Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**“Relação estrutura-função de uma β -glucosidase estimulada por
glicose e xilose do fungo termófilo *Humicola insolens*:
estudos de evolução dirigida”**

Luana Parras Meleiro

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto da USP, como parte das exigências
para a obtenção do título de Doutor em
Ciências, Área: Química.

Ribeirão Preto – SP
2017

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**“Relação estrutura-função de uma β -glucosidase estimulada por
glicose e xilose do fungo termófilo *Humicola insolens*:
estudos de evolução dirigida”**

Luana Parras Meleiro
Orientadora: Profa. Dra. Rosa dos Prazeres Melo Furriel

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto da USP, como parte das exigências
para a obtenção do título de Doutor em
Ciências, Área: Química.

Ribeirão Preto – SP
2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Meleiro, Luana Parras

Relação estrutura-função de uma β -glucosidase estimulada por glicose e xilose do fungo termófilo *Humicola insolens*: estudos de evolução dirigida. Ribeirão Preto, 2017.

307 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Faculdade de Filosofia Ciências e Letras Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Química.

Orientadora: Furriel, Rosa dos Prazeres Melo.

1. *Humicola insolens*. 2. Glicosilação. 3. Termoestabilidade
4. Transglicosilação 5. Estimulação por glicose e xilose

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luana Parras Meleiro

Relação estrutura-função de uma β -glucosidase estimulada por glicose e xilose do fungo termófilo *Humicola insolens*: estudos de evolução dirigida

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: Química.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof/a. Dr/a. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof/a. Dr/a. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof/a. Dr/a. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof/a. Dr/a. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof/a. Dr/a. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Dedico este trabalho aos meus pais, Lucia e Eduardo, pelo amor incondicional, apoio, dedicação e incentivo. Para vocês dedicarei sempre as minhas maiores conquistas.

AGRADECIMENTOS

Após cinco longos anos de doutorado direto, espero ser capaz de agradecer a todos que de alguma maneira contribuíram para que esse trabalho fosse concluído, em especial:

- À minha orientadora, amiga e madrinha, Prof. Rosa dos Prazeres Melo Furriel, pelo incentivo, confiança e por todo conhecimento transmitido. Obrigada por acreditar no meu trabalho. Você é responsável pelo início da minha carreira profissional e por despertar em mim a minha paixão pela pesquisa.

- Aos meus pais, Lucia e Eduardo, e ao meu irmão Leandro, por todo apoio, amor, carinho e dedicação. Vocês são meu espelho! Amo vocês!

- Ao meu marido, José Cristiano, por apoiar e incentivar todos os meus sonhos. Obrigada por tudo! Eu amo você!

- Aos meus sobrinhos Helena e Eduardo, que mesmo tão pequeninhos me dão forças para seguir os meus sonhos.

- Ao Prof. Dr. João Atílio Jorge, pelo apoio científico e por ser espelho para nós, alunos.

- Ao Prof. Dr. Richard John Ward, co-orientador “extraoficial”, por todo apoio científico, principalmente na parte estrutural, e toda confiança depositada em mim.

- Ao meu colega de laboratório Flávio Henrique Moreira de Souza que muito me ajudou e ensinou nos primeiros anos de laboratório. Embora eu tenha sido apenas sua “segunda” melhor IC, você foi meu primeiro companheiro de bancadas!

- À minha amiga Raquel Fonseca Maldonado, dona de uma mão “mágica”, pela amizade tão verdadeira e por todo incentivo durante a realização desse trabalho. Obrigada por acreditar em mim.

- À minha prima Juliana Sanchez Alponti, pelo apoio, amizade e pelas inúmeras discussões de resultado via mensagens de voz.

- À minha amiga-irmã Rogeria, pelo carinho, amizade e por todo apoio emocional. Obrigada por ser tão presente mesmo tão longe.

- À minha irmã adotiva, Rejane, pelo carinho e amizade.

- Aos meus amigos de laboratório Sibeli, Daniella, José Carlos, Ana Lucia, Douglas, Sandra, Priscilla e Marcela por todas as ajudas e por tornar meus dias mais alegres. A nossa convivência foi a melhor possível.

- Aos colegas do laboratório do Prof. Dr. Richard John Ward: Lara, Luana, Carla, Matheus, Maria Eugênia e Gustavo pelo compartilhamento de equipamentos e dúvidas experimentais.

- Ao Prof. Dr. Luis Alberto Beraldo de Moraes e ao técnico Eduardo pela ajuda com as análises por espectrometria de massas.

- À Prof. Dra. Adalgisa Rodrigues de Andrade e aos colegas do seu laboratório pela ajuda com as análises por HPLC e IC.

- À Prof. Dra. Carmen Lúcia Cardoso e especialmente à sua aluna Adriana pela ajuda com as análises e quantificação dos produtos de reação por espectrometria de massas.

- À Adriana Aparecida Marques do Núcleo de Serviços em biotecnologia do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP, Ribeirão Preto) pelas inúmeras análises de sequenciamento de DNA.

- Aos técnicos Nilton, Janaína e André pelo suporte técnico.

- Aos funcionários da FFCLRP.

- À FAPESP, Capes e CNPq pelo auxílio financeiro.

Por fim, agradeço a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização desta tese.

A todos meu muito obrigado.

“Para se ter sucesso, é necessário amar de verdade o que se faz. Caso contrário, levando em conta apenas o lado racional, você simplesmente desiste. É o que acontece com a maioria das pessoas”

Steve Jobs

RESUMO

Um dos pré-requisitos para a produção economicamente viável de etanol a partir da biomassa lignocelulósica é o desenvolvimento de processos eficientes e baratos de hidrólise enzimática de celulose e hemicelulose. As enzimas respondem por altas percentagens dos custos de hidrólise, pois é necessário utilizar altas cargas enzimáticas para obter rendimentos aceitáveis devido à inibição das enzimas lignocelulolíticas pelos produtos, que se intensifica com o uso de altas concentrações iniciais de biomassa. Uma das estratégias para melhorar a eficiência e diminuir os custos da hidrólise é a identificação de enzimas mais eficientes, com grande atenção para aquelas tolerantes e/ou estimuladas pelos produtos de reação. Nesse contexto, a engenharia de proteínas é uma poderosa ferramenta para o melhoramento e o entendimento da relação estrutura-função destas enzimas. O presente trabalho visou avaliar o efeito da glicosilação sobre as características bioquímicas de uma β -glucosidase estimulada por glicose e xilose de *Humicola insolens*, comparando a enzima nativa e as enzimas recombinantes, expressas em *Escherichia coli* (Bglhi) e *Pichia pastoris* (Bglhi^{PP}), além de estudar a relação estrutura-função por meio de técnicas de evolução dirigida objetivando o entendimento dos mecanismos envolvidos na estimulação da enzima pelos monossacarídeos. Com relação à glicosilação, a expressão e caracterização da Bglhi^{PP} permitiu avaliar que as principais características influenciadas por diferentes conteúdos de carboidratos na enzima foram a temperatura ótima e a termoestabilidade. Já o estudo de evolução dirigida culminou na geração de 4 mutantes com padrão de estimulação por glicose e xilose diferentes da Bglhi (utilizada como controle). Todos os mutantes contêm uma das duas substituições (D237V e N235S) agrupadas ao redor dos subsítios de ligação da aglicona (+1 e +2). Os dados cinéticos e de transglicosilação permitiram sugerir que o mecanismo de estimulação destas enzimas envolve interações alostéricas, modulação das rotas de hidrólise e transglicosilação e competição entre substrato e monossacarídeos pela ligação aos subsítios do sítio ativo. A mutação D237V (presente nos mutantes 4-12D e 5-7H) favoreceu a rota de hidrólise em detrimento à de transglicosilação e a atividade *p*NP-glucosidásica, mas não a celobiásica, foi estimulada por xilose. A substituição N235S (presente nos mutantes 1-6D e 5-7C) aboliu a preferência por hidrólise ou transglicosilação e a atividade celobiásica, mas não a *p*NP-glucosidásica, foi fortemente inibida por xilose. Além disso, ambas as mutações diminuíram a tolerância das enzimas pelos monossacarídeos. Estes resultados mostraram que a modulação fina da atividade da Bglhi e das enzimas dos mutantes por glicose e/ou xilose é regulada pelas afinidades relativas dos subsítios da glicona e da aglicona pelos substratos e pelos monossacarídeos livres. As mudanças na topologia e nas propriedades físico-químicas dos subsítios +1 e +2 da aglicona foi proposta por racionalizar os dados cinéticos e de transglicosilação.

Palavras-chave: *Humicola insolens*; glicosilação; termoestabilidade; transglicosilação; estimulação por glicose e xilose

ABSTRACT

One of the prerequisites for the economically viable production of ethanol from the lignocellulosic biomass is the development of efficient and inexpensive processes of enzymatic hydrolysis of cellulose and hemicellulose. The enzymes are responsible for high percentages of hydrolysis costs, since it is necessary to use high enzymatic loads for acceptable yields due to inhibition of lignocellulolytic enzymes by products, which is intensified by the use of high initial concentrations of biomass. One of the strategies to improve efficiency and decrease the costs of hydrolysis is the identification of more efficient enzymes with great attention to those that are tolerant and/or stimulated by the reaction products. In this context, protein engineering is a powerful tool for the improvement and understanding of the structure-function relationship of these enzymes. The present work aimed to evaluate the effect of glycosylation on the biochemical characteristics of glucose and xylose-stimulated β -glucosidase from *Humicola insolens*, comparing the native enzyme and the recombinant enzymes expressed in *Escherichia coli* (Bglhi) and *Pichia pastoris* (Bglhi^{Pp}) and study the structure-function relationship through directed evolution techniques aiming the understanding of the mechanisms involved in the stimulation of the enzyme by the monosaccharides. With regard to glycosylation, the expression and characterization of Bglhi^{Pp} allowed to evaluate that the main characteristics influenced by different carbohydrate contents in the enzyme were optimum temperature and thermostability. The study of directed evolution culminated in the generation of 4 mutants with pattern of stimulation by glucose and xylose different from Bglhi (used as control). All mutants contain one of the two substitutions (D237V and N235S) grouped around the aglycone binding sites (+1 and +2). The kinetic and transglycosylation data allowed us to suggest that the mechanism of stimulation of these enzymes involves allosteric interactions, modulation of the hydrolysis and transglycosylation routes, and competition between substrate and monosaccharides by binding to the subsites in active site. The mutation D237V (present in mutants 4-12D and 5-7H) favored the hydrolysis route over that of transglycosylation and *p*NP-glucosidase activity, but not cellobiase activity, was stimulated by xylose. The substitution N235S (present in mutants 1-6D and 5-7C) abolished the preference for hydrolysis or transglycosylation and cellobiase activity, but not *p*NP-glucosidase activity, was strongly inhibited by xylose. In addition, both mutations decreased the tolerance of the enzymes by the monosaccharides. These results showed that fine modulation of Bglhi and mutant enzymes activities by glucose and/or xylose is regulated by the relative affinities of the glycone and aglycone subsites for the substrates and the free monosaccharides. The changes in the topology and physicochemical properties of the +1/+2 aglycone sites of the mutants have been proposed to rationalize the kinetic and transglycosylation data.

Keywords: *Humicola insolens*; glycosylation; thermostability; transglycosylation; stimulation by glucose and xylose

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química da celulose.....	27
Figura 2	Disposição da celulose na parede celular vegetal.....	28
Figura 3	Representação esquemática da visão clássica da ação catalítica do complexo celulolítico sobre a celulose.....	30
Figura 4	Representação esquemática da visão atual da ação de enzimas hidrolíticas e não-hidrolíticas sobre a celulose.....	31
Figura 5	Mecanismos de hidrólise das ligações glicosídicas pelas GHs.....	38
Figura 6	Mecanismos de hidrólise e transglicosilação pelas GHs que seguem o mecanismo de retenção.....	40
Figura 7	Representação esquemática do aumento da razão de erro por mutação, empregando a técnica de epPCR.....	44
Figura 8	Mapa de restrições contendo a posição exata da endoxilanase de <i>B. subtilis</i> e algumas das enzimas de restrição disponíveis no vetor pT7BsXA.....	64
Figura 9	Mapa físico do vetor pPIC9kf1CT.....	70
Figura 10	Mapa de restrições do vetor pPIC9kf1CT.....	71
Figura 11	Esquema representativo da mutagênese sítio-dirigida utilizada para eliminar individualmente os dois sítios internos de <i>Stul</i> do gene <i>bglhi</i>	72
Figura 12	Integração do vetor no genoma de <i>P. pastoris</i> por inserção gênica no locus da histidina desidrogenase.....	79
Figura 13	Enzimas de restrição que não clivam internamente a sequência que codifica a β -glucosidase de <i>H. insolens</i>	84
Figura 14	Eletroforese em gel de agarose (1,0 %, m/v) após digestão dos plasmídeos pT7BsXA (a) e pET28_ <i>bglhi</i> (b) com as enzimas <i>NheI</i> e <i>BamHI</i>	86
Figura 15	Análise eletroforética dos produtos de PCR de colônias selecionadas de células DH5 α transformadas com o plasmídeo pT7_ <i>bglhi</i>	87
Figura 16	Cromatograma da análise do sequenciamento para confirmação da subclonagem do gene <i>bglhi</i> no vetor pT7.....	87
Figura 17	Mapa de restrições da região do gene <i>bglhi</i> que contém os sítios internos da enzima <i>Stul</i>	88
Figura 18	Eletroforese em gel de agarose (1,0 %, m/v) após reação de PCR para eliminação do sítio interno de <i>Stul</i> na posição 647 do gene <i>bglhi</i>	89
Figura 19	Análise eletroforética dos produtos de PCR de colônias selecionadas de células DH5 α transformadas com o plasmídeo contendo o gene <i>bglhi</i> após mutação silenciosa na posição 647.....	90
Figura 20	Cromatograma e alinhamento da região do gene <i>bglhi</i> submetida à mutação silenciosa 647.....	91
Figura 21	Eletroforese em gel de agarose (1,0 %, m/v) após PCR para eliminação do sítio interno de <i>Stul</i> na posição 752 do gene <i>bglhi</i>	92

