 2016; SALGADO *et al.*, 2018). Estudo realizado com uma β -glucosidase da família GH1, foi demonstrado que ocorrem interações alostéricas regulada pelas afinidades relativas dos locais de ligação para o substrato, como uma estratégia evolutiva em relação à estimulação ou tolerância a glicose/xilose (MELEIRO *et al.*, 2017; SALGADO *et al.*, 2018).

3 - OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi a purificação e caracterização das propriedades bioquímicas de uma β -glucosidase de *H. brevis* var. *thermoidea*, visando futuramente a formulação de coquetéis enzimáticos eficientes para a sacarificação de materiais lignocelulósicos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Purificar a enzima;
- b) Realizar eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e não desnaturantes (PAGE) da enzima purificada;
- c) Verificar do número de β -glucosidases diferentes presentes no meio de cultivo por meio da análise de atividade após PAGE/ SDS-PAGE;
- d) Analisar a enzima purificada por zimograma;
- e) Caracterizar bioquimicamente a enzima purificada. Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade da β -glucosidase. Estabilidade térmica e ao pH;
- f) Analisar o efeito de diferentes substâncias: íons, quelantes, agentes redutores, surfactantes e solventes.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Organismo e manutenção da linhagem

A linhagem de *H. brevis* var. *thermoidea* usada neste trabalho foi obtida da ATCC (ATCC 28402).

Humicola brevis foi mantido por meio de repiques sucessivos em meio inclinado solidificado BDA (batata, dextrose e ágar) segundo instruções do fabricante (Oxoid, UK). Após o repique, *H. brevis* foi incubado por 7-14 dias à 50°C. Após o crescimento, o fungo foi armazenado em geladeira por até um mês.

4.2 Crescimento em meio semi-sólido

Humicola brevis foi cultivado à 40°C em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, em meio de cultivo semi-sólido contendo 5,0 g de farelo de trigo em 10 mL de água por 2-10 dias, com monitoramento da umidade. Foi realizado a padronização do meio de cultura e do tempo de cultivo mais adequado para a produção de β -glucosidases por *H. brevis*.

4.3 Extração enzimática

Após o crescimento, o meio de cultivo foi suspenso em 30 mL de água destilada e o extrato obtido filtrado em peneira sintética. O filtrado foi centrifugado por 10 minutos a 10.000 g a 4°C e o sobrenadante utilizado como extrato bruto enzimático.

4.4 Determinação da atividade β -glucosidase

A atividade β -glucosidase foi realizada utilizando hidrólise do substrato sintético *p*-nitrofenil- β -D glucopiranosídeo (*p*NP-Glu) foi determinado descontinuamente,

acompanhando a liberação do íon p-nitrofenolato ($\epsilon_{410\text{nm}, \text{pH } 12,0} = 17.500 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$). As condições padrão dos ensaios foram tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1} , pH 5,0, contendo pNP-Glu em um volume final de 0,6 mL. A reação foi iniciada pela adição de 100 μL da amostra contendo enzima, convenientemente diluída ao meio reacional, realizada em banho-maria a $60 \text{ }^\circ\text{C}$, em intervalos de tempo adequados e interrompida pela adição de 600 μL em solução aquosa saturada de tetraborato de sódio. Controles sem adição de enzima foram realizados com a finalidade de avaliar a hidrólise espontânea do substrato nas condições utilizadas nos ensaios. As leituras da atividade β -glucosidade foram realizadas em espectrofotômetro T80+ (PG Instruments, GBR) a 410nm. Uma unidade de atividade enzimática (1U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1,0 μmol do substrato 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 (U mg^{-1}).

Alternativamente, a atividade β -glucosidase foi realizada em leitor de microplacas. Resumidamente, a atividade β -glucosidase foi medida descontinuamente em meio de reação contendo tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1} , pH 5,0, contendo pNP-Glu em um volume final de 0,19 mL. A atividade foi interrompida adicionando 0,6 mL de tetraborato de sódio, e o produto da reação determinado transferindo 0,1 mL para microplacas de 96 poços (Nunc) usando leitor de microplacas Spectramax Plus 384 (Molecular Devices, EUA).

Os valores das medidas de atividade mostrados representam a média \pm desvio padrão e foram calculados a partir de dados de dois homogeneizados diferentes ($N= 2$). As curvas apresentadas são aquelas onde se obteve o melhor ajuste dos dados e cada figura é uma curva representativa de uma purificação.

4.5 Dosagem de proteína

A concentração de proteína foi determinada empregando o método descrito por Read e Northcote (1981), usando BSA (soroalbumina bovina) como padrão.

4.6 Purificação da β -glucosidase

O extrato bruto contendo β -glucosidase de *H. brevis* foi submetido à precipitação com

sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 60% durante 24h, conservado sob refrigeração. O extrato bruto foi centrifugado a 8000g à 4°C, durante 10 minutos. O precipitado foi diluído em água destilada e posteriormente dialisado para remoção do sal, com trocas sucessivas de água deionizada e por último com tampão Tris.HCl 10 mmol L⁻¹ em pH 8,0 durante 24 horas. A amostra foi estocada em geladeira e teve sua atividade testada periodicamente.

Após a concentração da enzima a padronização da purificação da enzima envolveu procedimentos clássicos de cromatografia.

A amostra foi aplicada em coluna de cromatografia com resina de troca iônica DMAE Fractogel (2,0 x 8,5cm), aplicando primeiramente tampão Tris.HCl 10 mmol L⁻¹ em pH 8,0, em seguida, foi aplicado gradiente em diferentes concentrações de cloreto de sódio (80 mmol L⁻¹, 100 mmol L⁻¹ e gradiente de 1,0 mol L⁻¹, respectivamente).

Após a coluna DMAE Fractogel, a amostra foi submetida à diálise com trocas sucessivas de água deionizada e com tampão Tris.HCl 10 mmol L⁻¹ em pH 8,0 durante a noite, para posteriormente ser aplicada em coluna de exclusão por peso molecular Sephacryl S-200 (1,8 x 60cm) (GE, DEU), aplicando tampão Tris.HCl 10 mmol L⁻¹ em pH 8,0 com 150mM de cloreto de sódio.

Posteriormente, a amostra foi submetida a coluna de interação hidrofóbica Phenyl Sepharose (1,0 x 10 cm) (GE, DEU). A amostra e a coluna foram primeiramente tratadas com tampão Tris.HCl 10 mmol L⁻¹ em pH 8,0 contendo 2,0 mol L⁻¹ de cloreto de sódio.

Em todas as colunas cromatográficas foi utilizado o coletor de frações através de um fluxo contínuo, coletando um volume de 1,2 mL/tubo correspondente a 50 gotas. As frações contendo atividade da β -glucosidase foram reunidas, dialisadas e analisado quanto a sua pureza em gel de poliacrilamida (PAGE).

4.7 Análise eletroforética

A pureza das frações obtidas a cada passo de cromatografia foi analisada por eletroforese em condições não desnaturantes (PAGE) de acordo com os métodos descritos por Davis (1964). Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi realizada de acordo com o método de Laemmli (1970), as proteínas foram aplicadas em géis de poliacrilamida e a migração das bandas foi comparada com peso molecular de 10 a 250 kDa Kaleidoscope

(BioRad, EUA). Após diálise em água destilada as amostras foram preparadas em concentradores Microcon Amicon (Millipore, EUA).

Para a eletroforese PAGE, 10 μL da amostra foi preparada utilizando 10 μL de azul de bromofenol e 10 μL de glicerol. Foi aplicado 25 μL dessa amostra em gel de poliacrilamida 7%. As eletroforeses foram realizadas em tampão de corrida Tris.HCl 0,05 mol L⁻¹ /glicina 0,384 mol L⁻¹ pH 8.3. O campo elétrico aplicado foi de 120V constante.

Para o SDS-PAGE, foi utilizado 10 μL de amostra preparada com 10 μL de tampão Tris.HCl 5 mmol L⁻¹, pH 7,5, 0,1 mL de β -mercaptoetanol, 0,2 mL de glicerol e 0,2 mL de solução de azul de bromofenol. Essa ressuspensão foi incubada em água fervente durante cinco minutos e a seguir 25 μL foi aplicado em gel de poliacrilamida 7% contendo SDS. Para o extrato bruto foi aplicado 0,9 μg de proteína, para a coluna DMAE 1,1 μg , Sephacryl S-200 1,4 μg e Phenyl Sepharose 0,6 μg . A eletroforese foi realizada na presença de tampão Tris.HCl 0,05 mol L⁻¹, Glicina 0,384 mol L⁻¹ e SDS 0,2% em pH 8,3. A separação das proteínas foi realizada através da aplicação de uma voltagem constante de 120V.

As bandas de proteína foram reveladas com Coomassie Brilliant blue R250 ou Nitrato de Prata (BLUM, BEIER, GROSS, 1987).

4.8 Análise por zimograma

Para verificar a atividade β -glucosidásica no gel após SDS-PAGE foi analisado por um zimograma em gel de poliacrilamida a 7,0 %, usando a esculina 0,1 % e como substrato cloreto férrico 0,03% (KWON *et al.*, 1994), em tampão acetato de sódio 100 mmol L⁻¹, pH 5,0. A amostra foi preparada de acordo com a descrita acima para SDS-PAGE, porém sem ferver a amostra.

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

O pH ótimo para a atividade da enzima foi determinado em duplicata incubando a enzima purificada e diluída à 60°C em solução tampão McIlvaine (MCILVAINE, 1921) diluída com variação de pH de 2,5 a 8,0. A estabilidade ao pH foi realizada por incubação da enzima em tampão McIlvaine pH de 2,5 a 8,0, sob refrigeração (4°C), medindo sua atividade

após 24 h. A atividade foi mensurada utilizando tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5,5, contendo *p*NP-Glu 1,0 mmol L⁻¹.

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

A temperatura ótima para a enzima purificada foi determinada em duplicata incubando a mistura de reação em diferentes temperaturas, na faixa de 40 °C a 80 °C. A estabilidade térmica foi determinada por incubação da enzima purificada em diferentes intervalos de tempo (de 0 a 8 horas) a temperaturas de 55, 60, 65 e 70 °C. A atividade foi mensurada utilizando tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5,5, contendo *p*NP-Glu 1,0 mmol L⁻¹.

