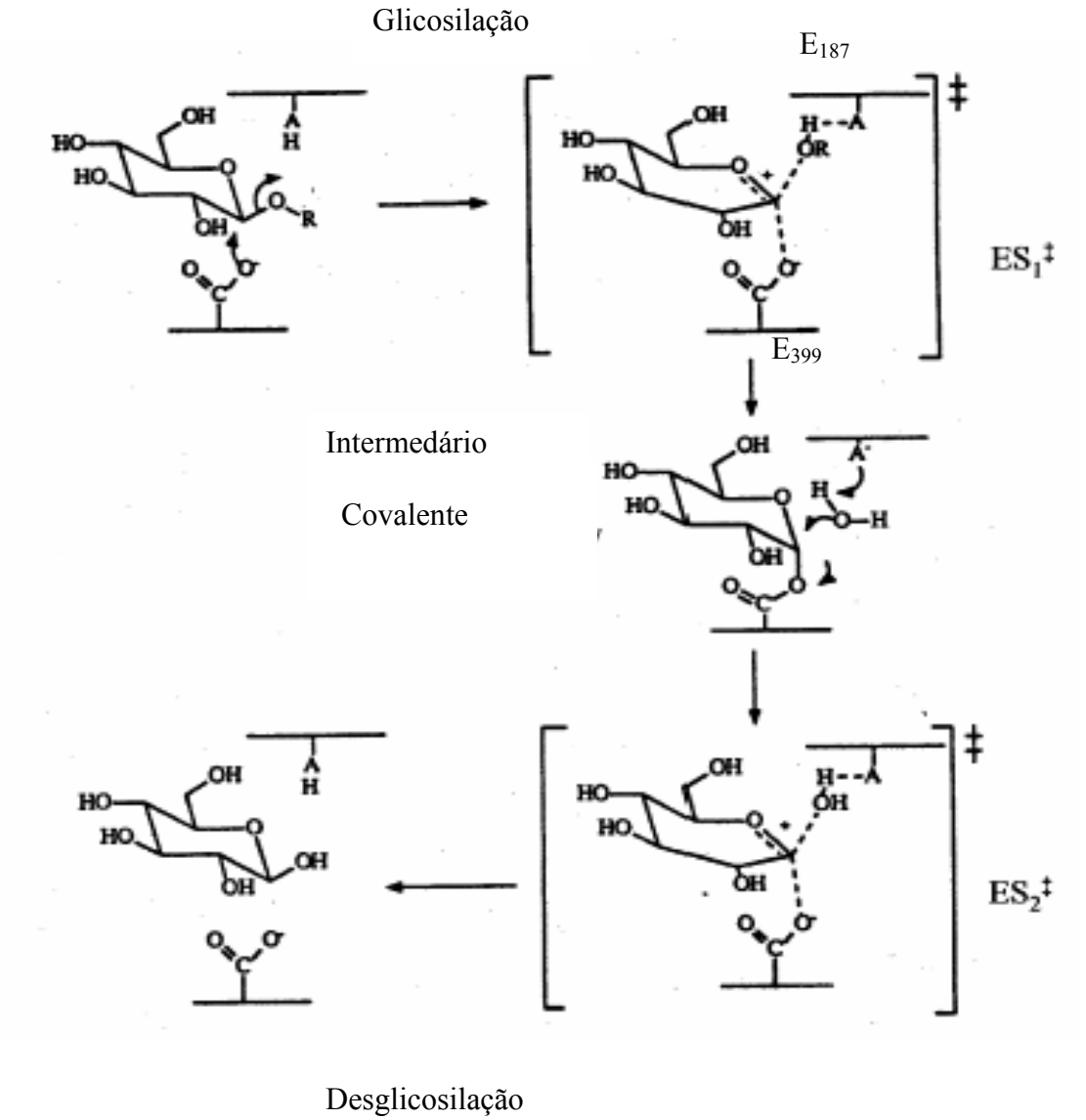

Figura 5: Esquema da reação de hidrólise de uma ligação glicosídica catalisada por uma β-glicosidases (Baseado em Kempton & Withers, 1992). Na Sfβgli50 o resíduo E_{187} atua como doador de prótons e o E_{399} como nucleófilo.