Figura 22	Análise eletroforética dos produtos de PCR de colônias selecionadas de células DH5 α transformadas com o plasmídeo contendo o gene <i>bglhi</i> após mutação silenciosa na posição 752.....	93
Figura 23	Análise eletroforética dos produtos de digestão dos DNAs plasmidiais extraídos dos clones positivos com a enzima <i>Stu</i> I.	94
Figura 24	Cromatograma e alinhamento da região do gene <i>bglhi</i> submetida a mutação silenciosa 752.....	95
Figura 25	Eletroforese em gel de agarose (1,0 %, m/v) dos produtos da amplificação do gene <i>bglhi</i> para inserção dos sítios de restrição <i>Sna</i> BI e <i>Avr</i> II nas posições inicial e final do gene, respectivamente.....	96
Figura 26	Análise eletroforética dos produtos de PCR de colônias selecionadas de células DH5 α transformadas com o plasmídeo pT7_ <i>bglhi</i> _mut.....	97
Figura 27	Colônias transformadas com o plasmídeo pPIC9kf1CT_ <i>bglhi</i> _mut.....	98
Figura 28	Deteção em meio sólido da expressão de β -glucosidases por colônias transformadas com o plasmídeo pPIC9kf1CT_ <i>bglhi</i> _mut.....	99
Figura 29	Efeito do tempo e do meio de cultivo sobre a expressão da β -glucosidase de <i>H. insolens</i> em <i>P. pastoris</i>	100
Figura 30	Análise eletroforética da Bglhi ^{Pp} por PAGE (A e B) e SDS-PAGE (C e D).....	101
Figura 31	Análise por SDS-PAGE da Bglhi (A) e Bglhi ^{Pp} (B).....	102
Figura 32	Sequência de aminoácidos da β -glucosidase de <i>H. insolens</i> com identificação dos possíveis sítios de glicosilação.....	103
Figura 33	Efeito da temperatura (A) e do pH (B) sobre a atividade da Bglhi ^{Pp}	104
Figura 34	Estabilidade térmica (A) e ao pH (B) da Bglhi ^{Pp}	105
Figura 35	Estimulação da atividade da Bglhi ^{Pp} por <i>p</i> NP-Glc (A) e celobiose (B).....	108
Figura 36	Efeito da concentração de glicose (A) e xilose (B) sobre a atividade <i>p</i> NP-glucosidásica da Bglhi ^{Pp}	110
Figura 37	Estimulação da atividade <i>p</i> NP-glucosidásica da Bglhi ^{Pp} por glicose (A) e xilose (B).....	112
Figura 38	Estimulação da atividade da Bglhi ^{Pp} por <i>p</i> NP-Glc em presença de concentrações estimulatórias fixas de glicose (A) ou xilose (B).....	114
Figura 39	Reação da HK e G6PDH utilizada para quantificação de glicose livre.....	139
Figura 40	Representação esquemática das etapas de <i>screening</i> de clones capazes de expressar β -glucosidases com percentuais de estimulação da atividade <i>p</i> NP-glucosidásica por glicose alterados.....	146
Figura 41	Análise eletroforética dos produtos do epPCR obtidos nas condições propostas por Cadwell e Joyce (1992).....	156
Figura 42	Análise eletroforética dos produtos de epPCR em condições modificadas do protocolo padrão de PCR.....	157

Figura 43	Análise eletroforética dos produtos da reação do epPCR utilizando como molde o vetor pET28_ <i>bglhi</i>	159
Figura 44	Eletroforese em gel de agarose (1,0 %, m/v) do fragmento resultante do epPCR e do vetor pET-28a(+) após digestão com <i>NheI</i> e <i>BamHI</i>	160
Figura 45	Análise eletroforética dos produtos de PCR de colônias selecionadas de células DH5 α transformadas com o plasmídeo contendo o fragmento resultante do epPCR.....	161
Figura 46	<i>Screening</i> de atividade β -glucosidásica em meio sólido.....	163
Figura 47	Controle do <i>screening</i> de atividade β -glucosidásica em meio sólido.....	164
Figura 48	<i>Screening</i> de atividade β -glucosidásica em meio sólido em diferentes concentrações de IPTG.....	165
Figura 49	<i>Screening</i> de atividade β -glucosidásica, em meio sólido, de colônias selecionadas com o auxílio do sistema automatizado K6-2.....	166
Figura 50	Alinhamento entre as sequências de aminoácidos da Bglhi e do clone 1-9A.....	172
Figura 51	Estrutura tridimensional predita da β -glucosidase do mutante 1-9A.....	173
Figura 52	Alinhamento entre as sequências de aminoácidos da Bglhi e do clone 1-7B.....	175
Figura 53	Estrutura tridimensional predita da β -glucosidase do mutante 1-7B.....	176
Figura 54	Alinhamento entre as sequências de aminoácidos da Bglhi e do clone 1-1C.....	178
Figura 55	Estrutura tridimensional predita da β -glucosidase do mutante 1-1C.....	179
Figura 56	Alinhamento entre as sequências de aminoácidos da Bglhi e do clone 1-1D.....	181
Figura 57	Estrutura tridimensional predita da β -glucosidase do mutante 1-1D.....	182
Figura 58	Alinhamento entre as sequências de aminoácidos da Bglhi e do clone 4-12D.....	184
Figura 59	Estrutura tridimensional predita da β -glucosidase do mutante 4-12D.....	185
Figura 60	Alinhamento entre as sequências de aminoácidos da Bglhi e do clone 1-6D.....	186
Figura 61	Estrutura tridimensional predita da β -glucosidase do mutante 1-6D.....	187
Figura 62	Alinhamento entre as sequências de aminoácidos da Bglhi e do clone 2-10A.....	189
Figura 63	Estrutura tridimensional predita da β -glucosidase do mutante 2-10A.....	190
Figura 64	Alinhamento entre as sequências de aminoácidos da Bglhi e do clone 5-7C.....	191
Figura 65	Estrutura tridimensional predita da β -glucosidase do mutante 5-7C.....	192
Figura 66	Alinhamento entre as sequências de aminoácidos da Bglhi e do clone 5-7H.....	193

Figura 67	Estrutura tridimensional predita da β -glucosidase do mutante 5-7H.....	194
Figura 68	Análise eletroforética por PAGE (A e B) das β -glucosidases modificadas.....	197
Figura 69	Análise eletroforética por SDS-PAGE das β -glucosidases modificadas.....	198
Figura 70	Efeito da temperatura sobre a atividade <i>p</i> NP-glucosidásica de Bglhi e das enzimas produzidas pelos mutantes 1-9A, 1-7B, 1-1C, 1-1D, 1-6D, 2-10A, 4-12D, 5-7C e 5-7H.....	200
Figura 71	Efeito do pH sobre a atividade <i>p</i> NP-glucosidásica de Bglhi e das enzimas produzidas pelos mutantes 1-9A, 1-7B, 1-1C, 1-1D, 1-6D, 2-10A, 4-12D, 5-7C e 5-7H.....	202
Figura 72	Estimulação da atividade β -glucosidásica da Bglhi e das enzimas dos mutantes 1-9A, 1-7B, 1-1C, 1-1D, 1-6D, 2-10A, 4-12D, 5-7C e 5-7H por <i>p</i> NP-Glc	205
Figura 73	Efeito da concentração de glicose sobre a atividade <i>p</i> NP-glucosidásica da Bglhi e das enzimas dos mutantes 1-9A, 1-7B, 1-1C, 1-1D, 1-6D, 2-10A, 4-12D, 5-7C e 5-7H.....	208
Figura 74	Efeito de concentrações crescentes de glicose (A) e xilose (B) sobre a atividade da Bglhi em presença de diferentes concentrações fixas de <i>p</i> NP-Glc.....	210
Figura 75	Estimulação da atividade da Bglhi por <i>p</i> NP-Glc em ausência e presença de concentrações fixas de glicose (A) ou xilose (B).....	212
Figura 76	Estimulação da atividade <i>p</i> NP-glucosidásica da Bglhi por glicose (A) ou xilose (B) presença de concentrações fixas de <i>p</i> NP-Glc.....	215
Figura 77	Estimulação da atividade <i>p</i> NP-glucosidásica da Bglhi por glicose na presença de concentrações fixas de xilose e vice-versa.....	217
Figura 78	Efeito de concentrações crescentes de glicose (linhas e pontos vermelhos) ou xilose (linhas e pontos azuis) sobre a atividade <i>p</i> NP-glucosidásica da Bglhi e das enzimas dos mutantes 4-12D, 5-7H, 5-7C e 1-6D.....	219
Figura 79	Efeito de concentrações crescentes de <i>p</i> NP-Glc sobre a atividade <i>p</i> NP-glucosidásica da Bglhi e das enzimas dos mutantes 4-12D, 5-7H, 5-7C e 1-6D na ausência (linhas e pontos pretos) ou em presença de concentrações fixas de glicose (linhas e pontos vermelhos) ou xilose (linhas e pontos azuis).....	222
Figura 80	Estimulação da atividade β -glucosidásica da Bglhi e das enzimas dos mutantes 4-12D, 5-7H, 5-7C e 1-6D por celobiose.....	226
Figura 81	Efeito de concentrações crescentes de xilose sobre a atividade celobiásica da Bglhi e das enzimas dos mutantes 4-12D, 5-7H, 5-7C e 1-6D.....	228
Figura 82	Efeito de concentrações crescentes de celobiose sobre a atividade celobiásica da Bglhi e das enzimas dos mutantes 4-12D, 5-7H, 5-7C e 1-6D na ausência (linhas e pontos	

	pretos) ou em presença de concentrações fixas de xilose (linhas e pontos azuis).....	230
Figura 83	Análise temporal dos produtos de reação formados pela ação de Bglhi utilizando celobiose como substrato.....	235
Figura 84	Espectro ID-MS obtido da análise dos produtos formados pela ação de Bglhi sobre celobiose na presença de xilose.....	236
Figura 85	Espectro MS/MS obtido da fragmentação do pico com m/z 335 [GX + Na] ⁺ e proposta de fragmentação.....	237
Figura 86	Análise temporal dos produtos de reação formados pela ação das β -glucosidases dos mutantes 4-12D e 5-7H utilizando celobiose como substrato.....	239
Figura 87	Análise temporal dos produtos de reação formados pela ação das β -glucosidases dos mutantes 5-7C e 1-6D utilizando celobiose como substrato.....	240
Figura 88	Representação estrutural da Bglhi.....	245
Figura 89	Alinhamento múltiplo entre as sequências da Bglhi e de outras β -glucosidases estimuladas por glicose.....	246
Figura 90	Alinhamento múltiplo entre as sequências da Bglhi e de outras β -glucosidases da família GH1 na região contendo os resíduos W168 e L173 da Bglhi.....	254
Figura 91	Representação estrutural dos aminoácidos aspartato e valina	256
Figura 92	Interações entre a celotetraose e os aminoácidos do sítio ativo de BglB de <i>P. polymyxa</i>	259
Figura 93	Representação estrutural dos aminoácidos asparagina e serina	259

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	As principais características de alguns sistemas de expressão de enzimas heterólogas comumente usados.....	46
Tabela 2	Oligonucleotídeos contendo as mutações silenciosas para eliminar os sítios internos de <i>Stul</i> do gene <i>bglhi</i>	74
Tabela 3	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para subclonagem do gene <i>bglhi</i> em pPIC9kf1CT.....	76
Tabela 4	Especificidade de substrato da β -glucosidase de <i>H. insolens</i> expressa em <i>P. pastoris</i>	106
Tabela 5	Efeito de diferentes carboidratos sobre a atividade <i>pNP</i> -glucosidásica da Bglhi ^{Pp}	109
Tabela 6	Parâmetros cinéticos calculados para a estimulação da atividade <i>pNP</i> -glucosidásica da Bglhi ^{Pp} por glicose e xilose em concentração saturante de <i>pNP</i> -Glc.....	113
Tabela 7	Parâmetros cinéticos calculados para a estimulação da atividade β -glucosidásica da Bglhi ^{Pp} por <i>pNP</i> -Glc em presença de concentrações estimulatórias fixas de glicose e xilose.....	115
Tabela 8	Propriedades moleculares e bioquímicas de β -glucosidases estimuladas por glicose.....	119
Tabela 9	Parâmetros cinéticos calculados para a estimulação por <i>pNP</i> -Glc e celobiose da Bglhi ^{Pp} , Bglhi, Bglhi ^N , BGL4 ^{Sc} e BGL4 ^{Ao}	123
Tabela 10	Parâmetros cinéticos para a estimulação por <i>pNP</i> -Glc e celobiose das β -glucosidases estimuladas por glicose.....	125
Tabela 11	Estimulação da atividade <i>pNP</i> -glucosidásica de β -glucosidases por glicose.....	130
Tabela 12	Fator de estimulação das enzimas expressas pelos clones da Placa 1.....	167
Tabela 13	Fator de estimulação das enzimas expressas pelos clones da Placa 2.....	167
Tabela 14	Fator de estimulação das enzimas expressas pelos clones da Placa 3.....	167
Tabela 15	Fator de estimulação das enzimas expressas pelos clones da Placa 4.....	168
Tabela 16	Fator de estimulação das enzimas expressas pelos clones da Placa 5.....	168
Tabela 17	Fator de estimulação das enzimas expressas pelos clones da Placa 6.....	168
Tabela 18	Fatores de estimulação das enzimas expressas pelos clones dos grupos 1.....	170
Tabela 19	Nucleotídeos mutados no clone 1-9A.....	171
Tabela 20	Nucleotídeos mutados no clone 1-7B.....	173
Tabela 21	Nucleotídeos mutados no clone 1-1C.....	177
Tabela 22	Nucleotídeos mutados no clone 1-1D.....	180
Tabela 23	Nucleotídeos mutados no clone 4-12D.....	183
Tabela 24	Nucleotídeos mutados no clone 1-6D.....	185
Tabela 25	Nucleotídeos mutados no clone 2-10A.....	188