4.11 Efeito de diferentes íons na atividade enzimática

A atividade da β-glucosidase purificada foi investigada em duplicata na presença dos sais CoCl₂, CuSO₄, HgCl₂, SrCl₂, MgSO₄, CaCl₂, LiCl, KCl, MnCl₂, NaCl, AgNO₃, nas concentrações de 1,0 e 10 mmol L⁻¹, em condições utilizando tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5,5, contendo *p*NP-Glu 1,0 mmol L⁻¹. Os resultados foram expressos em atividade relativa, sendo que no controle não foi adicionado os íons.

4.12 Efeito de inibidores na atividade enzimática (quelantes e agentes redutores)

O efeito de inibidores na atividade enzimática foi avaliado em duplicata utilizando-se os seguintes compostos: Ácido Etilenodiamino tetra-acético (EDTA), Ácido aminopolicarboxílico (EGTA), Mercaptoetanol, Temed e Ácido ascórbico. A enzima foi incubada com os inibidores em concentrações de 1,0 e 10 mmol L⁻¹. Posteriormente, foi determinada a atividade residual de acordo o ensaio padrão, utilizando tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5,5, contendo *p*NP-Glu 1,0 mmol L⁻¹. Os resultados foram expressos em atividade relativa, sendo que no controle não foi adicionado inibidores.

4.13 Efeito de surfactantes na atividade enzimática

O efeito de surfactantes na atividade foi analisado em duplicata com a presença de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e Tween 80. A enzima foi incubada com os surfactantes administrados em concentrações de 0,5 e 1,0 %. Posteriormente a atividade residual foi dosada utilizando tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5,5, contendo *p*NP-Glu 1 mmol L⁻¹. Os resultados foram expressos em atividade relativa, sendo no controle não foi adicionado os surfactantes.

4.14 Efeito de solventes orgânicos na atividade enzimática (solventes)

Para efeito de solventes orgânicos a enzima foi incubada com os solventes: Metanol, Acetona e Acetonitrila em concentrações de 1 e 10 %. A incubação foi realizada e posteriormente, dosou-se a atividade residual em duplicata de acordo com as condições utilizando tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5,5, contendo *p*NP-Glu 1,0 mmol L⁻¹. Os resultados foram expressos em atividade relativa, sendo no controle não foi adicionado os solventes.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a produção da linhagem de *Humicola brevis* var. *thermoidea*, em meio semi-sólido para a produção da β -glucosidase e etapas de ensaios enzimáticos, garantiram a purificação da enzima.

Para uma enzima ser utilizada industrialmente, é necessário antes passar por um processo de purificação a fim de conhecer suas propriedades bioquímicas, estrutura, função e potenciais aplicações. Em nosso estudo, as amostras a partir do extrato bruto, passaram pelas seguintes etapas para obtenção de sua forma purificada, precipitação em sulfato de amônio, seguido de colunas de purificação, DMAE-Fractogel, Sephacryl S200 e por último a Phenyl-Sepharose.

Na Tabela 1 está representado um resumo das etapas de purificação, onde a enzima purificada apresentou um rendimento final de 17,0% e um fator de purificação de 362,7 vezes quando comparada ao extrato bruto.

Tabela 1 - Purificação da β -glucosidase de *Humicola brevis*

| Passo | U mL ⁻¹ | mL | U _{total} | mg mL ⁻¹ | mg | U mg ⁻¹ | Rendimento (%) | Purificação |
|--|--------------------|-----|--------------------|---------------------|-------|----------------------|----------------|-------------|
| Extrato bruto | 4,145 | 120 | 497,4 | 0,99 | 118,8 | 4,18 | 100 | 1,0 |
| Precipitação (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1,872 | 89 | 166,6 | 0,92 | 81,9 | 2,03 | 33,5 | 0,5 |
| DMAE-Fractogel (PIII) | 1,155 | 101 | 116,6 | 0,59 | 59,6 | 1,95 | 23,4 | 0,5 |
| Sephacryl S200 | 1,497 | 58 | 86,8 | 0,017 | 0,99 | 87,6 | 17,4 | 20,9 |
| Phenyl-Sepharose (PI) | 0,903 | 94 | 84,9 | 0,0006 | 0,056 | 1,52x10 ³ | 17,0 | 362,7 |

A β -glucosidase de *H. brevis* foi purificada até sua homogeneidade após quatro etapas de purificação. O processo de pré-purificação da β -glucosidase iniciou-se a partir do extrato bruto que resultou em uma atividade enzimática de 497,4 U_{totais} e 4,18 U mg⁻¹. Foi realizado a eletroforese do extrato bruto em condições não desnaturantes (PAGE).

Posteriormente, foi realizada a precipitação da enzima usando (NH₄)₂SO₄. O melhor resultado foi obtido usando 60% de sulfato de amônio (dados não mostrados).

Comparando o rendimento do processo de purificação entre extrato bruto e a obtenção da enzima pura, a amostra apresentou uma queda, principalmente no processo de precipitação

com sulfato de amônio, porém, entre as outras colunas, manteve o rendimento dentro do perfil de um processo de purificação. O rendimento final da enzima foi de 17,0% e teve uma diminuição na atividade enzimática se comparado ao extrato bruto. Enquanto isso, o índice de purificação aumentou 362,7 vezes.

Durante as etapas de purificação, geralmente a recuperação da enzima de interesse é reduzida, diminuindo seu rendimento e cerca de 10% da enzima pode ser perdida durante cada etapa, levando a uma baixa recuperação (SINGHANIA *et al.*, 2010; MÓL *et al.*, 2019) neste sentido, é necessário a otimização, e o uso de uma sequência de técnicas de cromatografia combinada que aumentará os valores de purificação.

Após a concentração da enzima através de precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, foi realizada a diálise da amostra que apresentou 166,6 U_{total} e $2,03 \text{ U mg}^{-1}$, obtendo um rendimento de 33,5% e um fator de purificação de 0,5 vezes. Posteriormente, a amostra foi aplicada em coluna cromatográfica com resina de troca iônica DMAE Fractogel.

Na cromatografia em DMAE a amostra apresentou três picos de proteínas (Abs 280 nm), e três picos de atividade β -glucosidase (Figura 3).

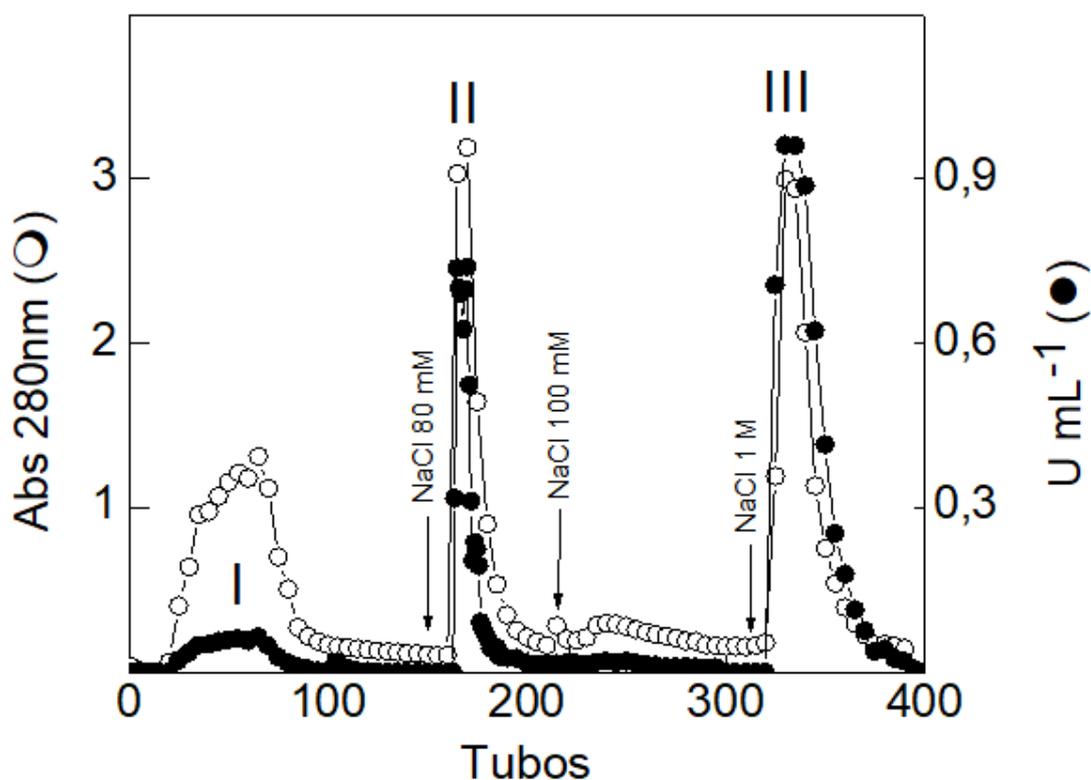


Figura 3 – Perfil cromatográfico da concentração de proteínas (○) e atividade enzimática (●) da β -glucosidases de *H. brevis*, após coluna DMAE-Fractogel.

Os círculos em preto e em branco representam a atividade β -glucosidase e a leitura a 280 nm de proteínas, respectivamente

Os picos contendo maior atividade β -glucosidase (Pico II e III) foram reunidos separadamente, dialisados, determinado sua atividade β -glucosidásica e concentração de proteínas. As frações I e II foram dialisadas e após tiveram sua atividade β -glucosidase medida novamente. Na coluna DMAE após eluição no tampão com NaCl 80 mmol L⁻¹ (Pico II) a amostra apresentou 12,3 U_{total} e após tampão com NaCl 1 M (Pico III) a amostra apresentou 116,6 U_{total} de atividade β -glucosidase.

O pico III proveniente da coluna de troca iônica apresentou um rendimento de 23,4 % e um fator de purificação de 0,5 vezes.

Para o teste de pureza foi realizado uma eletroforese em condições não desnaturantes (PAGE). As frações correspondentes aos picos II e III apresentaram mais de uma banda sendo necessário mais etapas de purificação (Figura 4).