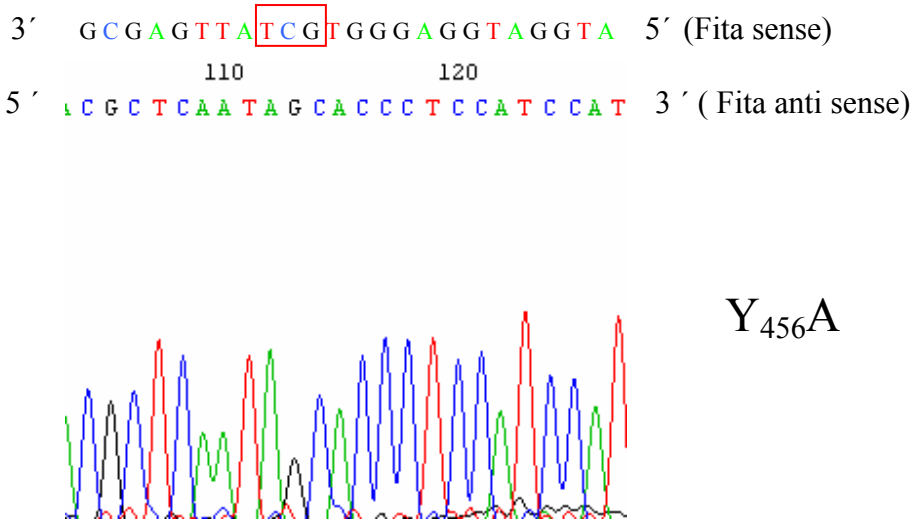

Figura 7: Eletroferograma da reação de sequenciamento do plasmídeo pT7-7 que codifica a Sfβgli50 mutante $Y_{456}A$. A caixa vermelha indica os nucleotídeos mutados.

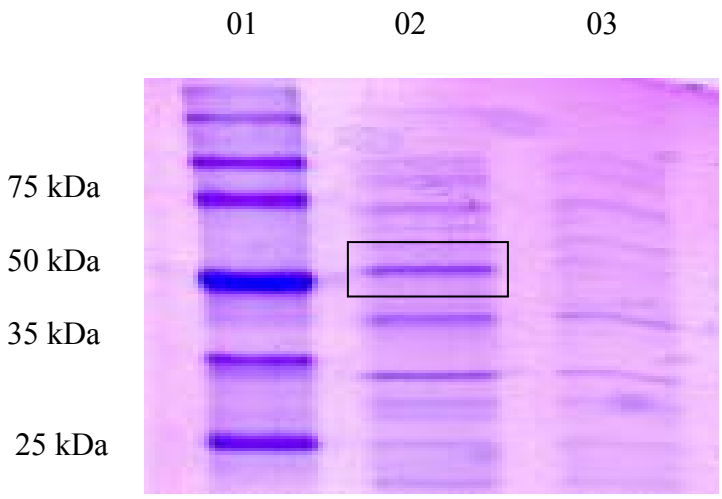

Figura 8: Análise em SDS – PAGE da expressão da Sfβgli50 mutante ($Y_{456}A$) com o plasmídeo pT7-7 em células BL21 DE3. A banda marcada pelo quadrado indica a proteína mutante induzida. A indução da expressão foi feita com IPTG 1,0 mM por 4 horas a 25ºC. Temos nas seguintes raias: 01 - padrão de peso molecular; 02 – bactérias induzidas; 03 – bactérias não induzidas. O gel continha poliacrilamida (10%) e foi corado com comassie blue R-250. Foram aplicados 20µL de amostra em cada raia.