Tabela 26	Nucleotídeos mutados no clone 5-7C.....	190
Tabela 27	Nucleotídeo mutado no clone 5-7H.....	192
Tabela 28	Resumo de todas as mutações e suas respectivas substituições de aminoácidos para as β -glucosidases modificadas.....	195
Tabela 29	Parâmetros cinéticos determinados para a estimulação da atividade β -glucosidásica da Bglhi e das enzimas produzidas pelos mutantes 1-9A, 1-7B, 1-1C, 1-1D, 1-6D, 2-10A, 4-12D, 5-7C e 5-7H por <i>p</i> NP-Glc.....	204
Tabela 30	Parâmetros cinéticos calculados para estimulação da atividade da Bglhi por <i>p</i> NP-Glc na ausência e presença de concentrações fixas de glicose ou xilose.....	213
Tabela 31	Parâmetros cinéticos para estimulação da atividade da Bglhi por glicose e xilose em presença de concentrações fixas de <i>p</i> NP-Glc.....	214
Tabela 32	Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade da Bglhi por glicose e/ou xilose.....	218
Tabela 33	Estimulação da atividade <i>p</i> NP-glucosidásica da Bglhi e seus mutantes por glicose e xilose.....	220
Tabela 34	Parâmetros cinéticos para estimulação da atividade <i>p</i> NP-glucosidásica da Bglhi e seus mutantes por <i>p</i> NP-Glc em ausência ou presença de concentrações fixas de glicose ou xilose.....	223
Tabela 35	Parâmetros cinéticos para estimulação da atividade celobiásica da Bglhi e seus mutantes por celobiose.....	225
Tabela 36	Parâmetros cinéticos para estimulação da atividade celobiásica da Bglhi e seus mutantes por celobiose em presença ou ausência de concentrações fixas de xilose.....	231
Tabela 37	Taxas de liberação de <i>p</i> NP ⁻ e glicose e frações da Bglhi e seus mutantes que seguiram as rotas de hidrólise (%H) e transglicosilação (%T) em condições saturantes de <i>p</i> NP-Glc e em ausência ou presença de xilose em concentrações MC _{max}	233

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Avicel®: celulose microcristalina
BSA: soralbumina bovina
CAZy: Carbohydrate Active enZyme
CIAP: fosfatase alcalina de intestino de bezerro
CCD: cromatografia em camada delgada
CMC: carboximetilcelulose
DNS: ácido dinitrosalicílico
dNTP Mix: solução contendo 2 mmol L⁻¹ de cada um dos dNTP
dNTP Mix_mutagênico: solução contendo dGTP 2 mmol L⁻¹, dATP 2 mmol L⁻¹, dCTP 10 mmol L⁻¹ e dTTP 10 mmol L⁻¹
DMSO: dimetil sulfoxido
DO: densidade óptica
EDTA: ácido etileno diaminotetracético
epPCR: *error-prone* PCR
FS: fator de estimulação
G₁: glicose
G₂: celobiose
G₃: celotriose
G₄: celotetraose
G6PDH: Glicose-6-fosfato desidrogenase
Ge: gentibiose
GH: glicosil hidrolases
GX: glicopiranosil-xilose
HK: Hexokinase
ID: inserção direta
IPTG: isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
K_{0,5}: constante de dissociação aparente
K_{Glc}: constante de afinidade aparente para glicose
K_M: constante de Michaelis–Menten
K_{Xil}: constante de afinidade aparente para xilose
LB: meio de cultura Luria-Bertani
LPMOs: monooxigenases líticas de polissacarídeos
MC_{max}: concentração de glicose ou xilose que resulta em máxima estimulação da atividade enzimática
Meio BMG: meio de cultura constituído de YNB 3,4 g L⁻¹, sulfato de amônio 10 g L⁻¹, biotina 4.10⁻⁴ g.L⁻¹, glicerol 1%(v/v) e fosfato de potássio 100 mmol L⁻¹, pH 6,0
Meio BMGY: meio de cultura constituído de YNB 3,4 g L⁻¹, extrato de levedura 10 g L⁻¹, peptona 20 g L⁻¹, sulfato de amônio 10 g L⁻¹, biotina 4.10⁻⁴ g.L⁻¹, glicerol 1% (v/v) e fosfato de potássio 100 mmol L⁻¹, pH 6,0
Meio BMM: meio de cultura constituído de YNB 3,4 g L⁻¹, sulfato de amônio 10 g L⁻¹, biotina 4 10⁻⁴ g L⁻¹, metanol 0,5% (v/v) ou 1% (v/v) e fosfato de potássio 100 mmol L⁻¹, pH 6,0
Meio BMMY: meio de cultura constituído de YNB 3,4 g L⁻¹, extrato de levedura 10 g L⁻¹ e peptona 20 g L⁻¹, sulfato de amônio 10 g L⁻¹, biotina 4.10⁻⁴ g L⁻¹, metanol 0,5% (v/v) ou 1% (v/v) e fosfato de potássio 100 mmol L⁻¹, pH 6,0

Meio GYT: meio constituído de glicerol 10% (v/v), extrato de levedura 0,125% (m/v) e triptona 0,25% (m/v)

Meio HDM seletivo: meio de cultura constituído de triptona 15 g L⁻¹ e extrato de levedura 25 g L⁻¹ com pH ajustado para 7,5 acrescido de canamicina 40 µg mL⁻¹, cloranfenicol 34 µg mL⁻¹ e MgSO₄ 10 mmol L⁻¹

Meio HDM: meio de cultura constituído de triptona 15 g L⁻¹ e extrato de levedura 25 g L⁻¹ com pH ajustado para 7,5

Meio LB líquido seletivo para detecção de atividade β-glucosidásica: meio de cultura idêntico ao meio LB líquido e acrescido de canamicina 40 µg mL⁻¹, cloranfenicol 34 µg mL⁻¹ e IPTG 0,05 mmol L⁻¹

Meio LB líquido: meio de cultura líquido composto de triptona 10 g L⁻¹, extrato de levedura 5 g L⁻¹ e NaCl 10 g L⁻¹

Meio LB sólido seletivo para detecção de atividade β-glucosidásica: meio de cultura sólido idêntico ao meio LB sólido e acrescido de canamicina 40 µg mL⁻¹, cloranfenicol 34 µg mL⁻¹, esculina 1 g L⁻¹, cloreto férrico 0,3 g L⁻¹ e IPTG 0,05 mmol L⁻¹

Meio LB sólido: meio de cultura sólido composto de triptona 10 g L⁻¹, extrato de levedura 5 g L⁻¹, NaCl 10 g L⁻¹ e ágar 1,5 g L⁻¹

Meio MD seletivo: meio de cultura sólido constituído de YNB 3,4 g L⁻¹, sulfato de amônio 10 g L⁻¹, biotina 4.10⁻⁴ g L⁻¹, ágar 15 g L⁻¹, esculina 1 g L⁻¹ e cloreto férrico 0,3 g L⁻¹

Meio MD sólido: meio de cultura sólido constituído de YNB 3,4 g L⁻¹, glicose 10 g L⁻¹, sulfato de amônio 10 g L⁻¹, biotina 4.10⁻⁴ g L⁻¹ e ágar 15 g L⁻¹

Meio SOC: meio constituído de extrato de levedura 0,5% (m/v), triptona 2% (m/v), NaCl 10 mmol L⁻¹, KCl 2,5 mmol L⁻¹, MgCl₂ 10 mmol L⁻¹, MgSO₄ 10 mmol L⁻¹ e glicose 20 mmol L⁻¹

Meio YPD líquido: meio de cultura líquido constituído de extrato de levedura 10 g L⁻¹, peptona 20 g L⁻¹ e glicose 20 g L⁻¹

Meio YPD sólido: meio de cultura sólido constituído de extrato de levedura 10 g L⁻¹, peptona 20 g L⁻¹, glicose 20 g L⁻¹ e ágar 15 g L⁻¹

Meio YPG: meio de cultura constituído de extrato de levedura 10 g L⁻¹, peptona 20 g L⁻¹, glicerol 1%(v/v) e fosfato de potássio 100 mmol L⁻¹, pH 6,0

Meio YPM: meio de cultura constituído de extrato de levedura 10 g L⁻¹, peptona 20 g L⁻¹, metanol 0,5% (v/v) ou 1% (v/v) e fosfato de potássio 100 mmol L⁻¹, pH 6,0

MS: espectrometria de massas

MT: concentração máxima de glicose ou xilose que não inibe a atividade enzimática
n_H: coeficiente de Hill

PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida

pNP⁻: íon *p*-nitrofenolato

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

pNP-Glc: *p*-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo

pNP-Xil: *p*-nitrofenil-β-D-xilanopiranosídeo

S: soforose

SC: sítio catalítico

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SG₂: mistura equimolar de soforose e celobiose

SM: sítios moduladores

SMC: sítios múltiplos de clonagem

Tampão A: Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 8,0, contendo NaCl 500 mmol L⁻¹

Tampão mutagênico: tampão constituído de MgCl_2 70 mmol L^{-1} , KCl 500 mmol L^{-1} , Tris-HCl 100 mmol L^{-1} , pH=8,3, e gelatina 0,1% (m/v)

Tampão TBE 1X: Tris 89 mmol L^{-1} , ácido bórico 89 mmol L^{-1} e EDTA 2 mmol L^{-1} , pH 8,0

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

UFC: unidades formadoras de colônias

V_{max} : velocidade máxima

X_1 : xilose

X_2 : xilobiose

YNB: base nitrogenada para leveduras sem aminoácidos e sulfato de amônio

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO.....	25
1.1 Celulose.....	26
1.2 Sacarificação da celulose.....	29
1.3 As β -glucosidases.....	31
1.4 O fungo <i>Humicola insolens</i> e suas β -glucosidases.....	34
1.5 Mecanismos de reação das GHs.....	36
1.6 Engenharia de proteínas.....	41
1.7 A técnica de epPCR.....	43
1.8 Sistemas de expressão de enzimas heterólogas.....	45
1.8.1 <i>Escherichia coli</i> : um típico sistema de expressão procariótico.....	49
1.8.2 <i>Pichia pastoris</i> : um exemplo de expressão eucariótico.....	51
CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS GERAIS.....	53
CAPÍTULO 3 - A β-GLUCOSIDASE DE <i>H. INSOLENS</i> EXPRESSA EM <i>P. PASTORIS</i>: O EFEITO DA GLICOSILAÇÃO SOBRE AS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS E CINÉTICAS DA ENZIMA.....	55
3.1 Objetivos específicos.....	56
3.2 Material e métodos.....	57
3.2.1 Dosagens de proteínas.....	57
3.2.2 Determinação da atividade aril β -glucosidásica.....	57
3.2.3 Determinação da atividade sobre outros substratos.....	58
3.2.4 Tratamento dos dados cinéticos.....	59
3.2.5 Eletroforese.....	60
3.2.6 Sequenciamento automático de DNA e análise dos resultados.....	61
3.2.7 Preparo de células de <i>E. coli</i> DH5 α eletrocompetentes.....	62
3.2.8 Subclonagem do gene <i>bglhi</i> no vetor pT7BsXA.....	63
3.2.8.1 O vetor pT7BsXA.....	63
3.2.8.2 Digestão enzimática dos plasmídeos pT7BsXA e pET28_ <i>bglhi</i>	66
3.2.8.3 Ligação do fragmento da Bglhi ao vetor pT7.....	66
3.2.8.4 Transformação em células de <i>E. coli</i> DH5 α	67
3.2.8.5 PCR de colônia.....	67
3.2.8.6 Minipreparação de DNA plasmidial.....	69
3.2.9 Subclonagem do gene <i>bglhi</i> em pPIC9kf1CT para expressão em <i>P. pastoris</i>	69
3.2.9.1 O vetor pPIC9kf1CT.....	69
3.2.9.2 Mutagênese sítio-dirigida para eliminação dos sítios de <i>StuI</i> nas posições 647 e 752 do gene <i>bglhi</i>	72
3.2.9.3 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores para subclonagem do gene <i>bglhi</i> em pPIC9kf1CT.....	75
3.2.9.4 Amplificação do gene <i>bglhi</i> e dos sítios de restrição <i>SnaBI</i> e <i>AvrII</i> para subclonagem em pPIC9kf1CT.....	76
3.2.9.5 Digestão enzimática e ligação do fragmento de interesse ao vetor pPIC9kf1CT.....	77
3.2.10 Transformação em <i>P. pastoris</i>	77
3.2.10.1 Linhagem utilizada.....	77
3.2.10.2 Linearização do plasmídeo pPIC9kf1CT_ <i>bglhi</i> _mut.....	78