Figura 4 – Eletroforese em condições não desnaturantes (PAGE). A) Extrato Bruto; B) Coluna DMAE- Fractogel PICO II; C) Coluna DMAE- Fractogel PICO III

A eletroforese em condições não desnaturantes mostrou que a amostra não estava pura, então a fração contendo maior rendimento (Pico III) foi equilibrada com tampão Tris.HCl 10 mmol L⁻¹ em pH 8,0 contendo (150 mmol L⁻¹) de NaCl, concentrado e posteriormente, aplicado em coluna Sephacryl S-200.

A cromatografia em Sephacryl S-200 mostrou a presença de dois picos de proteína e apenas um pico com atividade β -glucosidase (Figura 5).

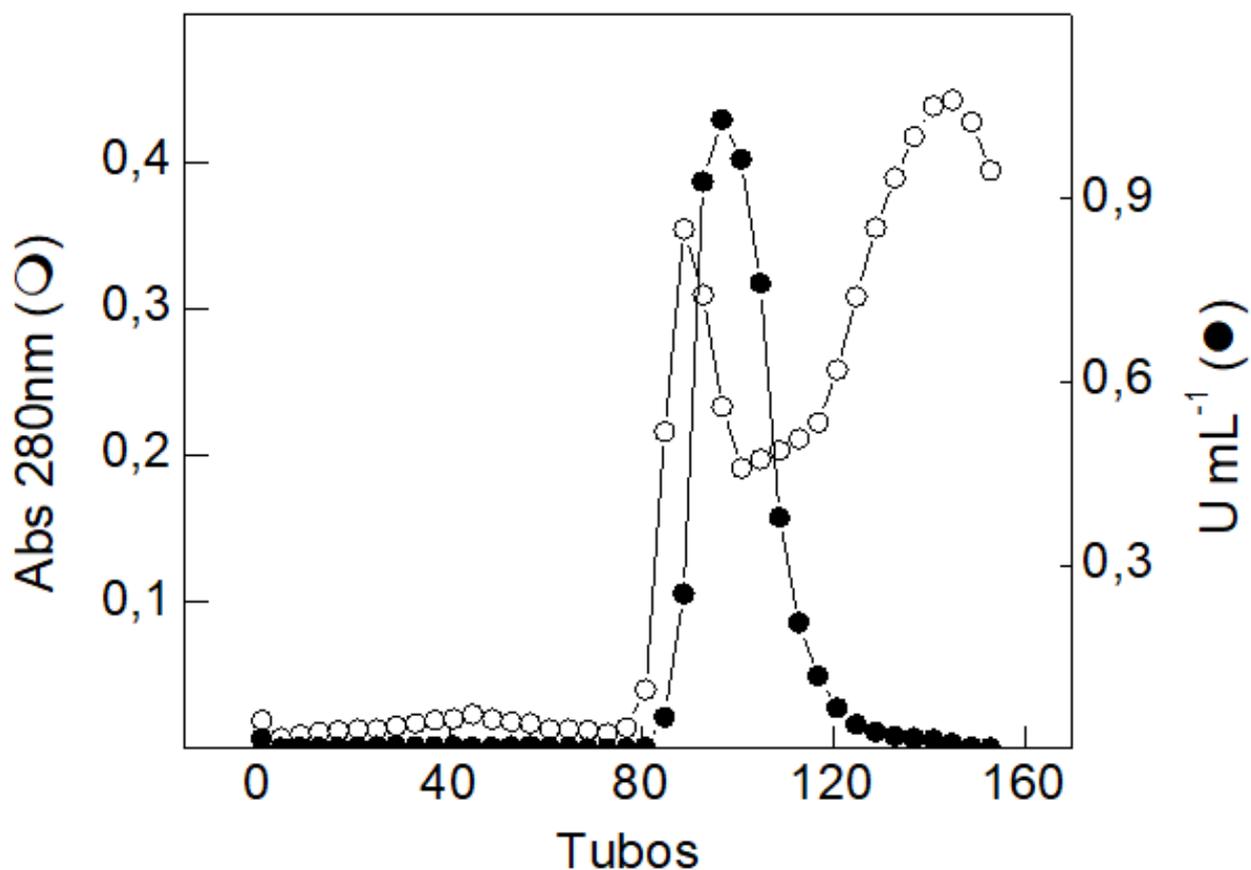


Figura 5 – Perfil cromatográfico da concentração de proteínas (○) e atividade enzimática (●) de β -glucosidases de *H. brevis*, após coluna Sephacryl S-200.

Os círculos em preto e em branco representam a atividade β -glucosidase e a leitura a 280 nm de proteínas, respectivamente

As frações correspondentes do único pico contendo atividade de β -glucosidase foram reunidas, e após diálise foi mensurada sua atividade β -glucosidase e dosagem de proteína. A amostra apresentou 86,8 U_{total} e 87,6 $U\ mg^{-1}$ com um rendimento de 17,4% e um fator de purificação de 20,9 vezes.

Foi então, realizado uma análise por eletroforese em condições não desnaturantes (PAGE) com o pico resultante da eluição da Sephacryl S-200 (Figura 6).



Figura 6 – Eletroforese em condições não desnaturantes (PAGE)

A) Extrato Bruto; B) Coluna Sephacryl S-200.

A eletroforese mostrou mais de uma banda, mostrando que a amostra não estava pura, porém demonstrou considerável melhoria na resolução se comparado à eletroforese da coluna anterior (DMAE).

A eletroforese da amostra proveniente da coluna de exclusão por peso molecular Sephacryl S-200 mostrou que a amostra não estava pura, por este motivo a amostra e a coluna foram equilibradas com tampão Tris.HCl 10 mmol L⁻¹ em pH 8,0 contendo NaCl (2,0-0 mol L⁻¹), e aplicada em coluna de interação hidrofóbica Phenyl Sepharose (Figura 7).

Na coluna de interação hidrofóbica, o perfil cromatográfico mostrou a presença de três picos de atividade. As frações correspondentes aos picos foram dialisadas separadamente e tiveram sua atividade de β -glucosidase medida novamente. As frações do pico I obtiveram 84,9 U_{total}, e o pico II 7,1 U_{total} e o pico III 2,3 U_{total}, de atividade β -glucosidase.

Souza *et al.*, (2010), em seus experimentos purificaram uma β -glucosidase de *H. insolens*, e também utilizaram a precipitação com sulfato de amônio, seguida das colunas de troca iônica e exclusão de peso molecular, entretanto, não utilizaram a coluna de interação hidrofóbica. Neste caso obtiveram um maior rendimento de 44% e um fator de purificação de 21 vezes, valores bem menores quando comparado com a β -glucosidase apresentada neste trabalho. Daroit *et al.*, (2008) analisaram uma β -glucosidase de *Monascus purpúreos*, com rendimento final de 23% e fator de purificação de 92 vezes, entretanto, utilizaram precipitação com acetona, gel de filtração e de interação hidrofóbica.

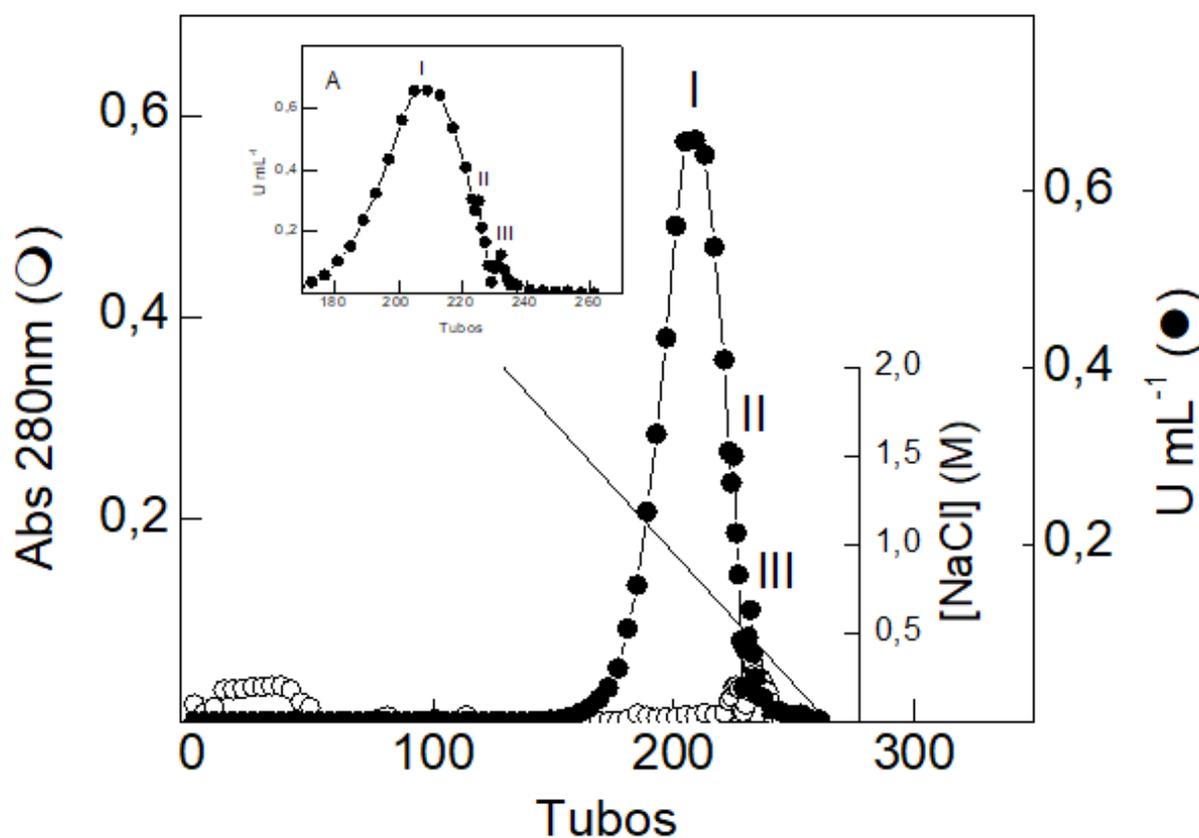


Figura 7 – Perfil cromatográfico da concentração de proteínas (○) e atividade enzimática (●) da β -glucosidases de *H. brevis*, após coluna Phenyl Sepharose.