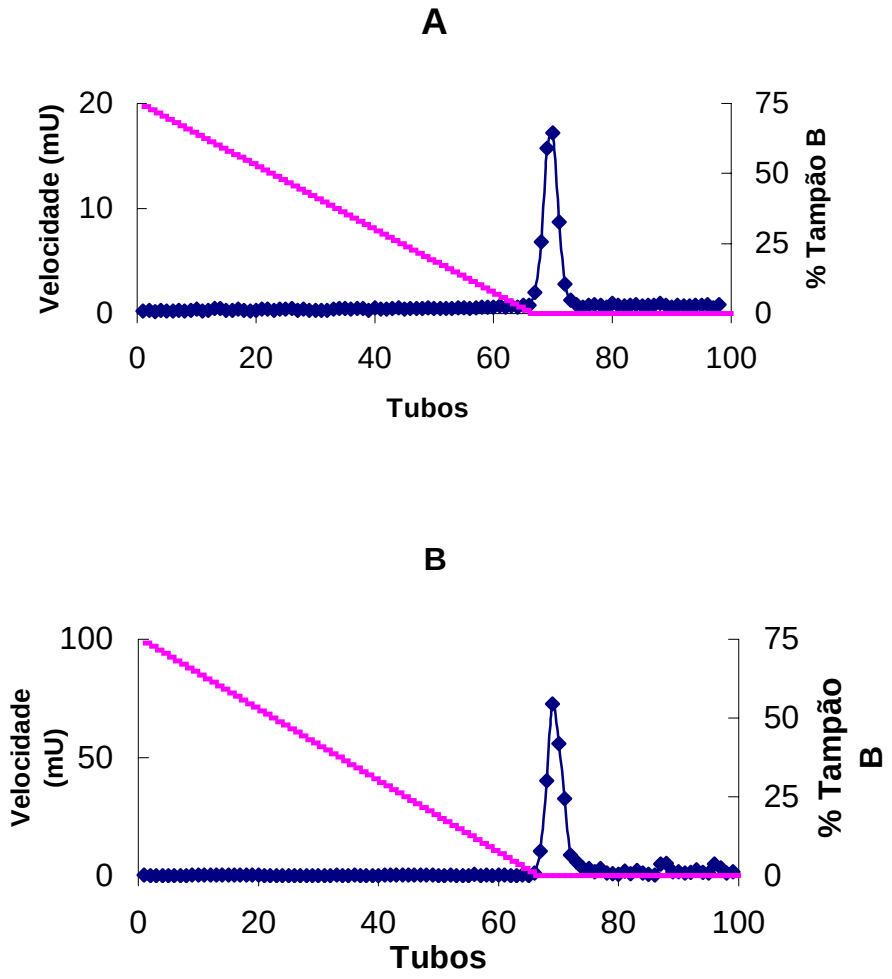

Figura 9 – Cromatografia hidrofóbica em coluna Phenyl Hi Prep do lisado de bactérias BL21 DE3 induzidas a produzirem Sfβgli50 recombinante. Gráfico (**A**) - bactéria transformada com pT7-7 codificando o mutante $Y_{456}A$; Gráfico (**B**) - bactérias transformadas com pT7-7 codificando a Sfβgli50 selvagem. A atividade β-glicosidásica foi detectada utilizando NPβglc 4,0 mM em tampão citrato-fosfato 100 mM pH 6,0. Nenhuma atividade atividade β-glicosidásica intrínseca da bactéria foi detectada nestas condições de ensaio. A linha rosa representa a gradiente de tampão B (fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 contendo $(NH_4)_2SO_4$ 1,7 M).

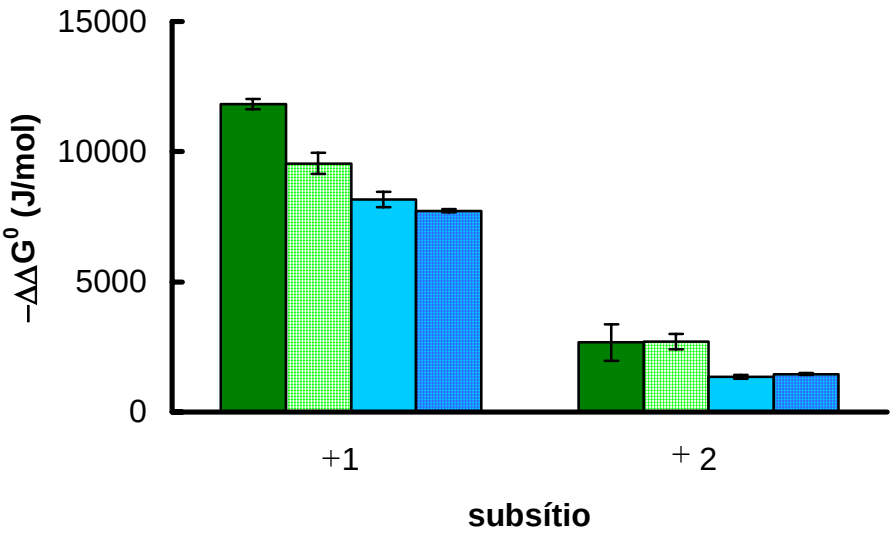

Figura 21: Energia de ligação de resíduos de glicose ou radicais alquil (butil) nos subsítios que interagem com o aglicone do substrato. As colunas em verde correspondem a energia de ligação de glicose na Sfβgli50 selvagem, enquanto que as colunas em verde hachuradas representam a energia de ligação de uma glicose no mutante $Y_{456}A$. As colunas em azul correspondem a energia de ligação de um grupo alquil na Sfβgli50 selvagem, enquanto que as colunas em azul hachuradas indicam a energia de ligação de um grupo alquil no mutante $Y_{456}A$.

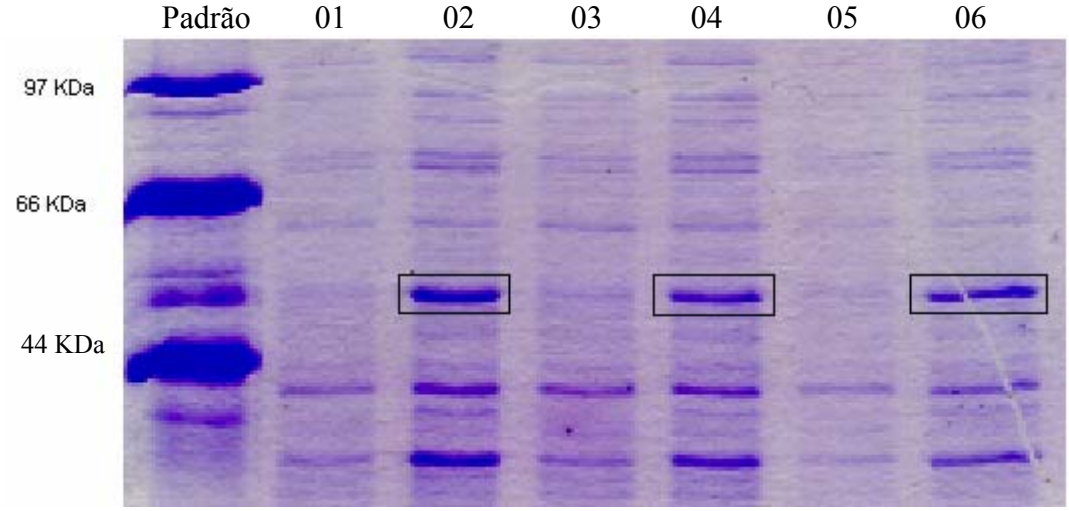

Figura 24**:** Análise em SDS – PAGE das expressão das β-glicosidases (Sfβgli50) mutantes com o plasmídeo pT7-7 em células BL21 DE3. As bandas marcadas pelos quadrados indicam as proteínas mutantes induzidas. A indução da expressão foi feita com IPTG 1.0 mM por 4.0 horas a 25ºC. Temos nas seguintes raias: padrão de peso molecular; 01 – $N_{329}A$ não induzido; 02 – $N_{329}A$ induzido; 03 – $N_{329}D$ não induzido; 04 – $N_{329}D$ induzido; 05 – $N_{329}Q$ não induzido; 06 – $N_{329}Q$ induzido. O gel era 10% em poliacrilamida e foi corado com comassie blue R-250. Foram aplicados 20μL de amostra em cada raia.