3.2.10.3	Preparo de células de <i>P. pastoris</i> GS115 eletrocompetentes.....	79
3.2.10.4	Transformação em células de <i>P. pastoris</i> GS115 eletrocompetentes.....	80
3.2.10.5	Seleção das colônias transformadas que apresentaram atividade β -glucosidásica.....	80
3.2.11	Efeito do tempo e do meio de cultivo sobre a expressão da β -glucosidase de <i>H. insolens</i> em <i>P. pastoris</i>	81
3.2.12	Purificação por cromatografia de afinidade da β -glucosidase de <i>H. insolens</i> produzida em <i>P. pastoris</i>	82
3.2.13	Dosagem de carboidratos totais.....	82
3.2.14	Temperatura e pH ótimos, estabilidade térmica e ao pH da Bglhi ^{Pp}	83
3.2.15	Expressão e purificação da Bglhi.....	83
3.3	Resultados.....	84
3.3.1	Planejamento da subclonagem do gene <i>bglhi</i> no vetor pT7BsXA.....	84
3.3.2	Subclonagem do gene <i>bglhi</i> no vetor pT7BsXA.....	85
3.3.3	Planejamento da subclonagem do gene <i>bglhi</i> no vetor pPIC9kf1CT.....	88
3.3.4	Mutagênese sítio dirigida por PCR para eliminação do sítio interno de <i>StuI</i> na posição 647 do gene <i>bglhi</i>	89
3.3.5	Mutagênese sítio dirigida por PCR para eliminação do sítio interno de <i>StuI</i> na posição 752 do gene <i>bglhi</i>	91
3.3.6	Amplificação do gene <i>bglhi</i> para inserção dos sítios de restrição <i>SnaBI</i> e <i>AvrII</i> nas posições inicial e final do gene, respectivamente, e clonagem em vetor pPIC9kf1CT.....	95
3.3.7	Efeito do tempo e do meio de cultivo sobre a expressão da Bglhi ^{Pp}	99
3.3.8	Purificação e propriedades moleculares da Bglhi ^{Pp}	100
3.3.9	Análise dos possíveis sítios de glicosilação na sequência codificadora da β -glucosidase de <i>H. insolens</i> e estimativa do teor de carboidratos da Bglhi ^{Pp}	102
3.3.10	Caracterização bioquímica e cinética da Bglhi ^{Pp}	103
3.3.10.1	Efeito da temperatura e do pH sobre a atividade e a estabilidade da Bglhi ^{Pp}	103
3.3.10.2	Especificidade de substrato da Bglhi ^{Pp}	106
3.3.10.3	Determinação dos parâmetros cinéticos para estimulação da Bglhi ^{Pp} por pNP-Glc e celobiose.....	107
3.3.10.4	Efeito de diferentes carboidratos sobre a atividade pNP-glucosidásica da Bglhi ^{Pp}	108
3.3.10.5	Análise cinética da estimulação da atividade pNP-glucosidásica da Bglhi ^{Pp} por glicose e xilose.....	109
3.4	Discussão.....	116
3.5	Conclusões.....	135

CAPÍTULO 4 - RELAÇÃO ESTRUTURA-FUNÇÃO DA B-GLUCOSIDASE DE *H. INSOLENS*: ESTUDOS DE EVOLUÇÃO DIRIGIDA.....136

4.1	Objetivos específicos.....	137
4.2	Material e métodos.....	138
4.2.1	Determinação da atividade pNP-glucosidásica.....	138
4.2.2	Determinação da atividade celobiásica.....	139
4.2.3	Preparo de células de <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS eletrocompetente.....	140
4.2.4	Padronização do epPCR.....	140
4.2.4.1	Utilizando como molde pT7_ <i>bglhi</i>	140
4.2.4.2	Utilizando como molde pET28_ <i>bglhi</i>	142

4.2.5	Digestão enzimática e ligação dos fragmentos de interesse aos vetores pT7BsXA e pET-28a(+)	143
4.2.6	Transformação em células de <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS eletrocompetentes	144
4.2.7	Padronização das técnicas de <i>screening</i> usando o sistema pET28_bglhi	144
4.2.7.1	<i>Screening</i> em meio líquido	144
4.2.7.2	<i>Screening</i> em meio sólido	145
4.2.8	Seleção dos clones capazes de expressar β -glucosidases com percentuais de estimulação da atividade pNP-glucosidásica por glicose diferente do determinado para o controle	145
4.2.8.1	Transformação de uma alíquota da biblioteca	147
4.2.8.2	Seleção de colônias isoladas com auxílio do sistema automatizado K6-2	147
4.2.8.3	Plaqueamento em meio LB sólido seletivo para detecção de atividade β -glucosidásica	148
4.2.8.4	Seleção dos clones expressando enzimas com atividade β -glucosidásica	148
4.2.8.5	Micro-ensaio para detecção de β -glucosidases recombinantes com atividade pNP-glucosidásica com percentual de estimulação por glicose alterado em relação ao controle	148
4.2.8.6	Leitura da atividade pNP-glucosidásica nos micro-ensaios e determinação do fator de estimulação	149
4.2.8.7	Expressão dos clones pré-selecionados em meio líquido para confirmação dos fatores de estimulação	150
4.2.9	Análise das sequências e modelagem das estruturas das β -glucosidases provenientes da biblioteca de diversidade gênica	150
4.2.10	Expressão em <i>E. coli</i> dos clones de interesse para purificação e caracterização bioquímica das enzimas recombinantes	151
4.2.11	Purificação das β -glucosidases modificadas expressas em <i>E. coli</i> por cromatografia de afinidade	151
4.2.12	Determinação da temperatura e pH ótimos de reação das β -glucosidases modificadas	152
4.2.13	Determinação das taxas de hidrólise e transglicosilação usando pNP-Glc como substrato	152
4.2.14	Análise dos produtos de reação de Bglhi e das β -glucosidases modificadas	153
4.2.14.1	Análise dos produtos de reação de Bglhi e das β -glucosidases modificadas por CCD	154
4.2.14.2	Análise dos produtos de reação por MS da Bglhi e das β -glucosidases modificadas	155
4.3	Resultados	156
4.3.1	Padronização do epPCR	156
4.3.2	Mudança de vetor de trabalho e revalidação da biblioteca	158
4.3.3	Padronização das técnicas de <i>screening</i> usando o sistema pET28_bglhi	162
4.3.4	Seleção dos clones capazes de expressar β -glucosidases com percentuais de estimulação da atividade pNP-glucosidásica por glicose diferente do controle	165

4.3.5	Expressão das enzimas dos clones do grupo 1 em meio líquido para confirmação dos fatores de estimulação.....	169
4.3.6	Análise dos sequenciamentos, identificação e localização das mutações presentes nos genes das enzimas modificadas expressas pelos clones dos grupos 1.....	170
4.3.7	Expressão e purificação das β -glucosidases expressas pelos clones 1-9A, 1-7B, 1-1C, 1-1D, 1-6D, 2-10A, 4-12D, 5-7C e 5-7H.....	196
4.3.8	Caracterização bioquímica e cinética da Bglhi e das β -glucosidases produzidas pelos mutantes 1-9A, 1-7B, 1-1C, 1-1D, 1-6D, 2-10A, 4-12D, 5-7C e 5-7H.....	199
4.3.8.1	Efeito da temperatura sobre a atividade pNP-glucosidásica da Bglhi e das enzimas produzidas pelos mutantes 1-9A, 1-7B, 1-1C, 1-1D, 1-6D, 2-10A, 4-12D, 5-7C e 5-7H.....	199
4.3.8.2	Efeito do pH sobre a atividade pNP-glucosidásica da Bglhi e das enzimas produzidas pelos mutantes 1-9A, 1-7B, 1-1C, 1-1D, 1-6D, 2-10A, 4-12D, 5-7C e 5-7H.....	201
4.3.8.3	Determinação dos parâmetros cinéticos para estimulação da atividade pNP-glucosidásica da Bglhi e das enzimas produzidas pelos mutantes 1-9A, 1-7B, 1-1C, 1-1D, 1-6D, 2-10A, 4-12D, 5-7C e 5-7H.....	203
4.3.8.4	Efeito de concentrações crescentes de glicose sobre a atividade pNP-glucosidásica da Bglhi e das enzimas produzidas pelos mutantes 1-9A, 1-7B, 1-1C, 1-1D, 1-6D, 2-10A, 4-12D, 5-7C e 5-7H.....	206
4.3.8.5	Estudo cinético detalhado da estimulação da atividade pNP-glucosidásica da Bglhi por glicose e xilose.....	209
4.3.8.6	Estudo cinético da estimulação da atividade pNP-glucosidásica das enzimas dos mutantes 4-12D, 5-7H, 5-7C e 1-6D por glicose e xilose.....	218
4.3.8.7	Determinação dos parâmetros cinéticos para estimulação da atividade celobiásica da Bglhi e das enzimas dos mutantes 4-12D, 5-7H, 5-7C e 1-6D.....	224
4.3.8.8	Estudo cinético da estimulação da atividade celobiásica da Bglhi e das enzimas dos mutantes 4-12D, 5-7H, 5-7C e 1-6D por xilose.....	227
4.3.8.9	Investigação da atividade de transglicosilação da Bglhi e das enzimas produzidas pelos mutantes 4-12D, 5-7H, 5-7C e 1-6D.....	231
4.3.8.9.1	Utilizando pNP-Glc como substrato.....	231
4.3.8.9.2	Utilizando celobiose como substrato.....	234
4.4	Discussão.....	241
4.5	Conclusões.....	262
REFERÊNCIAS.....		264
APÊNDICE A - Curriculum Vitae.....		291
APÊNDICE B – Artigo “A <i>Neurospora crassa</i> β -glucosidase with potential for lignocellulose hydrolysis shows strong glucose tolerance and stimulation by glucose an xylose”.....		298

Capítulo 1

Introdução

1.1 Celulose

A celulose é o principal componente da parede celular vegetal, representando cerca de 40-50% da sua constituição. Além disso, é a biomassa mais abundante do planeta, representando uma valiosa fonte renovável de carbono que pode ser utilizada na produção de diversos produtos químicos tais como diferentes açúcares, ácidos orgânicos, solventes, tensoativos, adesivos, corantes, produtos farmacêuticos e também o chamado etanol de segunda geração (KENNES et al., 2016; TEUGJAS; VÄLJAMÄE, 2013; YANG, S. et al., 2013; GUSAKOV et al., 2007; REDDY; YANG, 2005). No caso particular da produção de etanol, materiais lignocelulósicos têm sido considerados promissores como matéria prima devido à sua abundância, baixo custo, e enorme disponibilidade potencial, e seu uso pode baratear substancialmente o custo do produto final, além de não competir com o suprimento básico de alimentos (GUPTA et al., 2016; KENNES et al., 2016; SINGHANIA et al., 2013; UJU et al., 2013; CHU et al., 2012; UCHIMA et al., 2011; ARO et al., 2005; LYND et al., 2002; BHAT; BHAT, 1997; SZCZODRAK; FIEDUREK, 1996; RYU; MANDELS, 1980). Por outro lado, além do etanol ser um combustível renovável, seu uso em substituição aos combustíveis fósseis resulta numa menor emissão de CO₂ para a atmosfera (FARRELL et al., 2006).

Quimicamente a celulose consiste de um homopolissacarídeo linear com 9.000-10.000 unidades de D-glicose (IQBAL; KYAZZE; KESHAVARZ, 2013), unidas entre si por ligações O-glicosídicas do tipo β -1,4 (Fig. 1). Sua conformação mais estável é a forma estendida, devido à configuração β das ligações entre as moléculas de glicose, originando cadeias longas e retas. Nestas cadeias, cada resíduo de glicose apresenta uma rotação de 180° em relação aos seus vizinhos. Desta forma, a unidade básica repetitiva da molécula, a celobiose, 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 (KUMAR; SINGH; SINGH, 2008; BÉGUIN; AUBERT, 1994). Diversas cadeias celulósicas, alinhadas lado a lado, originam fibras supramoleculares cristalinas de alta resistência tensional, embora estejam também presentes algumas regiões amorfas (HARRIS; DEBOLT, 2010; KUMAR; SINGH; SINGH, 2008).

Figura 1 - Estrutura química da celulose

Nos vegetais, a celulose é determinante para a arquitetura da parede celular. Moléculas lineares de celulose, paralelas entre si, se unem em feixes formando as microfibrilas. As microfibrilas por sua vez, enrolam-se umas sobre as outras para formar as fibrilas de celulose (Fig. 2). Essas fibrilas, com diferentes tamanhos, formam um sistema entrelaçado, embebido por uma matriz amorfa, formada de polissacarídeos não celulósicos, tais como, hemicelulose, pectinas e ligninas. Esse arranjo é conhecido como “estrutura lignocelulósica”. Na sua forma natural, os materiais lignocelulósicos são recalcitrantes, ou seja, pouco reativos e altamente resistentes à hidrólise (GUPTA et al., 2016; UJU et al., 2013; KUMAR; SINGH; SINGH, 2008; LYND et al., 2002).

Muito embora a hidrólise da celulose possa ser realizada por métodos físico-químicos, o consumo elevado de energia e o uso de reagentes químicos em grande quantidade podem afetar negativamente a viabilidade econômica e a biocompatibilidade do processo (KUMAR; SINGH; SINGH, 2008). Desta forma, existe um interesse crescente no desenvolvimento de processos eficientes de hidrólise enzimática (ou “sacarificação”) da celulose.