Os círculos em preto e em branco representam a atividade β -glucosidase e a leitura a 280 nm de proteínas, respectivamente

Como o pico I proveniente da coluna de interação hidrofóbica apresentou uma maior atividade β -glucosidase, foi realizado eletroforese em condições desnaturantes. A eletroforese mostrou apenas uma banda da enzima, concluindo que a amostra estava purificada.

As amostras provenientes das etapas de purificação (precipitação em sulfato de amônio seguidos dos métodos cromatográficos) foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (Figura 8).

Como pode ser observado no gel SDS-PAGE, o número de bandas diminuiu consideravelmente durante as etapas de purificação. Em Phenyl-Sepharose, é possível observar apenas uma banda da enzima, uma vez que a amostra migrou como uma única banda proteica, demonstrando obter a massa molecular estimada de 125 kDa ao final de quatro etapas de purificação.

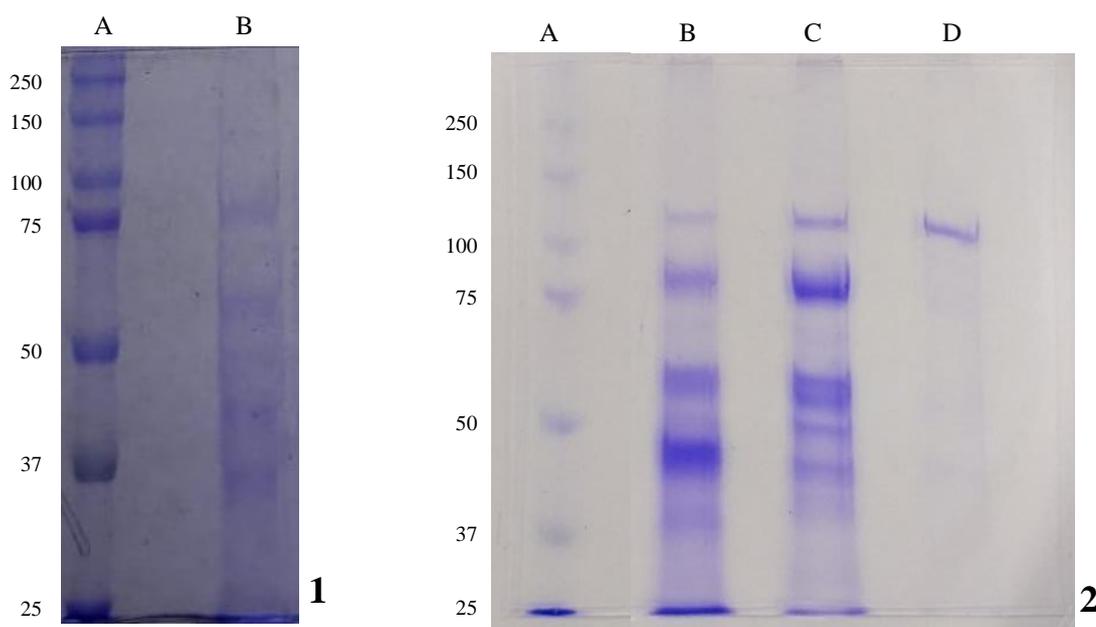


Figura 8 – Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

1) Marcador de peso molecular de 10 a 250 kDa (1A); Extrato Bruto (1B); Marcador de peso molecular de 10 a 250 kDa (2A); Coluna DMAE-Fractogel (2B); Coluna Sephacryl S200 (2C); Coluna Phenyl-Sepharose (2D).

Uma banda principal com massa molecular de 125 KDa foi obtido por SDS-PAGE (Figura 9).

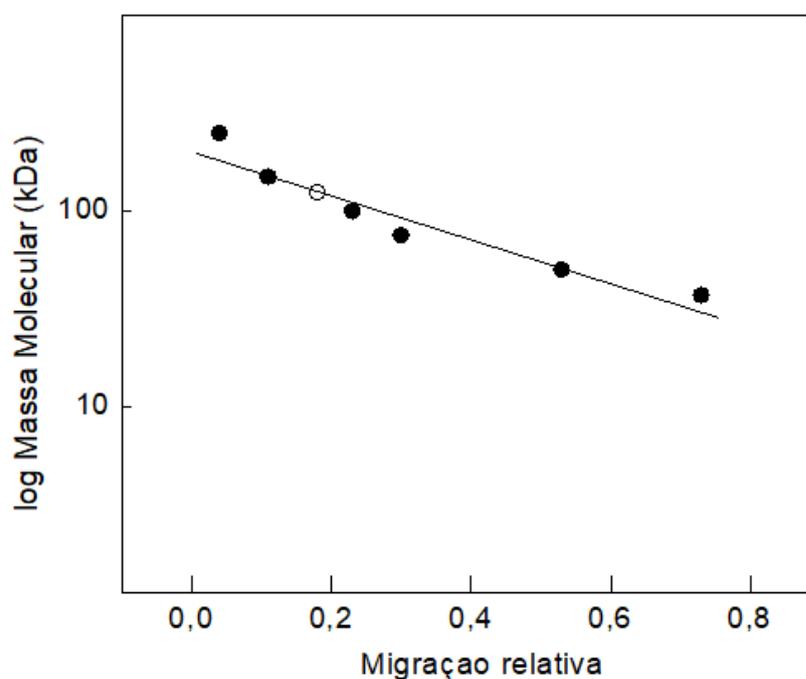


Figura 9 – Determinação da massa molecular da proteína.

Os círculos marcados em preto e o em branco representam o padrão de massa molecular e a β -glucosidase purificada, respectivamente

As características moleculares de β -glucosidases são variáveis, com massas de 45 a 250 kDa (MASHESHWARI; BHARADWAJ; BHAT, 2000). A massa molecular da proteína de *H. brevis* tem aproximadamente (125 kDa), resultado similar foi obtido com dois fungos termófilos, como *Humicola lanuginosa* que possui (110kDa) (ANAND; VITHAYATHIL, 1989), *Talaromuces emersonii* (135 kDa) (COUGHLAN; MCHALE, 1988), *H. insolens* com (94 kDa) (MASHESHWARI; BHARADWAJ; BHAT, 2000; BHATIA; MISHRA; BISARIA, 2002). Parry *et al.*, (2001) relataram que a β -glucosidase purificada do fungo *Thermoascus aurantiacus* apresentou-se como um homotrímero, com massa molecular de 120 kDa em cada subunidade.

A amostra foi submetida a eletroforese para o teste de zimograma em condições desnaturantes (SDS-PAGE). Em seguida, a β -glucosidase foi renaturada e mostrou uma única banda de atividade coincidente com a banda revelada com Comassie R (Figura 10).

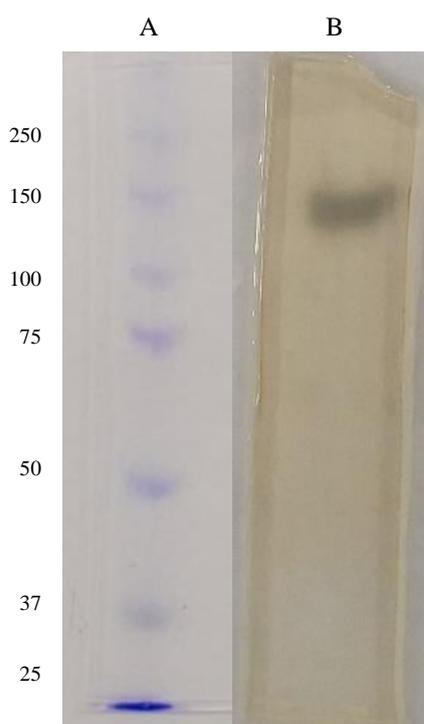


Figura 10 – Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e zimograma da β -glucosidase purificada.

A) Marcador de peso molecular de 10 a 250 kDa; B) Zimograma.

No teste de influência ao pH foi encontrado que o pH ótimo de atividade obtido após a purificação foi de 5,0, apresentando $13,05 \pm 1,34 \text{ U mg}^{-1}$. O mesmo valor de pH ótimo foi observado para seu extrato bruto (MASUI *et al.*, 2012) e para β -glucosidase do fungo termofílico *Myceliophthora heterothallica* (SILVA *et al.*, 2016). Valores ótimos de pH entre

4,5 e 6,0 foram observados para β -glucosidase de *Aspergillus versicolor* (OLIVEIRA; NUNES-SILVA; SANTA-ROSA, 2018). A enzima apresentou aumento de atividade a partir do pH 4,0 e perdeu até 50% da atividade a partir do pH 6,5 (Figura 11).