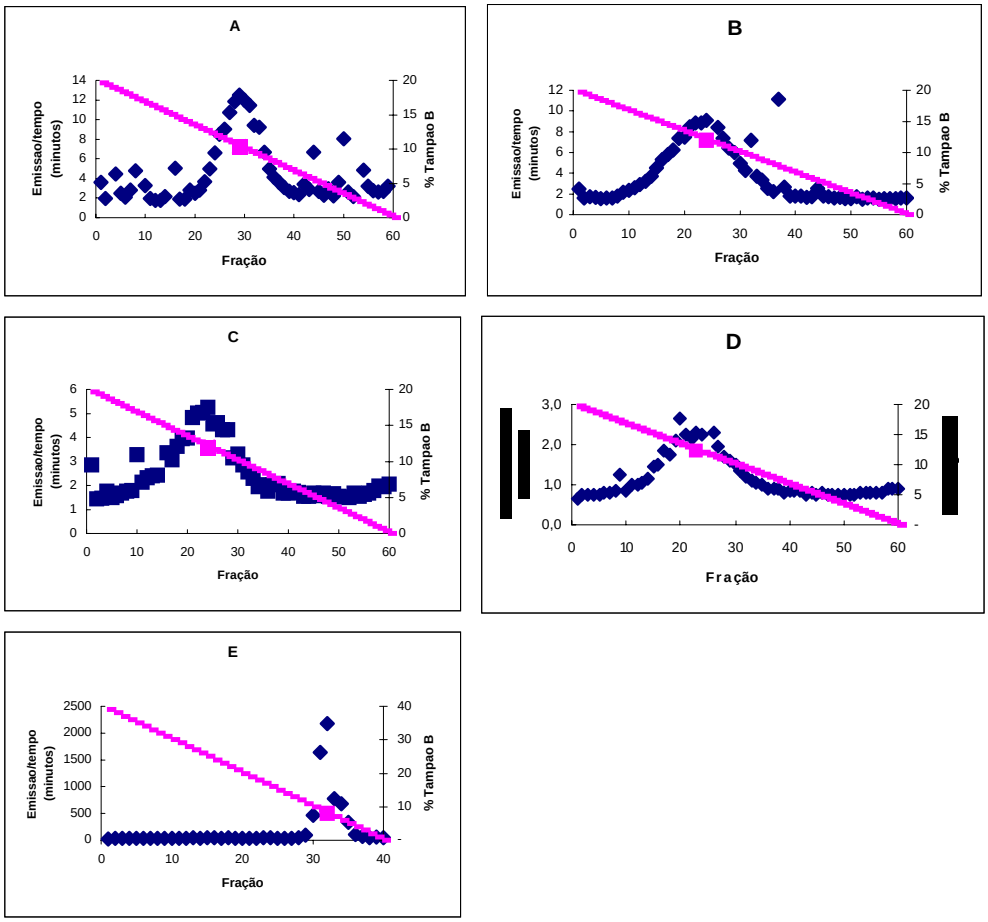

Figura 25 – Cromatografia hidrofóbica em coluna Phenyl Hi Trap do lisado de bactérias BL21 DE3. (**A**) - lisado das bactéria transformada com pT7-7 codificando o mutante $N_{329}A$; (**B**) - lisados das bactérias transformadas com pT7-7 codificando o mutante $N_{329}D$; (**C**) - lisado das bactérias transformadas com pT7-7 codificando o mutante $N_{329}Q$; (**D**) - lisado das bactérias transformadas com apenas o pT7-7; (**E**) - lisado das bactérias transformadas com pT7-7 codificando a Sfβgli50 selvagem. A atividade β-glicosidásica foi detectada utilizando MUβGlc 4,0 mM em tampão fosfato 100 mM pH 8,0. O quadrado rosa indica a porcentagem de tampão B necessária para eluição da atividade β-glicosidásica.