Figura 2 - Disposição da celulose na parede celular vegetal

No Brasil, há um grande interesse no aproveitamento de resíduos lignocelulósicos. Os dados da safra 2015/2016 apontam para um processamento de 617,65 milhões de toneladas de cana-de-açúcar na região Centro-Sul do país (UNICA, 2016), e estima-se que para cada tonelada de cana-de-açúcar processada, são gerados cerca de 140 kg de palha e 140 kg de bagaço em base seca (SANTOS, F. A. et al., 2012). Grande parte do bagaço de cana-de-açúcar produzido, principalmente no estado de São Paulo, é queimado para a geração de energia elétrica, enquanto vários outros resíduos representam um problema ambiental, dado o grande volume produzido (GIESE et al., 2013). Como alternativa ao destino atualmente dado aos resíduos lignocelulósicos, estes poderiam ser gerenciados de forma que benefícios interessantes pudessem ser atingidos tanto do ponto de vista ambiental quanto econômico, via hidrólise da celulose a glicose, seguida de fermentação (COLABARDINI et al., 2014; UJU et al., 2013; UCHIMA et al., 2011).

1.2 Sacarificação da celulose

Na natureza, a conversão da celulose a glicose envolve a ação simultânea de enzimas produzidas por uma variedade de microrganismos, como fungos e bactérias, aeróbicos e anaeróbicos, mesófilos e termófilos (BHAT; BHAT, 1997). Alguns microrganismos produzem um conjunto de enzimas capaz de catalisar a degradação da celulose, denominado “sistema enzimático celulolítico” ou “complexo celulolítico” (KARBOUNE; GERAERT; KERMASHA, 2008; WARREN, 1996). No modelo clássico para hidrólise enzimática da celulose, as principais enzimas envolvidas na degradação são as endoglucanases (endo-1,4- β -glucosidases: EG; EC 3.2.1.4), as exoglucanases ou celobiohidrolases (exo-1,4- β -glucosidases; CBH; EC 3.2.1.91) e as β -glucosidases (EC 3.2.1.21). As endoglucanases atuam ao acaso sobre o polímero, sobretudo sobre regiões de baixa cristalinidade, liberando principalmente oligossacarídeos, além de celobiose e glicose. Já as celobiohidrolases atuam nas regiões cristalinas da celulose, clivando as ligações glicosídicas a partir das extremidades da molécula e liberando unidades de glicose e celobiose. As celobiohidrolases são classificadas em CBH1 (atuam nos extremos redutores da molécula) e CBH2 (atuam nos terminais não redutores). Por fim, as β -glucosidases clivam celoligossacarídeos curtos e celobiose a glicose (GUPTA et al., 2016; SINGH; VERMA; KUMAR, 2016; DIMAROGONA; TOPAKAS; CHRISTAKOPOULOS, 2012; HORN et al., 2012; ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006; OGEL et al., 2001; BHAT; BHAT, 1997). Individualmente, as enzimas do complexo celulolítico não são capazes de catalisar uma hidrólise eficiente da celulose, o que requer a ação sinérgica de endo e exoglucanases e β -glucosidases (LYND et al., 2002). A Figura 3 é uma representação esquemática da ação enzimática de cada classe de enzimas.

Figura 3 - Representação esquemática da visão clássica da ação catalítica do complexo celulolítico sobre a celulose

A figura foi adaptada de Perez et al. (2002).

Recentemente, esse modelo clássico foi revisto e a participação de certas oxidases no processo de hidrólise da celulose, denominadas monooxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs), foi demonstrada. Essas enzimas clivam ligações glicosídicas internas das cadeias celulósicas que se encontram empacotadas nas regiões cristalinas, potencializando a ação das celobiohidrolases (FRANDSEN et al., 2016; BEY et al., 2013; SORENSEN et al., 2013; WESTERENG et al., 2013; DIMAROGONA; TOPAKAS; CHRISTAKOPOULOS, 2012). Além dessas enzimas, algumas proteínas sem ação enzimática, tais como a solenina, parecem auxiliar o processo ao promover a desorganização (amorfogênese) do substrato, facilitando o acesso das enzimas às cadeias celulósicas (GUPTA et al., 2016; BUBNER; PLANCK; NIDETZKY, 2013; WILSON, 2012). Uma representação esquemática da ação de todas as enzimas (hidrolíticas e não-hidrolíticas) envolvidas na degradação da celulose pode ser observada na Figura 4:

Figura 4 – Representação esquemática da visão atual da ação de enzimas hidrolíticas e não-hidrolíticas sobre a celulose

EG, endoglucanases; CBH, celobiohidrolase (representando a ação das exoglucanases); CDH, celobiose-desidrogenase; CBM, módulos de ligação a carboidratos; GH61, monooxigenases líticas polissacarídicas; SWO, soleninas. A figura foi adaptada de Horn et al. (2012).

1.3 As β -glucosidases

As β -glucosidases são enzimas que catalisam, em condições fisiológicas, a hidrólise de alquil- e aril- β -glucosídeos, di-glucosídeos e oligossacarídeos curtos. Constituem um grupo altamente heterogêneo de enzimas hidrolíticas (BHATIA; MISHRA; BISARIA, 2002) e o interesse inicial no conhecimento das suas propriedades surgiu na década de 1950, devido ao seu envolvimento na conversão biológica da celulose (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006; LYND et al., 2002).

As β -glucosidases são encontradas em diversos organismos, como bactérias (XU, H. et al., 2011; SESTELO; POZA; VILLA, 2004; PAAVILAINEN; HELLMAN; KORPELA, 1993; KATAYEVA et al., 1992), fungos (MELEIRO et al., 2014; SOUZA et al., 2010; BELANCIC et al., 2003; JÄGER et al., 2001; YUN et al., 2001; RICCIO et al., 1999), plantas (CAMERON et al., 2001; GERARDI et al., 2001; SUE; ISHIHARA; IWAMURA, 2000) e animais (PONTOH; LOW, 2002; HAYS et al., 1998; MARANA; TERRA; FERREIRA, 1995).

Dois sistemas de classificação para as β -glucosidases são descritos na literatura (SINGH; VERMA; KUMAR, 2016; SINGHANIA et al., 2013). O primeiro é baseado na especificidade de substrato da enzima. Nesse sistema as β -glucosidases são divididas em:

1. Aril β -D-glucosidases: apresentam grande afinidade por aril- β -D-glicosídeos
2. Celobiasas: hidrolisam apenas dissacarídeos
3. β -glucosidases de ampla especificidade: hidrolisam uma variedade de substratos diferentes

A grande maioria das β -glucosidases já caracterizadas pertence a essa última categoria (SINGH; VERMA; KUMAR, 2016; SORENSEN et al., 2013; BHATIA; MISHRA; BISARIA, 2002).

Entretanto, a classificação mais aceita atualmente para as β -glucosidases é baseada tanto na similaridade das sequências de nucleotídeos quanto nos padrões de enovelamento das diferentes enzimas, como proposto por Henrissat e Bairoch (1996). De acordo com essa classificação, disponível no banco de dados do CAZy (Carbohydrate Active enZyme, <http://www.cazy.org>, CANTAREL et al., 2009) as glicosil hidrolases (GH) são divididas em 135 famílias, e as β -glucosidases estão reunidas principalmente nas famílias 1 e 3, com representantes também nas famílias 2, 5, 9, 30 e 116 (SINGH; VERMA; KUMAR, 2016; TEUGJAS; VÄLJAMÄE, 2013). Na família 1 estão reunidas, geralmente, β -glucosidases de arqueobactérias, mamíferos e plantas, sendo algumas originárias também de fungos. A estrutura tridimensional de várias enzimas desta família já foi resolvida, revelando um padrão comum de disposição de α -hélices e β -folhas, além da presença de vários aminoácidos altamente conservados nas proximidades do sítio ativo (DE GIUSEPPE et al., 2014; BHATIA; MISHRA; BISARIA, 2002; JENKINS et al., 1995). Já na família 3 estão principalmente β -glucosidases de bactérias, leveduras e fungos (YANG, S. et al., 2013).

As β -glucosidases catalisam o passo limitante de todo o processo celulolítico, uma vez que as endo e exoglucanases são inibidas por celobiose e celoligossacarídeos curtos (SINGH; VERMA; KUMAR, 2016; SINGHANIA et al., 2013). Entretanto, a grande maioria das β -glucosidases conhecidas também é fortemente inibida por glicose (MELEIRO et al., 2014; YUN et al., 2001; GUEGUEN et

al., 1995; HOH; YEOH; TAN, 1992). Desta forma, a busca por β -glucosidases menos sensíveis ao produto é crescente nos últimos anos e algumas dezenas de enzimas tolerantes e/ou estimuladas por glicose já foram relatadas (AKRAM et al., 2016; CHAMOLI et al., 2016; CRESPIM et al., 2016; GAO, G. et al., 2016; GUO; AMANO; NOZAKI, 2016; MATSUZAWA; YAO, 2016a; CAO, L. C. et al., 2015b; COTA et al., 2015; DAS et al., 2015; MELEIRO et al., 2015; RAMANI et al., 2015; RANI et al., 2015; UCHIYAMA et al., 2015, 2013; YANG, F. et al., 2015; BIVER et al., 2014; HUANG et al., 2014; KARA et al., 2014; LI, S. et al., 2014; SOUZA et al., 2014, 2013, 2010; BAFFI et al., 2013; LU et al., 2013; MAI, Z. et al., 2013; RAJASREE et al., 2013; UCHIMA et al., 2013, 2012, 2011; ZHAO et al., 2013; CHEN; LI; ZHONG, 2012; JABBOUR; KLIPPEL; ANTRANIKIAN, 2012; LI, G. et al., 2012; PEI, J. et al., 2012; XU, H. et al., 2011; BENOLIEL et al., 2010; FANG et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2010; SONIA et al., 2008; ZANOELO et al., 2004; BELANCIC et al., 2003; DECKER; VISSER; SCHREIER, 2001; GÜNATTA e VALLIER, 1999; RIOU et al., 1998; YAN; LIN, 1997; BOTHAST, 1996; PÉREZ-PONS; REBORDOSA; QUEROL, 1995; SAHA; WRIGHT et al., 1992).

Paralelamente, outras possibilidades para diminuir o efeito inibitório da celobiose e da glicose sobre a hidrólise da celulose vêm sendo investigadas. Entre estas, destaca-se a realização da fermentação simultaneamente à sacarificação, ocorrendo neste caso a conversão de glicose a etanol ou outros produtos tão logo a primeira seja liberada (TEUGJAS; VÄLJAMÄE, 2013; CHANDRA et al., 2009; LEITE et al., 2008; SAHA; COTTA, 2008; CARDONA; SÁNCHEZ, 2007). A grande desvantagem desse processo é a diferença nas condições ideais para hidrólise enzimática da celulose, geralmente 50 °C, e a fermentação realizada por leveduras, geralmente 35 °C (TEUGJAS; VÄLJAMÄE, 2013).

Outra estratégia para contornar o efeito inibitório dos produtos de reação e aumentar a eficiência da sacarificação da celulose é o emprego de coquetéis enzimáticos com excesso de atividade β -glucosidásica em mistura com celulasas. Entretanto, embora interessante, esta possibilidade tem sido limitada até o momento pelo alto custo de produção dessas enzimas (GAO, D. et al., 2011; BANERJEE et al., 2010; QING; YANG; WYMAN, 2010; GUSAKOV et al., 2007; LYND et al., 2002).

Estima-se que uma redução de 50% na carga enzimática empregada no processo levaria a uma diminuição de cerca de 18-20% no preço final do etanol (CORRÊA; SANTOS; PEREIRA, 2016). Em consequência, também há grande interesse atualmente na identificação de microrganismos bons produtores de enzimas celulolíticas, capazes de crescer em substratos baratos e abundantes (ZIMBARDI et al., 2013), e ainda na produção de β -glucosidases e celulasas em geral em sistemas heterólogos, em grandes quantidades e com menor custo (VAN OUYEN et al., 2006). Assim, várias β -glucosidases bacterianas tiveram suas regiões codificadoras clonadas e expressas recentemente em *Escherichia coli* (SINGHANIA et al., 2013; JENG et al., 2011; KORI; HOFMANN; PATEL, 2011; XU, H. et al., 2011). Similarmente, várias β -glucosidases fúngicas também foram expressas com sucesso e alto rendimento em diferentes sistemas heterólogos, como *Aspergillus oryzae* (KROGH et al., 2010), *Trichoderma reesei* (WANG; XIA, 2011), *Saccharomyces cerevisiae* (BENOLIEL et al., 2010), *Pichia pastoris* (RAMANI et al., 2015; JI; CHA, 2010; HARNPICHARNCHAI et al., 2009) e até mesmo em *E. coli* (MELEIRO et al., 2015; SOUZA et al., 2014; JENG et al., 2011; TSUKADA et al., 2006; SALOHEIMO et al., 2002).

1.4 O fungo *Humicola insolens* e suas β -glucosidases

O fungo filamentoso *H. insolens* é um organismo eucarioto, pertencente à subdivisão *Deuteromycotina*, Classe *Hyphomycetes*, Ordem *Bactridiales*, e Família *Sepedoniaceae*. Trata-se de um fungo termófilo, ou seja, cresce bem em temperaturas mais altas, mas não cresce abaixo de 20 °C. Sua velocidade máxima de crescimento está entre 35-40 °C, enquanto as temperaturas mínima e máxima em que foi observado crescimento foram de 23 e 55 °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 serem preservadas de uma possível inativação térmica em operações de transporte e/ou manuseio (XIA et al., 2016; SOUZA, 2009). Além disso, essas enzimas podem ser utilizadas em processos que requeiram temperaturas elevadas.

Humicola insolens é reconhecido por ser um excelente produtor de celulasas e hemicelulasas para aplicações industriais, incluindo pelo menos duas celobiohidrolases, sete endoglucanases, três β -glucosidases, cinco xilanases e três xilosidases (XIA et al., 2016; XU, X. et al., 2016; MACKENZIE et al., 1998). A linhagem de *H. insolens*, fonte para obtenção da enzima estudada nesse trabalho, foi isolada de fezes de lhama do Bosque Municipal de Ribeirão Preto, SP, e identificada por comparação da morfologia do conidióforo conforme descrito, e recomendado por Cooney e Emerson (1964).