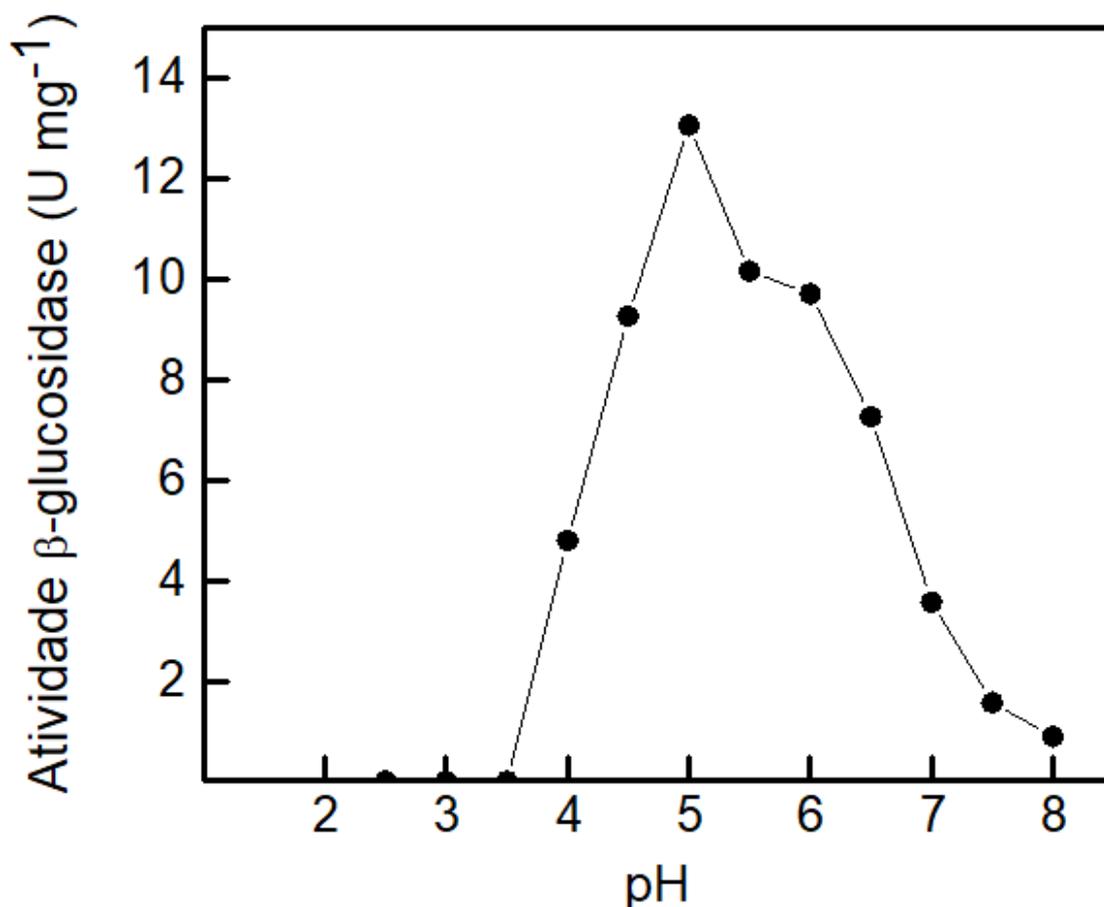


Figura 11 – Efeito do pH na atividade β -glucosidase de *H. brevis* purificada. Atividade enzimática avaliada em intervalos de pH variando de 2,5 a 8,0.

A estabilidade ao pH foi avaliada após incubação por um período de 24 h, onde a enzima purificada se mostrou praticamente estável a um pH de 2,5 a 8,0, apresentando queda de 20,3% ($10,4 \pm 0,35\ U\ mg^{-1}$) em relação a atividade controle de $13,05 \pm 1,34\ U\ mg^{-1}$ (Figura 12). Para β -glucosidase de *H. insolens* (SOUZA *et al.*, 2010) encontrou estabilidade ao pH entre 5,5 a 8,0. Os valores relatados para pH ótimo de β -glucosidase de fungos são variáveis, porém a maioria se enquadram na faixa de pH entre 4,0 e 5,0 (SORENSEN *et al.*, 2013).

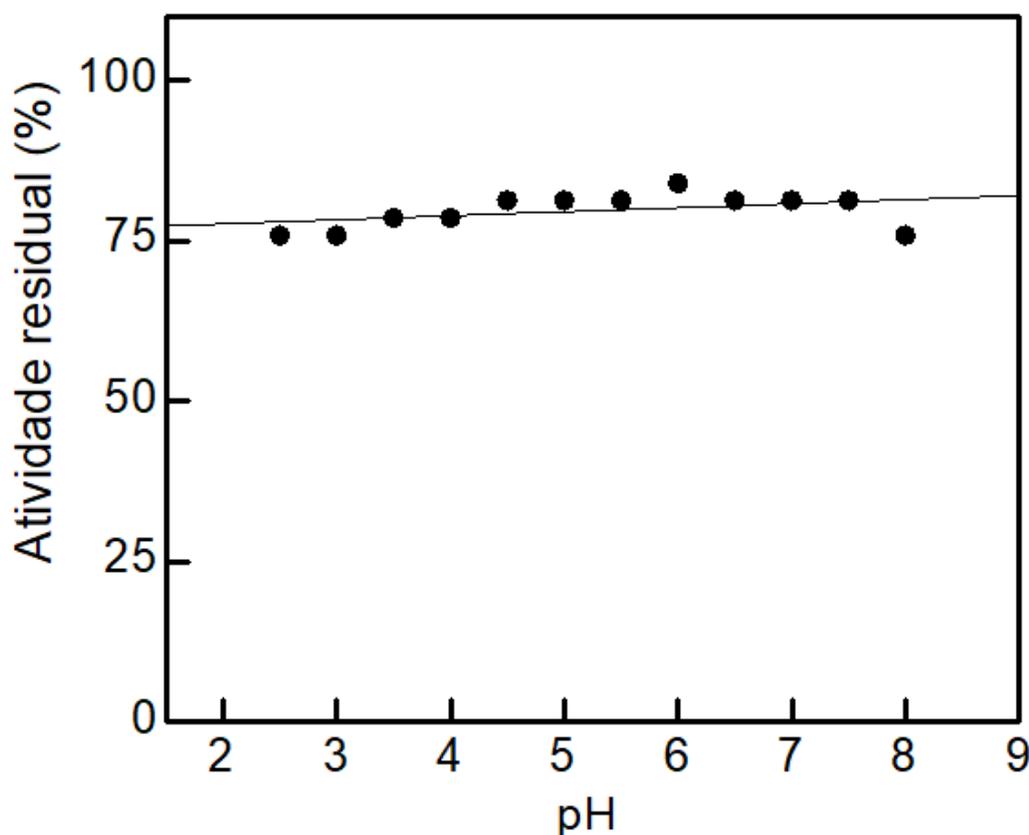


Figura 12 – Efeito da estabilidade ao pH na atividade β -glucosidase de *H. brevis* purificada. Atividade enzimática avaliada em intervalos de pH variando de 2,5 a 8,0, durante um período de 24 h.

Em relação à temperatura, a enzima purificada apresentou um aumento gradativo na atividade β -glucosidase a partir de 40 °C, obtendo a temperatura ótima a 60°C com $12,55 \pm 0,58$ U mg⁻¹. A temperatura de 65 °C, a enzima apresentou atividade de 12,14 U mg⁻¹, mostrando uma queda de atividade de 22% a 70 °C (Figura 13), resultado semelhante encontrado para o extrato bruto, onde a atividade da β -glucosidase aumentou cerca de quatro vezes com o aumento da temperatura de 40°C para 65°C, diminuindo abruptamente para 50% da atividade máxima a 70 °C (MASUI *et al.*, 2012). Para β -glucosidase do fungo termofílico *M. heterothallica*, Silva *et al.* (2016), encontrou temperatura ótima semelhante, a 65 °C. Iembo *et al.* (2002) também detectou essa mesma temperatura para o fungo termofílico *Aureobasidium* sp.

Nos testes de termoestabilidade (Figura 14), a enzima β -glucosidase de *H. brevis* purificada apresentou perda de atividade gradativa nos primeiros tempos de incubação, em relação ao controle ($13,05 \pm 1,34$ U mg⁻¹). Na temperatura de 55 °C, a enzima apresentou tempo de meia-vida a aproximadamente 90 minutos (1,5 h) praticamente estável a partir de

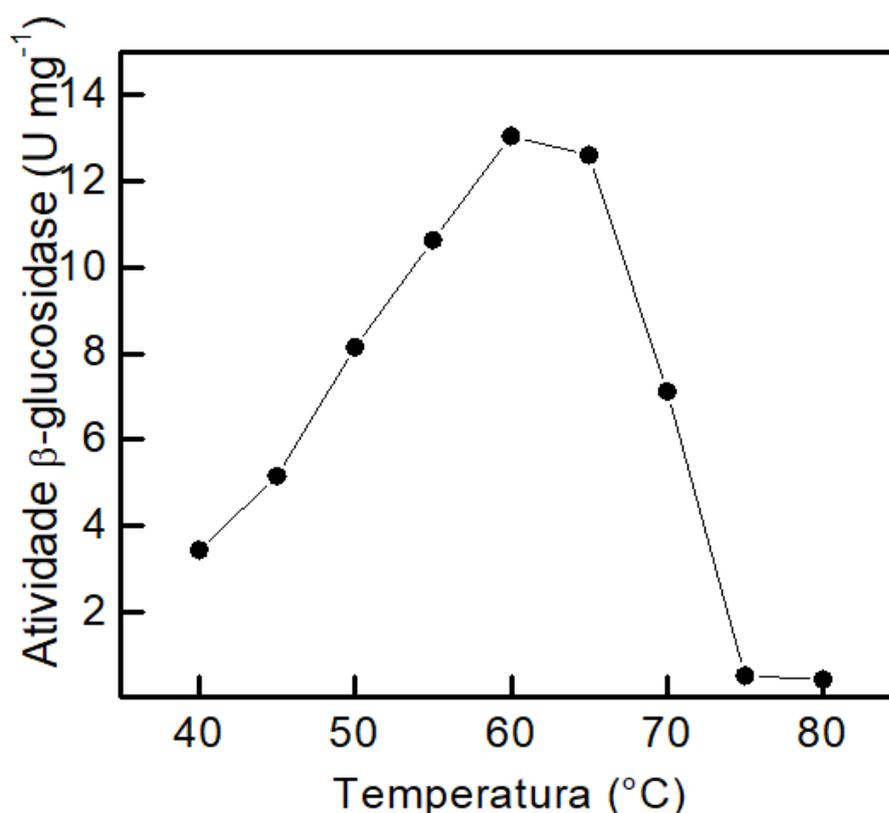


Figura 13 – Efeito da temperatura na atividade β-glicosidase de *H. brevis* purificada. Atividade enzimática avaliada em temperaturas entre 40 e 80°C, durante um período de 10 minutos.

até 480 minutos (8 h). Na temperatura de 60 °C, a enzima purificada apresentou tempo de meia-vida de 173 minutos (aproximadamente 2,9h), com perda de aproximadamente 70 % após 8h de incubação. Oliveira *et al.*, (2018) mostrou que para β-glicosidase de *A. versicolor*, na temperatura de 60 °C, após 60 minutos a enzima manteve a 68 % sua atividade com tempo de meia-vida de 120 minutos. Já na temperatura de 65 °C, β-glicosidase de *H. brevis* purificada foi instável a essa temperatura e apresentou uma queda abrupta da atividade nos primeiros 10 minutos (5,36 U mg⁻¹), perdendo totalmente sua atividade da enzima a partir dos 20 minutos. Esse resultado difere daquele observado para enzima em seu estado bruto (MASUI *et al.*, 2012), na qual a enzima manteve de 80 a 95% de sua atividade a temperatura de 55 °C após 26h, e apresentou tempo de meia-vida de 15,7 e 5,1 h nas temperaturas de 60 e 65° C, respectivamente. A perda de estabilidade da enzima β-glicosidase em temperaturas mais altas também foi reportado para o fungo termofílico *M. heterothallica* que foi estável a temperatura 60 °C, porém perdendo totalmente a atividade da enzima em 70°C (SILVA *et al.*, 2016).