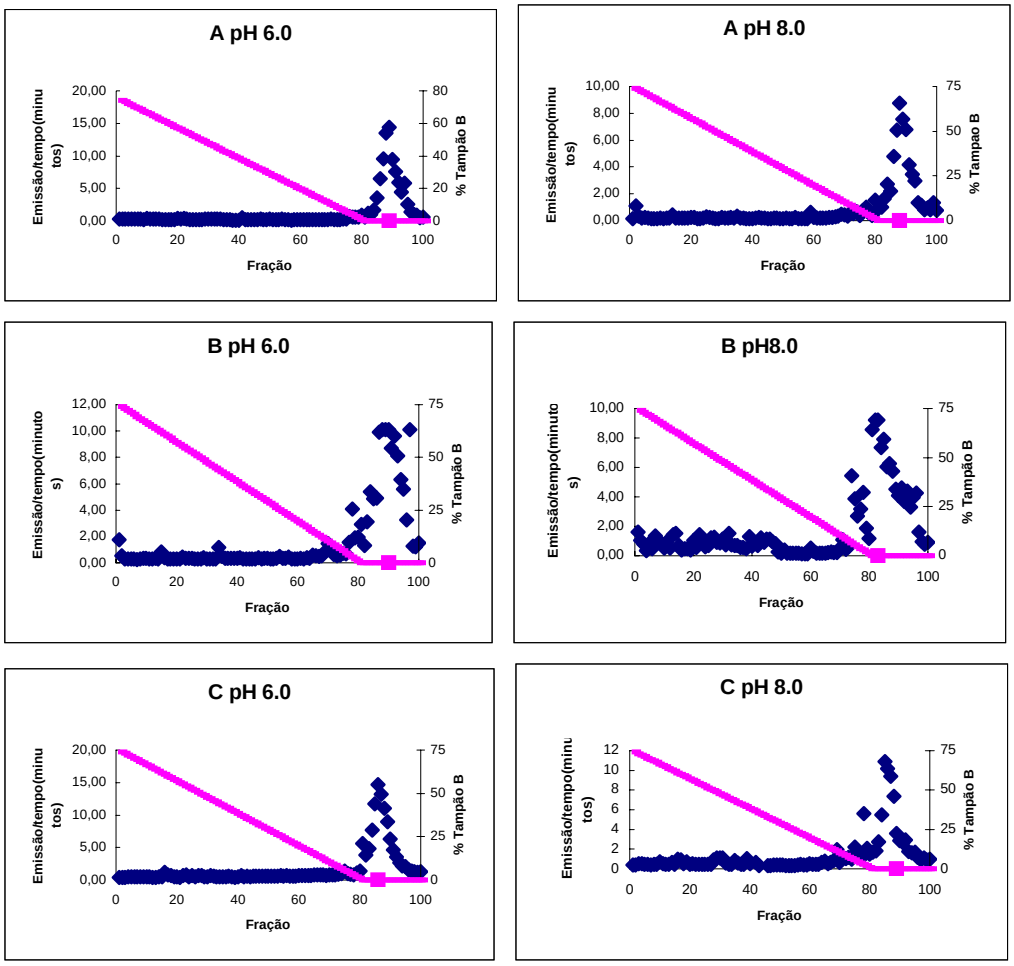

Figura 26 – Cromatografia hidrofóbica em coluna Phenyl Hi Prep do lisado de bactérias BL21 DE3. (**A**) - bactéria transformada com pT7-7 codificando o mutante $N_{329}A$; (**B**) - bactérias transformadas com pT7-7 codificando o mutante $N_{329}D$; (**C**) - bactérias transformadas com apenas o pT7-7. A atividade β-glicosidásica foi detectada utilizando MUβGlc 4,0 mM em tampão fosfato 100 mM pH 8,0 e em tampão citrato fosfato 100 mM pH 6,0. O quadrado rosa indica a posição de eluição da atividade β-glicosidásica.