Em nosso grupo de pesquisa, duas β -glucosidases produzidas por esse fungo foram purificadas e tiveram suas propriedades bioquímicas e cinéticas estudadas. Uma delas, pertencente à família 3 das GHs, apresentou características muito interessantes para aplicação na hidrólise de papéis de descarte, como boa termoestabilidade, alta eficiência catalítica e tolerância a muitos íons metálicos, incluindo Fe^{3+} , Cr^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} e Ni^{2+} , mantendo ainda cerca de 60% da atividade controle em presença de Pb^{2+} , Hg^{2+} ou Cu^{2+} (MELEIRO et al., 2014). A outra, pertencente à família 1 das GHs, apresentou uma característica ainda mais interessante de ser estimulada por glicose ou xilose em concentrações de até 400 mmol L⁻¹, com um efeito estimulatório máximo (cerca de 2 vezes) em torno de 50 mmol L⁻¹ (SOUZA et al., 2010). Estudos de caracterização bioquímica, biofísica e cinética permitiram propor um modelo cinético para o mecanismo molecular da sua estimulação por glicose e xilose utilizando o substrato sintético *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (*p*NP-Glc). Segundo o modelo, a enzima possuiria um sítio catalítico (SC) e um ou mais sítios moduladores (SM) e a ligação de glicose/xilose em concentração estimulatória a SM induziria mudanças conformacionais que aumentariam a atividade catalítica no SC. Glicose e xilose competiriam entre si pela ligação a SM e com o substrato pela ligação a SC; já o substrato competiria com os monossacarídeos pela ligação a SM. Dessa forma, a modulação da atividade da enzima por glicose/xilose resultaria de interações alostéricas entre SM e SC (SOUZA et al., 2013).

Dadas as propriedades interessantes, o gene que codifica para esta enzima (*bglhi*) foi clonado e a enzima (Bglhi) foi expressa em *E. coli* na forma solúvel. A enzima

recombinante manteve a estimulação por glicose/xilose, a alta tolerância aos monossacarídeos e a alta eficiência catalítica para a hidrólise de celobiose (SOUZA et al., 2014). Além disso, o gene *bglhi* apresentou 100% de similaridade com o gene para uma das β -glucosidases expressa por *Humicola grisea* var. *thermoidea* (BGL4) e embora já tenha sido clonado em *A. oryzae* (BGL4^{AO}, TAKASHIMA et al., 1999) e *S. cerevisiae* (BGL4^{SC}, BENOLIEL et al., 2010), as enzimas heterólogas apresentaram comportamentos totalmente distintos, principalmente no que diz respeito à termoestabilidade e estimulação/tolerância à glicose e xilose. Essa última característica não foi avaliada para BGL4^{AO} (TAKASHIMA et al., 1999) e BGL4^{SC} (BENOLIEL et al., 2010) mostrou apenas uma moderada tolerância à glicose. Neste trabalho nomearemos a enzima nativa de *H. insolens* de Bglhi^N (SOUZA et al., 2010) para diferenciá-la da enzima recombinante (Bglhi, SOUZA et al., 2014) e das outras formas expressas em outros sistemas de expressão (BENOLIEL et al., 2010; TAKASHIMA et al., 1999).

Em continuação aos trabalhos iniciados pelo nosso grupo, Bglhi foi cristalizada e teve sua estrutura resolvida o que facilitou o desenvolvimento desse projeto. (DE GIUSEPPE et al., 2014).

1.5 Mecanismos de reação das GHs

A hidrólise enzimática das ligações glicosídicas realizada pelas GHs pode ocorrer via dois mecanismos principais conhecidos como mecanismo de retenção ou de inversão (Fig. 5), propostos inicialmente por Koshland (1953), nos quais haverá retenção ou inversão da configuração do carbono anomérico, respectivamente. De maneira geral, todas as enzimas de uma mesma família apresentam o mesmo mecanismo de reação. Algumas exceções são observadas nas famílias GH23, GH83 e GH97 que podem conter enzimas que realizam a hidrólise das ligações glicosídicas por um dos dois mecanismos. A clivagem da ligação glicosídica ocorre entre os subsítios do sítio ativo denominados de -1 (sítio da glicona) e +1 (sítio da aglicona) (CAIRNS; ESEN, 2010).

A maioria das β -glucosidases caracterizadas até o momento seguem o mecanismo de retenção, incluindo todas as GH1 (Fig. 5B e Fig. 6). Dois resíduos de glutamatos são responsáveis pela catálise e são conservados em todas as β -glucosidases relatadas. Um deles atua como nucleófilo (conservado no motivo “I/VTENG” dessas enzimas) e o segundo resíduo age ora como ácido, ora como base, dependendo da etapa da reação (conservado no motivo “TFNEP”) (DAVIES; HENRISSAT, 1995). Os dois glutamatos estão relativamente próximos uns dos outros no sítio ativo dessas enzimas, cerca de 5,5 Å (para as enzimas que utilizam o mecanismo de inversão essa distância é maior, aproximadamente 9,5 Å, devido a necessidade de acomodar simultaneamente no sítio ativo tanto o substrato como a água para que a reação ocorra) (SINGH; VERMA; KUMAR, 2016; CERQUEIRA et al., 2012; CAIRNS; ESEN, 2010; WHITE, ROSE, 1997).

Figura 5 – Mecanismos de hidrólise das ligações glicosídicas pelas GHs

A figura foi adaptada de Cairns e Esen, 2010.

O mecanismo de retenção ocorre em duas etapas, uma conhecida como glicosilação e a outra como deglicosilação (Fig. 6). Na etapa de glicosilação, o glicosídeo liga-se ao subsítio -1 da enzima e adota uma conformação do tipo “barco torcido”, segundo alguns autores (ZECHEL; WHITHERS, 2000). Em seguida, o carboxilato do resíduo de glutamato que age como ácido/base doa um próton ao oxigênio da ligação glicosídica que será clivada (Fig. 6, etapa ①) para liberação do grupo de partida (O grupo de partida depende do substrato utilizado pela enzima, no caso de um substrato sintético como o *p*NP-Glc, nessa etapa da reação ocorre a liberação do grupo *p*-nitrophenol; caso o substrato seja a celobiose, ocorre a liberação da primeira molécula de glicose). Com a clivagem desta ligação é formado um estado de transição com uma carga formal positiva no carbono anomérico e um caráter semelhante a um íon oxocarbenium. Nesse momento, a porção glicona do substrato adota uma conformação do tipo “meia- cadeira” (Fig. 5). A aproximação desta espécie iônica ao outro resíduo de glutamato nucleofílico leva a formação de um intermediário covalente que apresenta uma configuração invertida no carbono anomérico (tipo α), denominado glicosil-enzima (Fig. 5 e Fig. 6B). Na segunda etapa (deglicosilação), o intermediário anteriormente formado pode ser hidrolisado por uma molécula de água (Fig. 6C), com o resíduo de glutamato agindo agora como base e desprotonando a molécula de água nucleofílica, reestabelecendo a configuração do tipo β no carbono anomérico no produto (SINGH; VERMA; KUMAR, 2016; CERQUEIRA et al., 2012). Essa etapa também passa por um estado de transição (Fig. 5) semelhante a um íon oxocarbenium (CAIRNS; ESEN, 2010). A formação do intermediário covalente (glicosil-enzima) foi primeiramente demonstrado para a β -glucosidase da família 1 de *Agrobacterium* sp. (WITHERS et al. 1990, 1987).

Figura 6 – Mecanismos de hidrólise e transglicosilação pelas GHs que seguem o mecanismo de retenção

Em condições adequadas, algumas β -glucosidases que seguem o mecanismo de retenção, podem utilizar outro aceptor do grupo glicosídico (ao invés da água) e promover a formação de ligações glicosídicas, por um mecanismo cineticamente controlado conhecido como transglicosilação (Fig. 6D). A etapa de glicosilação é idêntica à descrita anteriormente e na segunda etapa, de deglicosilação, o ataque nucleofílico anteriormente realizado pela molécula de água ao intermediário glicosil-enzima, ocorre por um outro nucleófilo, que pode ser um monossacarídeo, dissacarídeo, aril-, amino-, alquil- ou monoterpene álcool (FRUTUOSO; MARANA, 2013; SINGHANIA et al., 2013; CERQUEIRA et al., 2012; PERUGINO et al., 2004).

1.6 Engenharia de proteínas

A indústria de enzimas floresceu nas décadas de 1980-1990 com a entrada em cena das enzimas microbianas (CRAMERI et al., 1998; STEMMER, 1994). O mercado mundial de enzimas foi de quase US\$ 4,5 bilhões em 2012 e US\$ 4,8 bilhões em 2013, projetado para chegar a US\$ 7,1 bilhões em 2018 (BCC Research, 2014). No que diz respeito as enzimas utilizadas para produção de biocombustíveis, a receita global totalizou US\$ 623,0 milhões em 2014 e US\$ 652,1 milhões em 2015, podendo atingir cerca de US\$ 1 bilhão em 2020 (BCC Research, 2015). No entanto, as enzimas microbianas nativas muitas vezes não são adequadas para aplicações em grande escala e suas propriedades precisam ser melhoradas, não só no que diz respeito a estereosseletividade e quimiosseletividade como também a aspectos relacionados ao processo a que se destinam, incluindo estabilidade em determinadas condições de temperatura e pH, além de boa atividade em presença de altas concentrações de substrato ou produto, etc (RIBEIRO; RIBEIRO, 2013; BOTTCHE; BORNSCHEUER, 2010). Além disso, as enzimas nativas são produzidas em pequenas quantidades, dificultando as aplicações industriais.

Nesse contexto, a engenharia de proteínas tem se revelado uma ferramenta fundamental para o desenvolvimento biotecnológico, permitindo obter enzimas com estruturas modificadas que apresentam características mais adequadas para o

desempenho de papéis específicos em diferentes processos industriais (BOTTCHEER; BORNSCHEUER, 2010; ARRIZUBIETA; POLAINA, 2000). Assim, várias enzimas com propriedades superiores foram obtidas nos últimos anos e, muitas vezes, mudanças únicas na sequência de aminoácidos resultaram em alterações no pH ótimo, termoestabilidade, inibição por *feedback*, especificidade de substrato, velocidade máxima, afinidade aparente pelo substrato e constantes de inibição para diferentes inibidores (LE et al., 2013; JOHANNES; ZHAO, 2006; ARNOLD, 1998; KUCHNER; ARNOLD, 1997). Como resultado, já na década de 1990 muitas enzimas recombinantes melhoradas foram produzidas, e em 1993 mais de 50% do mercado de enzimas industriais foi suprido por enzimas produzidas por processos recombinantes (HODGSON, 1994).

Por outro lado, a engenharia de proteínas também é uma ferramenta potente para o entendimento da relação estrutura-função de proteínas em geral e, no caso das enzimas, permite a identificação dos determinantes estruturais das suas características cinéticas interessantes para aplicação num determinado processo (JEOH et al., 2008; ARNOLD; GEORGIU, 2003; ARRIZUBIETA; POLAINA, 2000).

A evolução dirigida é uma das técnicas mais utilizadas em estudos de engenharia de proteínas, e baseia-se na geração de uma biblioteca de diversidade gênica, seguida da seleção dos clones com fenótipo de interesse (RIBEIRO; RIBEIRO, 2013; LIAO et al., 2012; PEI, X. Q. et al., 2011; LIN et al., 2009; ARNOLD; GEORGIU, 2003; ARRIZUBIETA; POLAINA, 2000). Trata-se de uma série de experimentos que reproduzem, de forma acelerada e *in vitro*, a evolução da diversidade natural e adaptação ambiental. Mutações e recombinações são feitas dando ao processo uma direção no sentido de atingir a otimização de uma propriedade específica. O parâmetro chave desta metodologia é a geração de um conjunto adequado de mutações, que pode ser obtido tipicamente por duas técnicas principais: mutagênese aleatória por PCR (epPCR: *error-prone* PCR) ou métodos de embaralhamento de DNA (DNA *shuffling*) (PORTER; RUSLI; OLLIS, 2016; LIAO et al., 2012; PATTEN et al., 1997). Essas técnicas representaram um grande avanço, contribuindo para a obtenção de várias enzimas com propriedades melhoradas (HU, 2016; JIANG et al., 2016; SHIVANGE; ROCCATANO; SCHWANEBERG, 2016; CAO,

L. C. et al., 2015a; CHENG; GAO; CHENG et al., 2015; TROLLOPE; GOERGENSE; VOLSCHEK, 2015; ZHOU; XUE; MA, 2015; LE et al., 2013; ARNOLD; GEORGIU, 2003; HAYASHI et al., 2001; ARRIZUBIETA; POLAINA, 2000; CRAMERI et al., 1998; STEMMER, 1994).

Considerando as enzimas envolvidas na degradação de celulose, estudos empregando técnicas de evolução dirigida já foram relatados para as endoglucanases de *T. reesei* (AKCAPINAR et al., 2015; CHOKHAWALA et al., 2015; NAKAZAWA et al., 2009), *Chaetomium thermophilum* (WANG et al., 2012) *Thermotoga maritima* (ZHANG et al., 2015; SHI et al., 2014), *Bacillus subtilis* (LIN et al., 2009) e a CelDZ1, uma endoglucanase identificada por análises de bioinformática do genoma obtido de culturas isoladas a partir de material coletado de águas quentes da Islândia (ZARAFETA et al., 2016). Algumas β -glucosidases bacterianas (BATRA; MISHRA, 2013; HARDIMAN et al., 2010; PEI, X. Q. et al., 2011; ARRIZUBIETA; GONZALEZ-BLASCO et al., 2000; POLAINA, 2000), fúngicas (LARUE; MELGAR; MARTIN, 2016) e proveniente de biblioteca metagenômica (CAO, L. C. et al., 2015b) também tiveram suas características melhoradas utilizando técnicas de evolução dirigida.