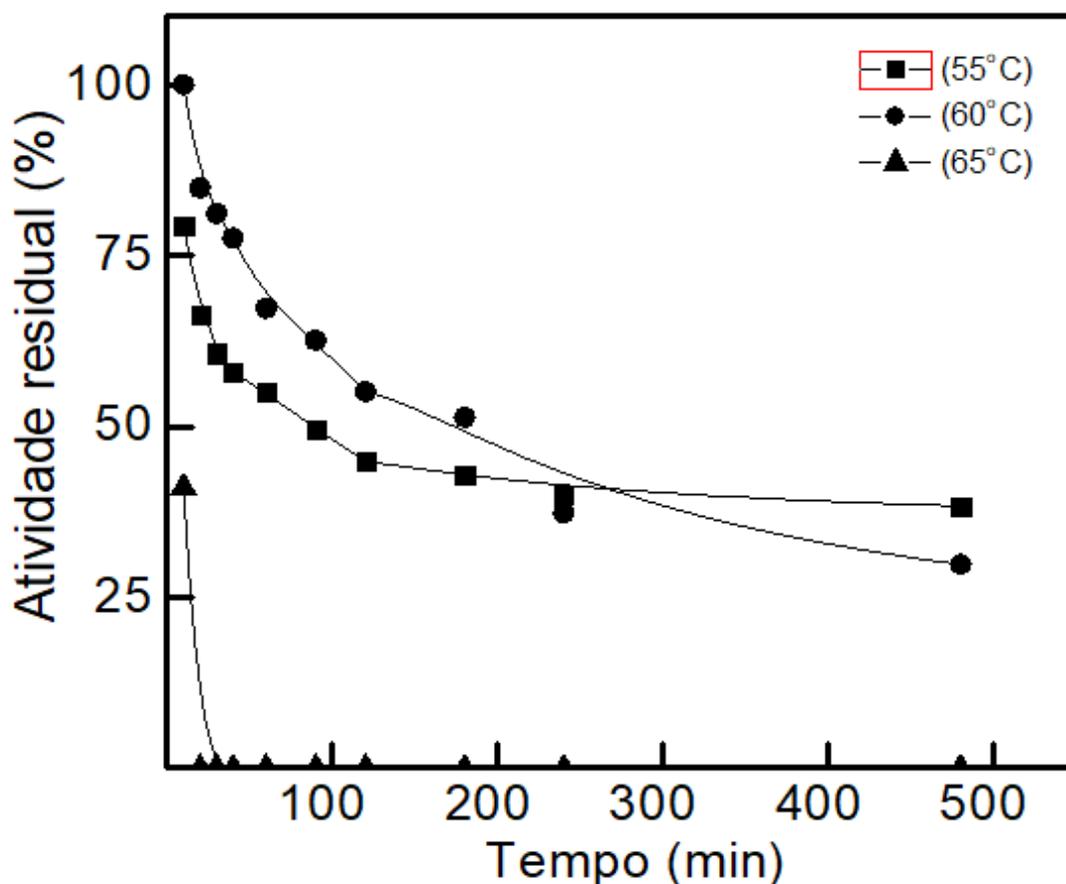


Figura 14 – Efeito da estabilidade térmica na atividade β-glucosidase de *H. brevis* purificada. A enzima foi incubada nas temperaturas de 55°C (■), 60°C (●) e 65°C (▲) durante um período de 10 a 480 minutos (8h). Alíquotas foram retiradas nos tempos indicados para a dosagem de atividade enzimática.

Cerca de 40 % das enzimas possuem metais como parte da sua estrutura (GUENGERICH, 2016), neste sentido, a interação desses metais com resíduos de aminoácidos presente no seu sítio ativo das enzimas podem aumentar ou diminuir a atividade catalítica.

A maioria dos íons metálicos, em concentração de 1,0 mmol L⁻¹, estimularam a atividade da enzima (Tabela 2). O HgCl₂, NaCl e AgNO₃, apresentaram redução de aproximadamente 60% da atividade enzimática na concentração de 1,0 mmol L⁻¹. O HgCl₂ e o AgNO₃ inibiram completamente a atividade enzimática na concentração de 10 mmol L⁻¹. O efeito inibitório observado com a adição de HgCl₂ é geralmente observado em outras β-glucosidasas (YAZDI *et al.*, 2003; ZANOELO *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2005; PERALTA *et al.*, 1997).

O CuSO_4 inibiu a atividade enzimática em 51,2% a $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e estimulou em 355,8% a 10 mmol L^{-1} sobre a atividade da β -glucosidase de *H. brevis* purificada. Em uma β -glucosidase de *A. versicolor* esse íon inibiu completamente a atividade (OLIVEIRA; NUNES-SILVA; SANTA-ROSA, 2018), em *Neurospora crassa* este íon teve efeito contrário, ativando a atividade enzimática em até 113% (YAZDI *et al.*, 2003). Neste sentido, é possível concluir que os íons metais atuam diferentemente sobre cada enzima, podendo ativar ou inibir a atividade enzimática (DAIROT, 2007).

Tabela 2 - Efeito de íons na atividade da β -glucosidase de *H. brevis* purificada.

| | Atividade β -glucosidase (%) | |
|-----------------|------------------------------------|--------------------------|
| | $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ | 10 mmol L^{-1} |
| Controle | 100,0 | 100,0 |
| CoCl_2 | $138,4 \pm 4,66$ | $155,8 \pm 2,68$ |
| CuSO_4 | $51,2 \pm 5,79$ | $355,8 \pm 3,81$ |
| HgCl_2 | $63,5 \pm 1,55$ | 0 |
| SrCl_2 | $121,9 \pm 1,41$ | $130,1 \pm 1,27$ |
| MgSO_4 | $139,4 \pm 2,54$ | $143,5 \pm 2,40$ |
| CaCl_2 | $132,2 \pm 1,41$ | $137,3 \pm 0,56$ |
| LiCl | $115,8 \pm 2,68$ | $126,1 \pm 1,13$ |
| KCl | $112,7 \pm 1,27$ | $104,5 \pm 1,69$ |
| MnCl_2 | $129,1 \pm 0,98$ | $148,6 \pm 1,69$ |
| NaCl | $72,7 \pm 1,27$ | $120,0 \pm 0,84$ |
| AgNO_3 | $62,5 \pm 2,54$ | 0 |

Controle: sem adição de íons com atividade de 100% correspondente a $13,05 \pm 1,34 \text{ U mg}^{-1}$

O agente redutor Temed provocou estimulação de 155,8% em relação ao controle, na concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e inibiu a atividade em 5,0% a 10 mmol L^{-1} (Tabela 3). Já o mercaptoetanol e o ácido ascórbico nas concentrações de $1,0$ e 10 mmol L^{-1} , provocaram estimulação na atividade da β -glucosidase purificada. Resultados semelhantes foram observados com os quelantes EGTA e EDTA, resultando na estimulação enzimática em ambas concentrações, sugerindo que β -glucosidase de *H. brevis* não é uma metaloenzima, resultados também encontrados para enzimas de *H. insolens* (SOUZA *et al.*, 2010) e *Scytalidium thermophilum* (ZANOELO *et al.*, 2004). Para os detergentes, ocorreu inibição da atividade β -glucosidase. Com os solventes, nas concentrações de 1 e 10%, foi observado inibição na atividade da enzima β -glucosidase.

Tabela 3 - Efeito de substâncias na atividade da β -glucosidase de *H. brevis* purificada.

| Agentes redutores | Atividade β -glucosidase (%) | |
|-------------------|------------------------------------|-------------------------|
| | 1 mmol L ⁻¹ | 10 mmol L ⁻¹ |
| Controle | 100,0 | 100,0 |
| Mercaptoetanol | 145,5 \pm 1,69 | 172,2 \pm 1,55 |
| Temed | 155,8 \pm 2,40 | 5,0 \pm 0,84 |
| Ácido Ascórbico | 120,0 \pm 0,70 | 145,5 \pm 1,69 |
| Quelantes | Atividade β -glucosidase (%) | |
| | 1 mmol L ⁻¹ | 10 mmol L ⁻¹ |
| EDTA | 115,8 \pm 1,97 | 126,1 \pm 0,56 |
| EGTA | 112,7 \pm 2,12 | 118,9 \pm 2,54 |
| Detergentes | Atividade β -glucosidase (%) | |
| | 0,5% | 1% |
| SDS | 0 | 0 |
| Tween 80 | 0 | 0 |
| Solventes | Atividade β -glucosidase (%) | |
| | 1% | 10% |
| Metanol | 1,9 \pm 0,70 | 0 |
| Acetona | 12,2 \pm 0,84 | 0 |
| Acetonitrila | 10,1 \pm 0,28 | 0 |

Controle: sem adição de íons com atividade de 100% correspondente a 13,05 \pm 1,34 U mg⁻¹

6 - CONCLUSÃO

A enzima β -glucosidase produzida pelo fungo termófilo *Humicola brevis* var. *thermoidea* apresentou um bom fator de purificação, porém um rendimento baixo. Entretanto, a β -glucosidase de *H. brevis* possui muitas características desejáveis, como o fato de suportar altas temperaturas e crescer em meios de cultura baratos. Desta forma, é clara a importância prática e acadêmica dos resultados pretendidos. Os resultados podem contribuir para melhorar o conhecimento das propriedades de uma enzima com grande potencial de aplicação biotecnológica para o emprego industrial.

7 - PERSPECTIVAS FUTURAS

Acreditamos que as características das enzimas β -glucosidase de *H. brevis* são interessantes tanto do ponto de vista acadêmico como de aplicação, e justificam a pesquisa atual, bem como, pesquisas futuras, visando à formulação de coquetéis enzimáticos eficientes para a sacarificação de materiais lignocelulósicos.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. Fungos de Interesse: Aplicações Biotecnológicas. Universidade Estadual de Maringá – UEM. **Revista UNINGÁ Review** – 21, 55-59, 2015.