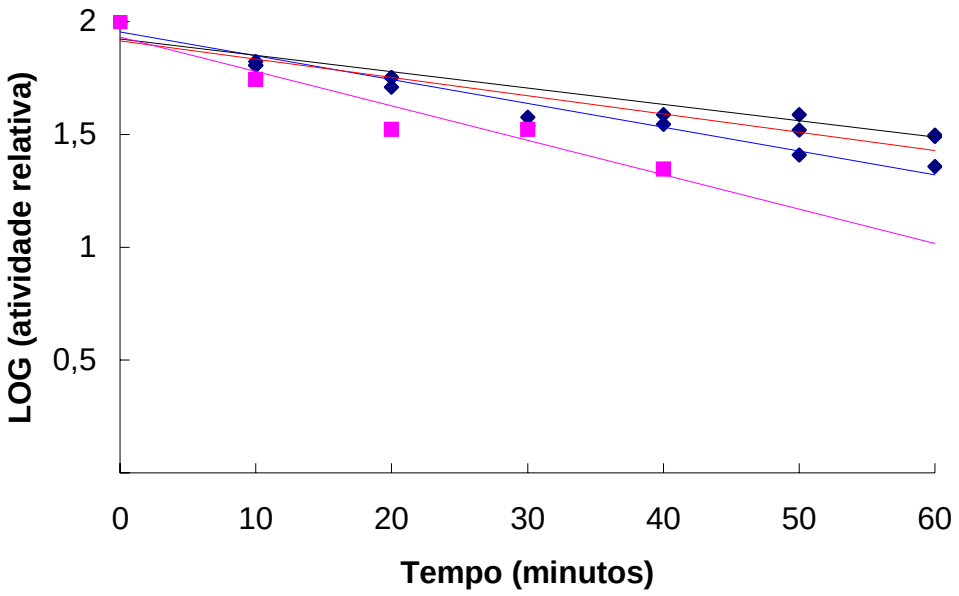

Figura 27: Inativação térmica das β-glicosidases mutantes, selvagem e bacteriana. A Sfβgli50 mutante $N_{329}D$ é representada pela reta azul, a mutante $N_{329}Q$ pela reta vermelha, a Sfβgli50 enzima selvagem é indicada pela reta rosa, e a β-glicosidase bacteriana pela reta preta. A inativação térmica foi realizada na temperatura de 60ºC e a atividade remanescente foi detectada com MUβglc 4 mM em tampão fosfato 100 mM pH 8,0. O material contendo as enzimas corresponde ao conjunto de frações com atividade β-glicosidásica eluída na coluna Phenyl Hi Prep (Figura 26).

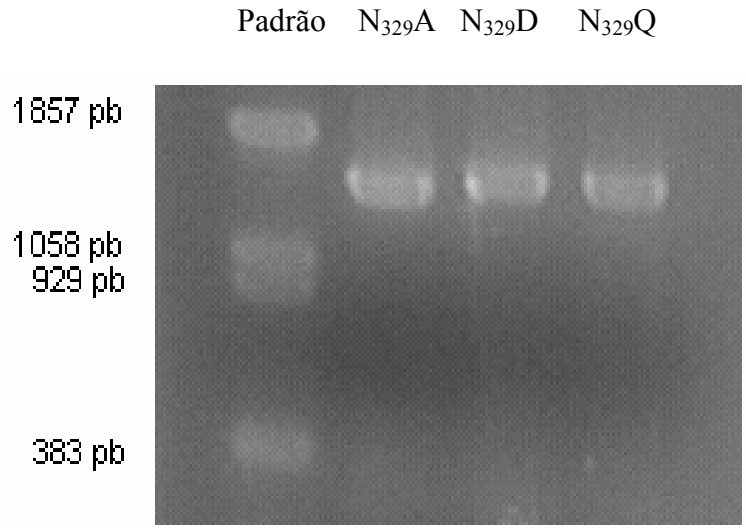

Figura 28: Análise por eletroforese em gel de agarose (1%) dos fragmentos de DNA que codificam as Sfβgli50 mutantes $N_{329}A$, $N_{329}D$ e $N_{329}Q$, amplificados em um PCR. Foram utilizados os "primers" AMINO e CARBOXI e como molde os plasmídeos pT7-7 codificando as Sfβgli50 mutantes $N_{329}A$, $N_{329}D$ e $N_{329}Q$. Posteriormente estes produtos foram purificados e ligados no plasmídeo pCal-n-Flag. O gel foi tratado com brometo de etídeo e as bandas de DNA visualizadas com luz ultravioleta.

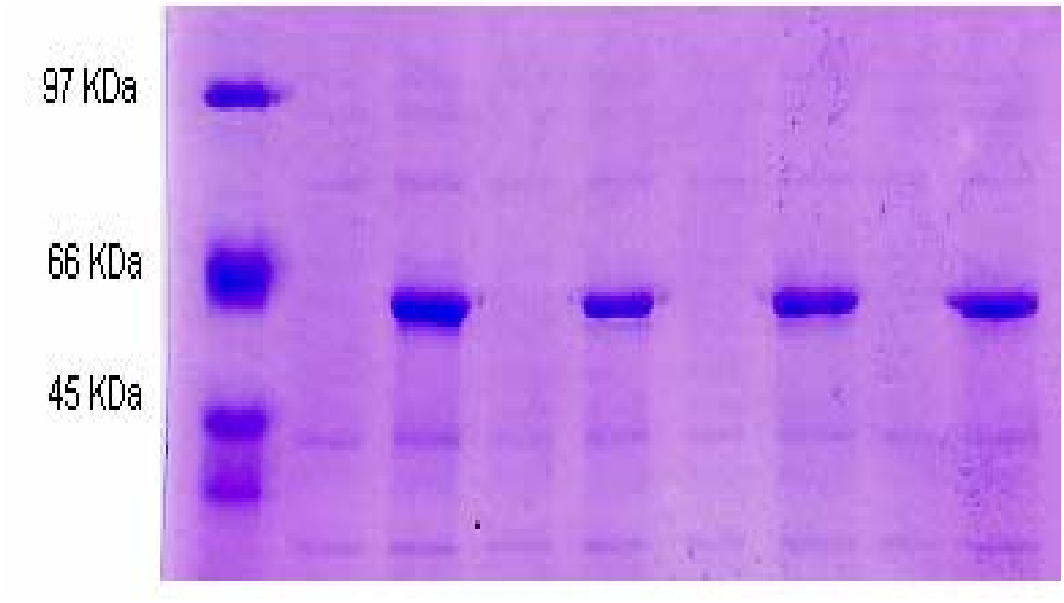

Figura 29: Análise em SDS-PAGE da expressão das β-glicosidases (Sfβgli50) recombinantes selvagem e mutantes com o plasmídeo pCal-n-Flag em células BL21 DE3. A indução da expressão foi feita com IPTG 1,0 mM por 4.0 horas a 25ºC. Temos nas seguintes raias: Padrão de peso molecular; 01 – não induzido; 02 – selvagem induzido; 03 – $N_{329}A$ não induzido; 04 – $N_{329}A$ induzido; 05 – $N_{329}D$ não induzido; 06 – $N_{329}D$ induzido; 07 – $N_{329}Q$ não induzido; 08 – $N_{329}Q$ induzido. O gel era 10% em poliacrilamida e foi corado com comassie blue R-250. Foram aplicados 20μL de amostra em cada raia.