1.7 A técnica de epPCR

A metodologia de PCR mutagênico ou *error-prone* PCR consiste de uma modificação do protocolo original da técnica de PCR (JAEGER; REETZ, 2000) e foi descrita inicialmente por Leung et al. (1985) e subsequentemente aperfeiçoada por Cadwell e Joyce (1992). O método é simples, eficiente e restrito à região gênica de interesse, baseando-se no aumento da razão de mutações adicionadas pela DNA polimerase termoestável de *Thermus aquaticus* (Taq polimerase), ou seja, reduzindo-se a fidelidade da enzima (LE et al., 2013; RIBEIRO; RIBEIRO, 2013).

A Taq DNA polimerase padrão, usada nas reações convencionais de PCR, possui uma razão de erro por mutação normalmente baixa, para os experimentos de

mutagênese dirigida. Por exemplo, enzimas com subunidades corretoras como a TaqPfuI apresentam uma razão de mutação que pode oscilar entre 10^{-6} e 10^{-7} , enquanto enzimas que não apresentam as subunidades corretoras (como a TaqDNA polimerase) apresentam uma razão de erro de 10^{-4} a 10^{-5} (Fig. 7). Esta razão, entretanto, pode ser significativamente aumentada pela modificação de um ou mais componentes do meio reacional (alteração da concentração do cofator magnésio, substituição parcial de Mg^{2+} por Mn^{2+} , otimização da concentração de dNTP em proporções desbalanceadas, etc.), bem como por variações no número de ciclos da PCR. Assim, foi idealizada uma reação de mutagênese alterando proporcionalmente os seus componentes, de forma a permitir a modulação e o aumento da razão de mutações adicionadas pela Taq, favorecendo o aumento da diversidade gênica e permitindo assim a realização de experimentos de mutagênese aleatória e evolução dirigida (PORTER; RUSLI; OLLIS, 2016; PACKER; LIU, 2015; MCCULLUM et al., 2010).

Figura 7 - Representação esquemática do aumento da razão de erro por mutação, empregando a técnica de epPCR

1.8 Sistemas de expressão de enzimas heterólogas

A expressão de proteínas heterólogas em microrganismos utilizando recombinação gênica ainda é o ponto mais alto no desenvolvimento e exploração da biotecnologia moderna. Proteínas ativas podem ser produzidas rapidamente a partir de meios de cultura relativamente baratos quando comparados aos clássicos e demorados métodos de produção, extração e purificação de proteínas.

Os sistemas de células hospedeiras para a expressão de genes heterólogos podem ser organismos procariotos ou eucariotos, sendo que ambos têm vantagens e desvantagens inerentes. Para a escolha do melhor sistema de expressão, fatores como a produtividade, a atividade, a finalidade e as características físico-químicas da proteína de interesse devem ser levados em consideração, bem como o custo, a comodidade e a segurança do próprio sistema (LIU, L. et al., 2013; YIN et al., 2007).

A arte da produção de proteínas heterólogas está baseada em “regras empíricas” (MAKRIDES, 1996), ou seja, não existe protocolo padrão para clonagem, expressão e purificação dessas proteínas. Assim, há a necessidade de ajustar metodologias existentes no intuito de otimizar o nível de síntese por meio de variações de diferentes parâmetros de cultura, indução e estabilização dos produtos (BUSTAMANTE FILHO, 2010; SWARTZ, 2001).

Atualmente, diversos sistemas de expressão são utilizados, incluindo os sistemas procariotos (*E. coli* e *B. subtilis*) e eucariotos (leveduras, fungos filamentosos, entre outros) (LIU, L. et al., 2013). As vantagens e desvantagens de alguns desses sistemas estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1: As principais características de alguns sistemas de expressão de enzimas heterólogas comumente usados

Sistema hospedeiro	Vantagens	Desvantagens	Aplicações mais comuns
<i>E. coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Níveis elevados de expressão - Condições simples de cultivo - Crescimento rápido - Protocolos simples de transformação - Muitos parâmetros podem ser alterados para otimizar a expressão 	<ul style="list-style-type: none"> - Formação ineficiente de pontes dissulfeto (algumas cepas como Origami podem minimizar esse problema) - Formação de corpos de inclusão - Enovelamento ineficiente de proteínas - Protocolos de reenovelamento demorados e ineficientes - Endotoxinas - Modificações pós-traducionais mínimas - Ausência de códons raros presente em eucariotos (algumas cepas como Rosetta e CodonPlus podem minimizar esse problema) 	<ul style="list-style-type: none"> - Proteínas purificadas (estrutura, enzimologia, descoberta de fármacos) - Proteínas terapêuticas
<i>S. cerevisiae</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Bons níveis de expressão - Baixo custo - Condições simples de cultivo - Capaz de executar a maioria das modificações pós-traducionais eucarióticas - Enovelamento eficiente de proteínas - Livre de endotoxinas 	<ul style="list-style-type: none"> - Menores níveis de expressão e secreção quando comparada a <i>P. pastoris</i> - Tendência a produzir proteínas hiperglicosiladas - Estruturas de N-glicano consideradas alergênicas 	<ul style="list-style-type: none"> - Proteínas purificadas (estrutura, enzimologia, descoberta de fármacos) - Proteínas terapêuticas

Tabela 1: As principais características de alguns sistemas de expressão de enzimas heterólogas comumente usados

(continuação)

Sistema hospedeiro	Vantagens	Desvantagens	Aplicações mais comuns
<i>P. pastoris</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Secreção eficiente de proteínas - Permite purificação simples - Extensa modificação pós-traducional - Enovelamento eficiente de proteínas - N-glicosilação mais parecida com eucariotos superiores quando comparada à de <i>S. cerevisiae</i> - Livre de endotoxinas 	<ul style="list-style-type: none"> - O uso do metanol como indutor é perigoso em grande escala - O padrão de glicosilação ainda é diferente quando comparado à glicosilação presente em células de mamíferos 	<ul style="list-style-type: none"> - Proteínas purificadas (estrutura, enzimologia, descoberta de fármacos)
Células animais	<ul style="list-style-type: none"> - Bons níveis de expressão - Células adaptadas para facilitar o aumento de escala - Enovelamento eficiente de proteínas - Bom para proteínas secretadas - Todas as modificações pós-traducionais - Livre de endotoxinas 	<ul style="list-style-type: none"> - Meios de cultura caros 	<ul style="list-style-type: none"> - Proteínas purificadas (estrutura, enzimologia, descoberta de fármacos) - Proteínas terapêuticas - Estudos baseados em células

Tabela 1: As principais características de alguns sistemas de expressão de enzimas heterólogas comumente usados

(conclusão)			
Sistema hospedeiro	Vantagens	Desvantagens	Aplicações mais comuns
Células de insetos infectadas com baculovírus	<ul style="list-style-type: none"> - Bons níveis de expressão (especialmente para proteínas intracelulares) - Crescimento relativamente rápido - Enovelamento de proteínas eficiente - Extensa modificação pós-traducional de proteínas - A glicosilação é mais parecida com a de células de mamífero - Proteínas podem ser facilmente deglicosiladas enzimaticamente (bom para o estudo da estrutura) - Livre de endotoxinas 	<ul style="list-style-type: none"> - Meios de cultura caros - Grandes volumes de vírus necessários para o aumento de escala - A glicosilação ainda difere daquela das células de mamíferos - A infecção viral conduz à lise das células e potencial degradação das proteínas expressas 	<ul style="list-style-type: none"> - Proteínas purificadas (estrutura, enzimologia, descoberta de fármacos)

Tabela adaptada de Broadway (2012).

O nosso trabalho é um ótimo exemplo de que o mesmo gene (*bglhi*) expresso em diferentes sistemas de expressão, resulta em proteínas com características totalmente distintas. As diferenças encontradas nas β -glucosidases quando expressas em *E. coli* (SOUZA et al., 2014), *A. oryzae* (TAKASHIMA et al., 1999) ou em *S. cerevisiae* (BENOLIEL et al., 2010) podem ser atribuídas principalmente as modificações pós traducionais. Quando *bglhi* foi clonado e Bglhi foi expressa em hospedeiro eucarioto, a proteína foi produzida supostamente com mínimas (ou nenhuma) modificações pós traducionais, enquanto que o hospedeiro *S. cerevisiae*, por exemplo, produz enzimas com tendência à hiperglicosilação.

Neste projeto de doutorado, utilizamos um outro sistema de expressão, *P. pastoris*, um sistema que também realiza modificações pós-traducionais, para expressão da β -glucosidase de *H. insolens*. Maiores detalhes dos sistemas de expressão utilizados em nosso grupo de pesquisa (*E. coli* e *P. pastoris*) são descritos abaixo.

1.8.1 *Escherichia coli*: um típico sistema de expressão procariótico

A bactéria *E. coli* foi o primeiro organismo utilizado como célula hospedeira e é frequentemente a primeira escolha para a produção de proteínas recombinantes e engenharia metabólica. O marco na engenharia genética foi a expressão em *E. coli* da somatostatina (um hormônio proteico de mamíferos) realizada por Itakura et al. (1977). Trata-se da primeira expressão *in vitro* de um gene “estranho” em células procariotas. O valor em dólares da substância bioativa heteróloga foi semelhante à da proteína extraída de 500000 cérebros de ovelhas (YIN et al., 2007).

Até o momento, a *E. coli* tem sido amplamente utilizada como o anfitrião celular para a expressão de proteínas heterólogas devido à sua alta taxa de crescimento, alta velocidade de produção de proteínas, capacidade de fermentação contínua e baixo custo. Devido ao extenso conhecimento fisiológico e genético dessas bactérias,

inúmeras linhagens geneticamente modificadas foram desenvolvidas, para diferentes condições de expressão.

Além disso, inúmeros vetores comerciais foram desenvolvidos para essa finalidade (BUSTAMANTE FILHO, 2010; MAKRIDES, 1996). O promotor gênico T7, derivado de bacteriófagos lambda T7 e presente no sistema de expressão pET (Novagen®, Madison, WI, USA) vem sendo amplamente utilizado na preparação de proteínas recombinantes: em 2003 o sistema pET foi usado em mais de 90% dos protocolos de preparação. Os promotores comumente empregados para a expressão heteróloga de proteínas exigem a adição de uma molécula indutora, o esgotamento ou a adição de um nutriente ou, ainda, a mudança de um fator físico ou físico-químico como o pH ou a temperatura. O isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) é um forte indutor de genes sob o controle do promotor lac (ZELENA; EISELE; BERGER, 2014; YIN et al., 2007; JANA; DEB, 2005).

Há algumas desvantagens no uso da *E. coli* como sistema de expressão (citadas na Tabela 1). Dentre elas, destaca-se a inabilidade da bactéria em realizar modificações pós-traducionais (por exemplo, N-glicosilação, O-glicosilação, fosforilação, etc), a ausência de um mecanismo de secreção da proteína alvo para o meio de cultura e a limitada habilidade de promover a formação de pontes dissulfeto (SAHDEV; KHATTAR; SAINI, 2008; BALBAS, 2001; MAKRIDES, 1996). Obviamente, essas modificações podem afetar a atividade, a função, a estrutura, a solubilidade, a estabilidade e a resistência à proteólise, bem como a compartimentalização das proteínas funcionais (LINSKENS et al., 1999; JUNG; WILLIAMS, 1997). Todavia, diversas estratégias já foram desenvolvidas para contornar estes problemas, resultando na síntese de inúmeras proteínas recombinantes biologicamente ativas por certas linhagens de *E. coli*. (NICOLINI et al., 2013; FERNANDEZ-FUEYO et al., 2012; BUSTAMANTE FILHO, 2010; ISHIHARA et al., 2005; LEFEBVRE; BOILEAU; MANJUNATH, 2009; MAKRIDES, 1996; KIM; RAINES, 1993).

1.8.2 *Pichia pastoris*: um exemplo de expressão eucariótico

Pichia pastoris é uma levedura e, como todo eucarioto, é capaz de realizar modificações pós traducionais. Portanto, é considerada um sistema excelente para a expressão de proteínas procarióticas e eucarióticas de forma heteróloga (MACAULEY-PATRICK et al., 2005). A levedura *P. pastoris* é metilotrófica, ou seja, capaz de crescer em meio contendo metanol como única fonte de carbono. Isso ocorre graças à hiperexpressão de enzimas envolvidas no metabolismo de metanol quando as células são cultivadas na presença deste composto (CEREGHINO; CREGG, 2000). A enzima álcool oxidase (AOX) peroxissomal catalisa o primeiro passo da via de utilização do metanol (EGLI et al., 1980). Apesar de ser codificada por dois genes, *aox1* e *aox2*, a isoforma AOX1 da enzima é a mais abundante dentro da célula (CREGG et al., 1989). Dessa forma, o promotor da isoforma AOX1 é o escolhido pela maioria dos pesquisadores para a expressão em *P. pastoris*, permitindo um rígido controle da expressão com a simples manipulação do meio de expressão. No entanto, este promotor pode não ser adequado em determinadas aplicações industriais. Por exemplo, não é adequada a utilização de metanol para a indução de genes na indústria de alimentos, devido à sua toxicidade. O promotor constitutivo do gene da GAP (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) tem sido uma alternativa para contornar essa limitação e já é empregado com sucesso para a expressão gênica em *P. pastoris* (CAO, Y. et al., 2007; DENG et al., 2006; LEE; WONG; ROBERTSON, 2005). Entretanto há relatos de que a expressão constitutiva de proteínas heterólogas por essa levedura tem efeitos citotóxicos (MENÉNDEZ et al., 2004).