ADEBAYO, E. A.; MARTÍNEZ-CARRERA, D. Oyster mushrooms (*Pleurotus*) are useful for utilizing lignocellulosic biomass. **Afr. J. Biotechnol.**, 14, 52-67, 2015.

ANAND, L.; VITHAYATHIL, P. J. Purification and properties of b-glucosidase from a thermophilic fungus *Humicola lanuginosa* (Griffon and Maublanc) Bunce. **J. Ferment. Bioeng.**, 67, 380–386, 1989.

ARNOLD, F. H. The Race for New Biofuels. **Eng. Sci.**, 2, 12. 2008.

ASGHER, M.; SHAHID, M.; KAMAL, S.; IQBAL, H. M. N. Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. **J. Mol. Cat. B: Enzym.**, 101:56-66, 2014.

BAJPAI, P. Microbial xylonolytic enzyme system: properties and application. **Adv. Appl. Microbiol.** 43, 141-194, 1997.

BÉGUIN, P.; AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiol. Rev.** 13:25-58, 1994.

BENASSI, V. M.; LUCAS, R.C.; JORGE, J.Á.; POLIZELI, M. L. T. M. Screening of thermotolerant and thermophilic fungi aiming -xylosidase and arabinanase production. **Braz. J. Microbiol.**, 45, 1459-1467, 2014.

BHATIA, Y.; MISHRA S.; BISARIA V. S. Microbial β -glucosidase: Cloning, properties and applications. **Crit. Rev. Biotechnol.**, 22, 375-407, 2002.

BIELY, P.; VRSANSKÁ, M.; CLAEYSSSENS, M. The endo-1,4-beta-glucanase I from *Trichoderma reesei*. Action on beta 1,4-oligomers and polymers derived from D-glucose and D-xylose. **Eur. J. Biochem.** 200, 1, 157-63, 1991.

BHAT, M.K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial application. **Biotechnol. Adv.** 15, 583-620, 1997.

BHIRI, F.; CHAABOUNI, S. E.; LIMAM, F.; GHRIR, R.; MARZOUKI, N. Purification and Biochemical Characterization of Extracellular β -Glucosidases from the Hypercellulolytic Pol6 Mutant of *Penicillium occitanis*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 149, 169–182, 2008.

BINOD, P.; GNANSOUNOU, E.; SINDHU, R.; PANDEY, A. Enzymes for second generation biofuels: Recent developments and future perspectives. **Bioresour. Technol.**, 5, 317–325, 2019.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, 8, 93-99, 1987.

BOYCE, A., WALSH, G. Purification and Characterisation of a thermostable β -xylosidase from *Aspergillus niger* van Tieghem of potential application in lignocellulosic bioethanol production. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 186, 712–730, 2018.

BOURDICHON, F.; CASAREGOLA, S.; FARROKH, C.; FRISVAD, J. C.; GERDS, M. L.; HAMMES, W. P.; HARNETT, J.; HUYS, G.; LAULUND, S.; OUWEHAND, A.; POWELL, I. B.; PRAJAPATI, J. B.; SETO, Y.; SCHURE, E. T.; BOVEN, A. V.; VANKERCKHOVEN, V.; ZGODA, A.; TUIJTELAARS, S.; HANSEN, E. B. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. **Int. J. Food Microbiol.**, 154, 87, 2012.

BRETHAUER, S.; STUDER, M. H. Biochemical conversion process of lignocellulosic biomass to fuel and chemicals—A review. **Chimia**, 69, 572–581, 2015.

BRUINS, M. E.; JANSSEN, A. E. M.; BOOM, R. M.; Thermozyms and their applications, **Appl. Biochem. Biotechnol.** 90, 155–181, 2001.

CASTRO, M. A.; PEREIRA Jr. N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Quím. Nova**, 33, 181-188, 2010.

CHAMBERGO, F. S.; VALENCIA, E. Y. Fungal biodiversity to biotechnology. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 100, 2567-2577. 2016.

CHAPMAN, J; ISMAIL, A. E.; DINU C. Z. Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks. **Catalysts**, 8, 238, 2018.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xilanases, famílias xilanase e xilanases extremofílicas. **FEMS Microbiol. Rev.**, 29, 3-23, 2005.

COONEY, D. G.; EMERSON, R. Thermophilic fungi. An account of their biology, activities and classification. W. H. Freeman & Co., San Francisco, EUA. 1964.

CORRÊA, R. C. G. et al. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, 41, 1467-1478, 2014.

COUGHLAN, M. P.; A. MCHALE. Purification of b-D-glucoside glucohydrolases of *Talaromyces emersonii*. **Methods Enzymol.** 160, 437-443, 1988.

DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **J. Antibiot.**, 62, 5, 2009.

DAROIT, D. J. Caracterização de uma Beta-glicosidase de *Monascus purpureus*. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2007.

DAROIT, D. J.; SIMONETTI, A.; HERTZ, P. F.; BRANDELLI, A. Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from *Monascus purpureus*. **J. Microbiol. Biotechnol.**, 18 933-941, 2008.

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues ; Opportunities & Perspectives. **Int. J. Biol. Sci.**, v. 5, n. 6, p. 578-595, 2009.

DAVIS, B.J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 121, 404-427, 1964.

DELGADO, S.; GUADAMURO, L.; FLÓREZ, A. B.; VÁZQUEZ, L.; MAYO, B. Fermentation of commercial soy beverages with lactobacilli and bifidobacteria strains featuring high B-glucosidase activity. **Innov. Food Sci. Emerg. Technol.**, 51, 148-155, 2019.

ENOKI, A.; ITAJURA, S. & TANAKA, H. The involvement of extracellular substance for reducing molecular oxygen to hydroxyl radical and ferric iron to ferrous iron in wood degradation by wood decay fungi. **J. Biotechnol.**, 265, 53-57, 1997.

FAN, G.; XU, Y.; ZHANG, X.; LEI, S.; YANG, S.; PAN, S. Characteristics of immobilised b-

glucosidase and its effect on bound volatile compounds in orange juice. **Int. J. Food Sci. Technol.**, 46, 2312–2320, 2011.

GOMES K. S.; ALFENAS, G. P. M.; ANDRADE L. G. A.; FALKOSKI D. L.; GUIMARÃES V. M.; ALFENAS A. C.; REZENDE S. T. Purification and characterization of xylanases from the fungus *Chrysosporthe cubensis* for production of xylooligosaccharides and fermentable sugars. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 182, 818–830.

GOYAL, A.; GHOSH, B. & EVELEIGH, D. Characteristics of fungal cellulases. **Bioresour. Technol.** 36, 37-50, 1991.

GUENGERICH, F. P. Metals in Biology: Molecular Basis of Selection of Metals by Enzymes. **J. Biol. Chem.**, 291, 20838-20839, 2016.

GUPTA, V. K. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Cellulase System Properties and Applications. Galway: Elsevier, 2016.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresour. Technol.**, 100, 1, 10-18, 2009.

IEMBO, T.; SILVA, R.; PAGNOCCA, F. C.; GOMES, E. Production, characterization and properties of β -glucosidase and β -xylosidase from a strain of *Aureobasidium sp.* **Prikladnaia Biokhim. Mikrobio.**, 38, 639–643, 2002.

JENKINS, J.; LEGGIO, LL.; HARRIS, G. & PICKERSGILL, R. β -Glucosidase, β -galactosidase, family A cellulases, family F xylanases and two barley glycanases form a superfamily of enzymes with a 8-fold α/β architecture and with two conserved glutamates near the carboxy-terminal ends of β -strands four and seven. **FEBS Lett.**, 362, 281-285, 1995.

KEERTI, G. A.; KUMAR, V.; DUBEY, A.; VERMA, A. K. Kinetic Characterization and effect of immobilized thermostable β -glucosidase in alginate gel beads on sugarcane juice. **ISRN Biochem.**, 1–8, 2014.

KUHAD, R. C. GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. **Enzym. Res.**, 2011

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Research review paper Microbial Alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnol. Adv.**, 17:561-594, 1999.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, 35, 377-391, 2008.

KUMAR, V.; DANGI, A. K.; SHUKLA, P. Engineering thermostable microbial xylanases toward its industrial applications. **Mol. Biotechnol.**, 60, 226–235., 2018.

KWON, K. S., LEE, J., KANG, H. G., HAH, Y. C. Detection of beta-glucosidase activity in polyacrylamide gels with esculin as substrate. **Appl. Environ. Microbiol.**, 60, 4584–4586, 1994.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227, 680-685. 1970.

LEITE, E. R. S. R.; GOMES, R. S. Characterization and comparison of thermostability of purified β -glucosidase from a mesophilic *Aureobasidium pullulans* and thermophilic *Thermoascus aurantiacus*, **Process Biochem.**, 42, 1101–1106, 2007.

LI, X. et al. Expression, purification and characterization of a recombinant β -glucosidase from *Volvarella volvacea*. **Biotechnol. Lett.**, 27, 1369-1373, 2005.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 64, 461–488.

MAMMA, D.; HATZINIKOLAOU, D. G.; CHRISTAKOPOULOS, P. Biochemical and catalytic properties of two intracellular β -glucosidase from the fungus *Penicillium decumbens* active on flavonoid glucosides. **J. Mol. Cat. B: Enzym.**, 27, 1836-190, 2004.

MASUI, D. C.; ZIMBARDI, A. L. R. L.; SOUZA, F. H. M.; GUMARÃES, L. H. S.; FURRIEL, R. P. M.; JORGE, J. A. High production of a xylose-stimulated β -glucosidase and a thermostable xylanase by the thermophilic fungus *Humicola brevis* var. *thermoidea* under solid state fermentation **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 28, 2689-2701, 2012.

MCATEE, C. P.; SEID, C. A.; HAMMOND, M.; HUDSPETH, E.; KEEGAN, B. P.; LIU, Z.; WEI, J.; ZHAN, B.; ARJONA-SABIDO, R.; CRUZ-CHAN, V.; DUMONTEIL, E.; HOTEZ, P. J.; BOTTAZZI, M. E. Expression, purification, immunogenicity and protective efficacy of a recombinant nucleoside hydrolase from *Leishmania donovani*, a vaccine candidate for preventing cutaneous leishmaniasis. **Protein Expres. Purif.**, 130, 129-136, 2016.