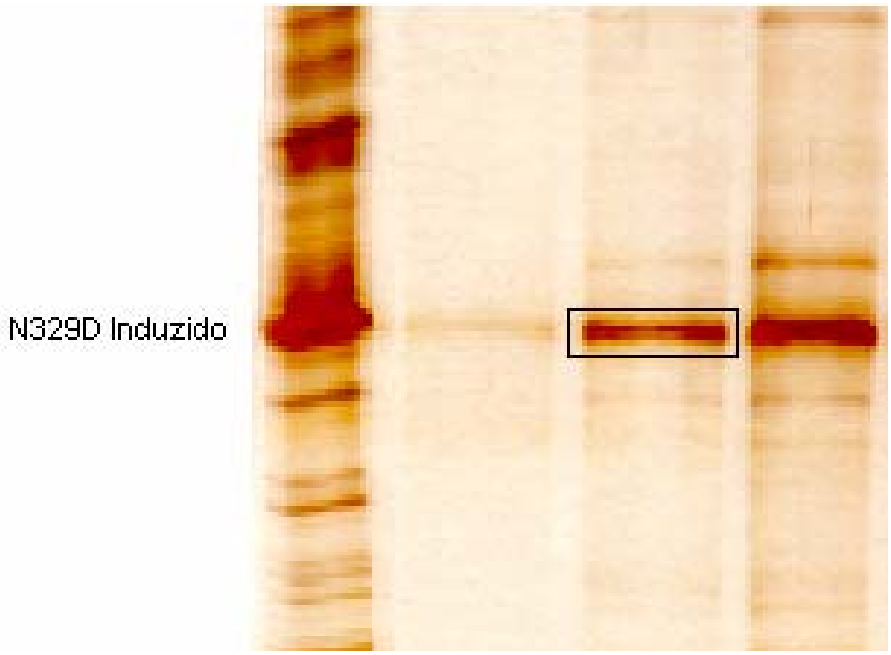

Figura 30: Análise em SDS- PAGE das frações da cromatografia de afinidade para purificação da Sfβgli50 recombinante mutante **($N_{329}D$).** Esta enzima mutante foi expressa com o peptídeo de fusão CBP utilizando o vetor pCal-n-Flag e foi purificada através de uma cromatografia de afinidade em coluna de Calmodulina-agarose. A proteína recombinante mutante está identificada pelo quadrado. O gel era 10% em poliacrilamida e foi corado com nitrato de prata.

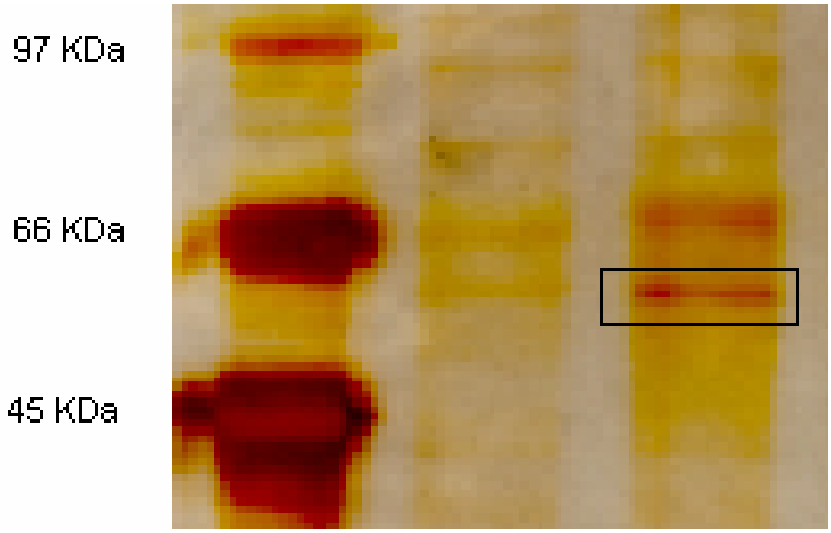

Figura 31: Análise em SDS- PAGE das frações da cromatografia de afinidade para purificação da Sfβgli50 recombinante mutante **($N_{329}A$).** Esta enzima mutante foi expressa com o peptídeo de fusão CBP utilizando o vetor pCal-n-Flag e foi purificada através de uma cromatografia de afinidade em coluna de Calmodulina-agarose. A proteína recombinante mutante está identificada pelo quadrado. O gel era 10% em poliacrilamida e foi corado com nitrato de prata.

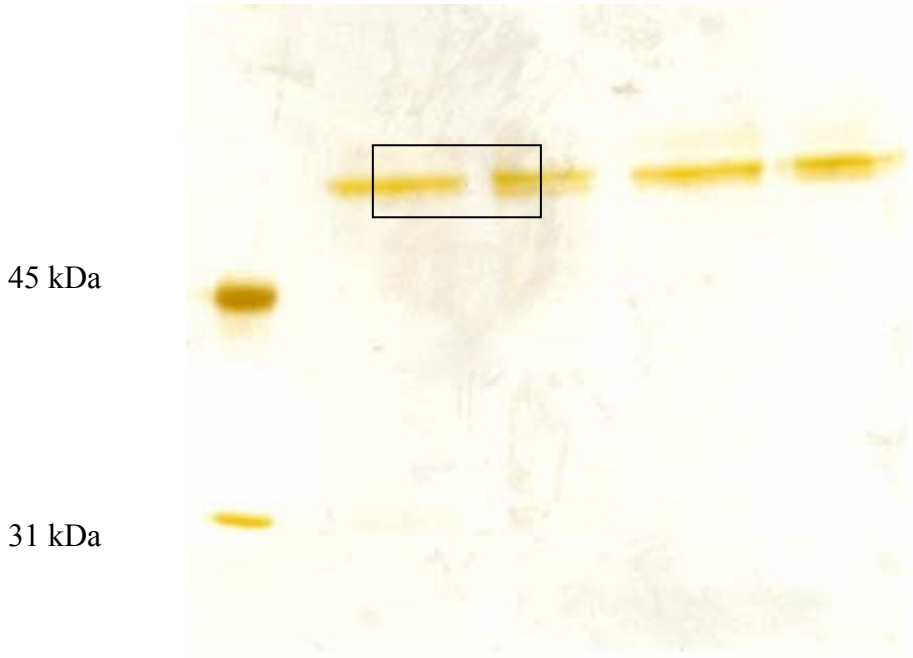

Figura 32: Análise em SDS- PAGE das frações da cromatografia para purificação da Sfβgli50 recombinante mutante **($N_{329}Q$).** Esta enzima foi expressa com o peptídeo de fusão CBP utilizando o vetor pCal-n-Flag e foi purificada através de uma cromatografia de afinidade em coluna de calmodulina-agarose. A proteína recombinante mutante está identificada pelo quadrado. O gel era 10% em poliacrilamida e foi corado com nitrato de prata.

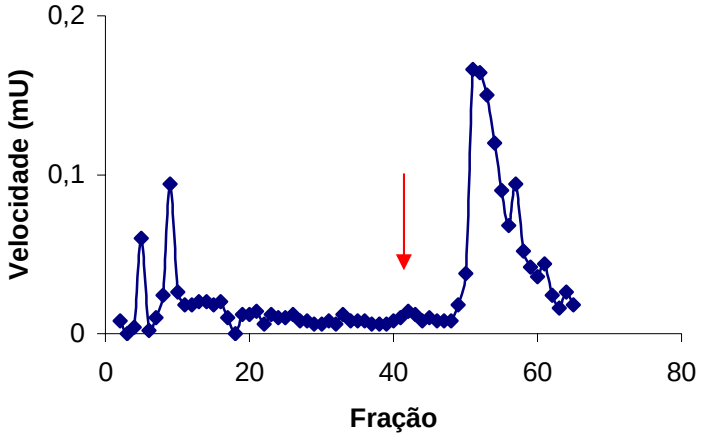

Figura 33 – Cromatografia de afinidade em coluna de calmodulina – agarose utilizando o lisado de bactérias BL21 DE3 transformadas com pCal-n-Flag codificando a Sfβgli50 selvagem. A atividade β-glicosidásica foi detectada utilizando NPβglc 4,0mM em tampão citrato-fosfato 100 mM pH 6,0, onde o produto da hidrólise (p-nitrofenolato) foi detectado por espectrofotometria a 420 nm. A seta indica o início da eluição das proteínas ligadas especificamente a coluna utilizando o tampão contendo EDTA (ver Procedimentos Experimentais).

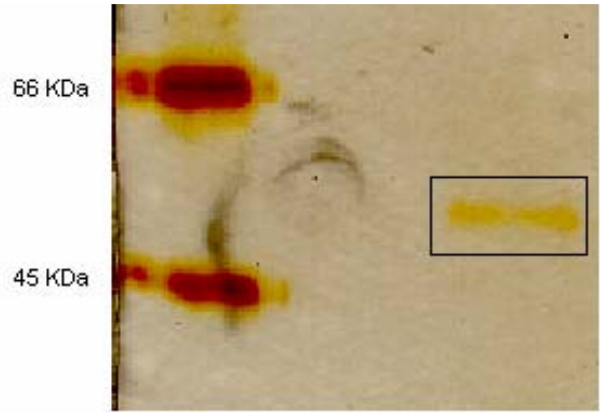

Figura 34: Análise em SDS- PAGE das frações da cromatografia para purificação da Sfβgli50 recombiante selvagem**.** Esta enzima mutante foi expressa com o peptídeo de fusão CBP utilizando o vetor pCal-n-Flag e foi purificada através de uma cromatografia de afinidade em coluna de calmodulina-agarose. A proteína recombinante selvagem está identificada pelo quadrado. O gel era 10% em poliacrilamida e foi corado com nitrato de prata.