MCILVAINE, T. A buffer solution for colorimetric comparison. **J. Biol. Chem.**, 49, 1, 183-186, 1921.

MELEIRO LP, SALGADO JCS, MALDONADO RF, CARLI S, MORAES LAB, WARD RJ, et al. Engineering the GH1 β -glucosidase from *Humicola insolens*: Insights on the stimulation of activity by glucose and xylose. **PLoS ONE**, 12, e0188254, 2017.

MÓL, P. C. G.; VERISSIMO, L. A. A.; MINIM, L. A.; BOSCOLO, M.; GOMES, E.; SILVA, R. Production and capture of β -glucosidase from *Thermoascus aurantiacus* using a tailor made anionic cryogel. **Process Biochem.**, 82, 75–83, 2019.

MOLONEY, A. P.; MCCRAE, S. I.; WOOD, T. M.; COUGLAN, M. P.; Isolation and characterization of the 1,4- β -d-glucan glucanohydrolases of *Talaromyces emersonii*. **Biochem. J.**, 225, 365, 1985.

NARASIMHA, G.; SRIDEVI, A.; RAMANJANEYULU, G.; REDDY, B. R. Purification and Characterization of β -Glucosidase from *Aspergillus niger*. **Int. J. Food Properties**, 19, 652–661, 2016.

NASCIMENTO, CV.; SOUZA, FHM.; MASUI, DC.; LEONE, FA.; PERALTA, RM.; JORGE, JA.; FURRIEL, RPM. Purification and biochemical properties of a glucose-stimulated β -D-glucosidase produced by *Humicola grisea* var. *thermoidea* grown on sugarcane bagasse. **J. Microbiol.**, 48, 53-62, 2010.

NG, I. S.; TSAI, S. W.; JU, Y. M.; YU, S. M.; HO, T. H. Dynamic synergistic effect on *Trichoderma reesei* cellulases by novel β -glucosidases from Taiwanese fungi. **Bioresour. Technol.**, 102, 6073–81, 2011.

NGUYEN, N.; LEE, K.; KIM, I.; KIM, Y.; JEYA, M.; LEE, J. One-step purification and characterization of a β -1,4-glucosidase from a newly isolated strain of *Stereum hirsutum*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 87, 2107–2116, 2010.

NIGAM, D.; ASTHANA, M.; KUMAR, A. VIJAI, K.G., SUSANA, R. C. *Penicillium: A Fungus in the Wine and Beer Industries*. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*; Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 187–200, 2018.

ÖGEL, ZB.; YARANGÜMELI, K.; DÜNDAR, H. & IFRIJ, I. Submerged cultivation of *Scytalidium thermophilum* on complex lignocellulosic biomass for endoglucanase production. **Enzyme Microb. Technol.** 28, 689–695, 2001.

OLIVEIRA, J. B.; NUNES-SILVA, C. G.; SANTA-ROSA, P. S. Determinação das Características Físico-químicas da Atividade β -glucosidase presente no Complexo Enzimático de *Aspergillus versicolor*. **Scientia Amazonia**, S1, 94-103, 2018.

OLIVEIRA, L. G.; MANTOVANI, S. M. Transformações biológicas: contribuições e
PARRY, N. J.; BEEVER, D. E.; OWEN, E.; VANDENBERGHE, I.; VAN BEEUMEN, J.;
BHAT, M. K. Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable beta-
glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus*. **Biosci. J.**, 353, 117-127, 2001.

PERALTA, R. M.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A. β -Glycosidase activities of *Humicola*
grisea: biochemical and kinetic characterization of a multifunctional enzyme. **Biochim.**
Biophys. Acta, 1033, 243-249, 1990.

PERALTA, R. M.; KADOWAKI, M. K.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A. A highly
thermostable β -glucosidase activity from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var
thermoidea: purification and biochemical characterization. **FEMS Microbiol. Lett.**, 146,
291-295, 1997.

POLIZELLI, M.; RIZZATTI, A.; MONTI, R.; TERENCEZI, H.; JORGE, J. A.; AMORIM, D.
Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**,
67, 5, 577-591, 2005.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GATHE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and
biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 62, 597-635,
1998.

RAVEN, P.; EVERT, R.; EICHHORN, S. *Biologia Vegetal*: Rio de Janeiro: Guanabara
Koogan S.A. 7ª ed., 277-312, 2007.

READ, S. M.; NORTHCOTE, D. H. Minimization of variation in the response to different
protein of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. **Anal. Biochem.**, 116, 53-64,
1981.

REISFELD, R. A.; LEWIS, U. J.; WILLIAMS, D. E. Disk electrophoresis of basic proteins
and peptides on polyacrilamide gels. **Nature**, 195, 281-283, 1962.

SAHA, B. C. *Lignocellulose Biodegradation and Applications in Biotechnology*. ACS
Symposium Series 889. Edited by Saha, B.C.; Hatashi, K.. Washington, D.C.; **Amer. Chem.**
Society, 1, 2-34, 2004.

SALGADO, J. C. S.; MELEIRO, L. P.; CARLI, S.; WARD, R. J. Glucose tolerant and
glucose stimulated β -glucosidases – A review. **Bioresource Technol.**, 267, 704–713, 2018.
SATYAMURTHY, P.; JAIN, P.; BALASUBRAMANYA, R. H.; VIGNESHWARAN, N.
Preparation and characterization of cellulose nano whiskers from cotton fibres by controlled
microbial hydrolysis. **Carbohydr. Polym.**, 83, 122–129, 2011.

SERRA, C. M.; FUNCH, B.; FORSTER, J. The raise of *Brettanomyces* yeast species for beer production. **Curr. Opin. Biotechnol.**, 56, 30–35, 2019.

SILVA, V. C. T., COTO, A. L. S., SOUZA, R. C., NEVES, M. B. S., GOMES, E., RODRIGUEZ, G. O. B. Effect of pH, Temperature, and Chemicals on the Endoglucanases and β -Glucosidases from the Thermophilic Fungus *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4. Obtained by Solid-State and Submerged Cultivation, **Biochem. Res. Int.**, 1-9, 2016.

SINGH, G.; VERMA, A. K.; KUMAR, V. Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of b-glucosidases. **3 Biotech.**, 6, 2016.

SINGH, J.; BATRA, N.; SOBTI, R. C. A highly thermostable, alkaline CMCcase produced by a newly isolated *Bacillus* sp. VG1. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 17, 8, 761-765, 2001.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme Microb. Technol.**, 46, 541–549. 2010.

SINGHANIA, R. R.; KUMAR, A.; PANDEY, W. A. The industrial production of enzymes state of the art, in: E.J. VANDAMME (Ed.), *Industrial Biotechnology: Sustainable Growth and Economic Success*, Wiley-VCH, Weinheim, 207-223, 2010.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; RAJASREE, K. P.; MATHEW, A.; GOTTUMUKKALA, L.; PANDEY, A. Properties of a major β -glucosidase-BGL1 from *Aspergillus niger* NII-08121 expressed differentially in response to carbon sources. **Process Biochem.**, 46, 1521–1524, 2011.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SUKUMARAN, R. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A.; Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. **Bioresour. Technol.**, 127, 500–507, 2013.

SORENSEN, A.; LUBECK, M.; LUBECK, P. S.; AHRING, B. K. Fungal β -glucosidases: a bottleneck in industrial use of lignocellulosic materials, **Biomolecules**, 3, 612-631, 2013.

SOUZA, F. H.; NASCIMENTO, C. V.; ROSA, J. C.; MASUI, D. C.; LEONE, F. A.; JORGE, J. A.; FURRIEL, R. P. M. Purification and biochemical characterization of a mycelial glucose- and xylose-stimulated β -glucosidase from the thermophilic fungus *Humicola insolens*. **Process Biochem.**, 45, 272–278, 2010.

SRIVASTAVA, N.; RATHOUR R.; JHA, S.; PANDEY, K.; SRIVASTAVA, M.; THAKUR, V. K.; SENGAR, R. S.; GUPTA V. K.; MAZUMDER, BEHARI, P.; KHAN, A. F.; MISHRA, P. K. Microbial Beta Glucosidase Enzymes: Recent Advances in Biomass Conversation for Biofuels Application. **Biomolecules**, 9, 220, 2019.

SU, E.; XIA, T.; GAO, L.; DAI, Q.; ZHANG, Z. Immobilization of bglucosidase and its aroma-increasing effect on tea beverage. **Food Bioprod. Process.** 88, 83–89, 2010.

TEUGJAS, H.; VÄLJAMÄE, P. Selecting beta-glucosidase to support cellulases in cellulose saccharification. **Biotechnol. Biofuels**, 6, 105, 2013.

TIWARI, P.; MISRA, B. N.; SANGWAN, N. S. β -Glucosidases from the Fungus *Trichoderma*: An Efficient Cellulase Machinery in Biotechnological Applications. **Bio. Med.** 203735, 10, 2013.

VENTURI, L. L.; POLIZELI, M. L.; TERENZI, H. F.; FURRIEL, R. P. M.; JORGE, J. A. Extracellular β -glucosidase from *Chaetomium thermophilum* var *coprophilum*: production, purification and some biochemical. **J. Basic Microbiol.**, 42, 55-66, 2002.

XIA, W.; BAI, Y.; CUI, Y.; XU, X.; QIAN, L.; SHI, P.; ZHANG, W.; LUO, H.; ZHAN, X.; YAO, B. Functional diversity of family 3 β -glucosidases from thermophilic cellulolytic fungus *Humicola insolens* Y1. **Nature**, 6, 27062, 2016.

WARREN, RAJ. Microbial hydrolysis of polysaccharides. **Annu Rev. Microbiol.** 50, 183-212, 1996.

WONG, KY. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiol Rev.** 52, 305-317, 1988.

YAZDI, M.T. et al. Purification and Characterization of two intracellular β -glucosidases from the *Neurospora crassa* mutant cell-1. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 19, 79-84, 2003.

ZANOELO, F. F.; POLIZELI, M. L. T. M.; TERENZI, H. F.; JORGE, J. A. β -glucosidase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose. **FEMS Microbiol. Lett.**, 240, 137-143. 2004.

ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, JR. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnol. Adv.** 24, 452-481, 2006.