A expressão de proteínas por *P. pastoris* é uma alternativa útil quando se visa uma expressão em escala industrial (BERRIN et al., 2000; CEREGHINO; CREGG, 1999) e apresenta várias vantagens sobre a expressão em *S. cerevisiae* ou *E. coli*. Entre estas vantagens, incluem-se alta eficiência de secreção, altas densidades celulares em meios de cultura de baixo custo e enovelamento correto das proteínas (DALY; HEARN, 2005). Além disso, *P. pastoris* produz altos níveis de proteína recombinante, com baixa secreção de proteínas endógenas, há disponibilidade de promotores fortes e regulados (GELLISSEN, 2000; TSAI; HUANG, 2008) e a integração do gene a ser expresso ao cromossomo da levedura confere ao gene de

interesse grande estabilidade mesmo sem pressão seletiva em fermentadores (CLARE et al., 1991).

Várias β -glucosidases já foram expressas em *P. pastoris* em altos níveis (YANG, S. et al., 2013; LIU, D. et al., 2012; UCHIMA et al., 2012; CHEN et al., 2011; MAI; THANH, 2010; HONG; TAMAKI; KUMAGAI, 2007; KAWAI et al., 2003).

Capítulo 2

Objetivos gerais

Este trabalho de doutorado teve dois objetivos principais:

1. O estudo do efeito da glicosilação sobre as características bioquímicas e cinéticas da β -glucosidase de *H. insolens*, comparando a enzima nativa e as enzimas recombinantes expressas em *E. coli* e *P. pastoris* (**Capítulo 3**).
2. O estudo da relação estrutura-função da β -glucosidase estimulada por glicose e xilose de *H. insolens* por meio de técnicas de evolução dirigida, visando ao conhecimento dos determinantes estruturais desta estimulação (**Capítulo 4**).

Capítulo 3

**A β -glucosidase de *H. insolens* expressa em
P. pastoris: o efeito da glicosilação sobre as
propriedades bioquímicas e cinéticas da
enzima**

3.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste capítulo foram:

- Subclonagem do gene codificador para a β -glucosidase de *H. insolens* (*bglhi*) em vetor pT7BsXA.
- Mutagênese sítio-dirigida para eliminação de dois sítios internos da enzima *Stul*.
- Subclonagem do gene *bglhi* em vetor pPIC9kf1CT, expressão heteróloga em *P. pastoris*, purificação e caracterização bioquímica e cinética da β -glucosidase de *H. insolens*, comparando-a com a enzima nativa e a enzima recombinante expressa em *E. coli*.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Dosagens de proteínas

As concentrações de proteínas foram determinadas empregando o método descrito por Read e Northcote (1981), usando soralbumina bovina (BSA, Sigma-Aldrich Chem. Co., St. Louis, MO, USA) como padrão.

3.2.2 Determinação da atividade aril β -glucosidásica

A atividade *p*NP-glucosidásica foi determinada descontinuamente e definida como a taxa de liberação do íon *p*-nitrofenolato (pNP^- , $\epsilon_{410nm, pH\ 12} = 17500\ mol^{-1}\ L\ cm^{-1}$) a partir do substrato sintético *p*NP-Glc (Sigma-Aldrich Chem. Co.). As condições padrão dos ensaios foram 50 °C, tampão Bis-Tris 50 mmol L⁻¹, pH 6,0, contendo *p*NP-Glc 2 mmol L⁻¹ num volume final de 0,6 mL. A reação sempre foi iniciada pela adição de 50 μ L da enzima convenientemente diluída ao meio reacional e interrompida pela adição de 1 mL de tetraborato de sódio saturado, em intervalos de tempo adequados. Controles sem adição de enzima foram incluídos com a finalidade de avaliar a hidrólise espontânea do substrato nas condições dos ensaios. As condições experimentais (tempos de reação, número de unidades de atividade) empregadas em todos os experimentos foram ajustadas para garantir a estimativa de velocidades iniciais (resposta linear de formação de produto com o tempo e hidrólise inferior a 5% do substrato inicial). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de *p*-nitrophenol por minuto. A atividade específica foi definida como a relação entre o número de unidades e a massa de proteína, em miligramas, presentes no meio de reação (U mg⁻¹).

A atividade sobre os substratos sintéticos *p*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (*p*NP-Gal, Sigma-Aldrich Chem. Co.) e *p*-nitrofenil- β -D-xilanopiranosídeo (*p*NP-Xil, Sigma-Aldrich Chem. Co.) também foi estimada a partir da dosagem do íon *p*NP- ($\epsilon_{410\text{nm}}$, pH 12 = $17500 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$), nas mesmas condições descritas acima.

Quaisquer modificações das condições padrão mencionadas acima estão descritas nas legendas das figuras e tabelas.

3.2.3 Determinação da atividade sobre outros substratos

A atividade celobiásica foi definida como a taxa de liberação de glicose livre a partir do substrato natural celobiose (Sigma-Aldrich Chem. Co.). As condições padrão dos ensaios foram 50 °C, tampão Bis-Tris 50 mmol L⁻¹, pH 6,0, contendo o substrato em concentração final 5 mmol L⁻¹, num volume final de 0,6 mL. A reação foi interrompida após diferentes intervalos de tempo por aquecimento em banho de água fervente por 5 min. Em seguida, a glicose liberada foi estimada empregando o método da glicose-oxidase (BERGMEYER; BERNT, 1974) usando o kit da Labtest, Lagoa Santa, MG. Em 1 mL do reagente do kit foram adicionados 200 μL da reação anteriormente fervida e a nova reação foi mantida a 37 °C por 30 min. O produto da reação, antipirilquinonimina vermelha, proporcional à glicose liberada, foi dosado em 505 nm.

A atividade sobre os substratos maltose, lactose, sacarose e salicina foi estimada nas mesmas condições descritas acima.

A atividade sobre celulose microcristalina (Avicel®), carboximetilcelulose (CMC) de média viscosidade e trealose (Sigma-Aldrich Chem. Co.) foi estimada também nas mesmas condições descritas acima, com exceção dos substratos poliméricos, que foram utilizados em concentração final de 1% (m/v). Os açúcares redutores totais liberados foram dosados utilizando o método do ácido dinitrosalicílico (DNS) segundo Miller (1959). As reações foram iniciadas pela adição de 100 μL da enzima devidamente diluída ao meio reacional e interrompidas após intervalos de

tempo convenientes pela adição de 600 μL do reagente DNS. As misturas obtidas foram então centrifugadas por 5 min a 5.000 x g e alíquotas de 400 μL dos sobrenadantes foram aquecidas em banho fervente por 5 min. Após resfriamento, cada uma delas foi diluída com 2,0 mL de água destilada e o produto formado foi dosado espectrofotometricamente em 540 nm. A quantidade de açúcar redutor liberada foi estimada a partir de uma curva padrão de glicose (Sigma-Aldrich Chem. Co.).

Controles sem adição de enzima foram incluídos com a finalidade de avaliar a hidrólise espontânea de cada substrato nas condições dos ensaios. As condições experimentais (tempos de reação, número de unidades de atividade) empregadas em todos os experimentos foram ajustadas para garantir a estimativa de velocidades iniciais (resposta linear de formação de produto com o tempo e hidrólise inferior a 5% do substrato inicial). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a liberação de 1 μmol de açúcar redutor ou glicose por minuto, nas condições dos ensaios. A atividade específica foi definida como a relação entre o número de unidades e a massa de proteína, em miligramas, presentes no meio de reação (U mg^{-1}).

Quaisquer modificações das condições padrão mencionadas acima estão descritas nas legendas das figuras e tabelas.

3.2.4 Tratamento dos dados cinéticos

Os parâmetros cinéticos V_{max} (velocidade máxima), K (constante de afinidade aparente) e n_H (coeficiente de Hill) foram calculados por regressão não-linear, empregando o programa SigrafW (LEONE et al., 2005). A concentração que glicose ou xilose que inibiu em 50% a atividade controle (IC_{50}) foi determinada por extrapolação a partir dos gráficos de atividade *versus* concentração de glicose ou xilose. O ajuste de dados experimentais e as análises estatísticas foram realizados utilizando o programa OriginPro 8 SRO (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA).

Foram realizadas três repetições dos procedimentos de expressão e purificação das enzimas, resultando em três preparações distintas de enzima pura. Todas as curvas cinéticas experimentais foram repetidas três vezes, cada uma utilizando uma diferente preparação, e cada ponto experimental foi testado em duplicata. As curvas apresentadas são as que melhor se ajustaram aos dados experimentais e são representativas dos resultados obtidos com as três preparações enzimáticas. Os parâmetros cinéticos são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão dos valores calculados para três diferentes experimentos ($n = 3$).

3.2.5 Eletroforese

Amostras de proteínas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (7%) em condições não desnaturantes (PAGE) de acordo com o método descrito por Davis (1964). Eletroforeses em condições desnaturantes, dodecil sulfato de sódio (SDS)-PAGE, foram realizadas em géis a 10% de acrilamida, segundo Laemmli (1970), empregando mistura padrão de massas moleculares pré-corada para proteínas entre 7 e 198 kDa (Sigma-Aldrich Chem. Co.). As bandas de proteína foram reveladas com Coomassie Brilliant Blue R (Sigma-Aldrich Chem. Co.).

A atividade β -glucosidásica no gel após PAGE foi revelada empregando a metodologia descrita por Kwon et al. (1994). Brevemente, após a corrida o gel foi imerso em tampão Bis-Tris 100 mmol L⁻¹, pH 6,0, por 30 min à temperatura ambiente. A seguir, foi incubado sob agitação a 50 °C no mesmo tampão em concentração 50 mmol L⁻¹, contendo esculina (6,7-dihydroxycoumarina 6-glucosídeo) 0,1% (m/v) (Sigma-Aldrich Chem. Co.) e cloreto férrico 0,03% (m/v). Sob a ação das β -glucosidases, a esculina é convertida em esculetina e glicose e a esculetina, em presença de íons Fe³⁺, forma um precipitado escuro (Kwon et al., 1994). Logo, as bandas proteicas apresentando atividade foram visualizadas pelo aparecimento de um precipitado escuro.

As análises eletroforéticas de DNA foram realizadas em géis de agarose (Agargen, Madri, Espanha) a 1% (m/v), conforme descrito por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). Para a preparação dos géis, a agarose foi adicionada ao tampão TBE 1X, constituído por Tris(hidroximetil)aminometano (Tris, Sigma-Aldrich Chem. Co.) 89 mmol L⁻¹, ácido bórico 89 mmol L⁻¹ e ácido etileno diaminotetracético (EDTA) 2 mmol L⁻¹, pH 8,0. Uma pequena alíquota (4 µL) do corante “SYBR® Safe DNA Gel Stain” (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) foi adicionada à mistura e em seguida esta foi aquecida em forno micro-ondas até a formação de uma solução homogênea. O tampão de corrida utilizado foi TBE e a separação eletroforética foi feita sob tensão de 110 V. A visualização das bandas foi feita a seguir à corrida, sob luz ultravioleta. Em alguns géis, ao invés da adição do corante “SYBR® Safe DNA Gel Stain” as bandas foram visualizadas utilizando-se o agente intercalante brometo de etídeo (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

3.2.6 Sequenciamento automático de DNA e análise dos resultados

O sequenciamento dos plasmídeos foi realizado no Núcleo de Serviços em biotecnologia do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP, Ribeirão Preto) de acordo com o método de Sanger et al. (1977). As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o kit ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Foster-City, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante, e analisadas em sequenciador automático de DNA (ABI 3500 XL Genetic Analyzer, Life Technologies, Foster City, CA, EUA). Os plasmídeos foram sequenciados nas direções “forward” e “reverse”, com o auxílio de oligonucleotídeos específicos.

As análises dos resultados de sequenciamento foram realizadas com auxílio do programa BioEdit versão 7.1.11 (HALL, 1999).

3.2.7 Preparo de células de *E. coli* DH5 α eletrocompetentes

A preparação das células DH5 α eletrocompetente foi realizada empregando uma modificação da metodologia proposta por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). Todas as soluções foram previamente autoclavadas e mantidas refrigeradas até o momento do uso. Inicialmente, uma amostra de um estoque de células foi inoculada em placa contendo meio Luria-Bertani (LB) sólido (triptona 10 g L⁻¹, extrato de levedura 5 g L⁻¹, NaCl 10 g L⁻¹ e ágar 1,5 g L⁻¹ (Neogen Corporation, Lansing, Michigan)) e a placa foi incubada por 12 h a 37 °C. Uma única colônia foi lançada em 50 mL de meio LB líquido (triptona 10 g L⁻¹, extrato de levedura 5 g L⁻¹ e NaCl 10 g L⁻¹) e incubada a 37 °C e 200 rpm por aproximadamente 12 h. Aproximadamente 25 mL dessa cultura foi inoculada em um frasco de Erlenmeyer de 2 litros contendo 500 mL de meio LB líquido. A cultura foi incubada a 37 °C e 180 rpm e o crescimento celular foi monitorado em espectrofotômetro até atingir uma densidade óptica (DO) de 0,4 em 600 nm, a qual corresponde a uma densidade celular de 10⁸ unidades formadoras de colônias (UFC) mL⁻¹.

O meio de cultivo foi então transferido para dois tubos de centrífuga autoclavados (250 mL por tubo), mantido em gelo por 30 min e centrifugado a 4 °C e 1000 x g por 15 min. O sobrenadante de cada tubo foi descartado, os sedimentos foram ressuspensos e misturados em banho de gelo, a 500 mL de água gelada. A suspensão de células foi então submetida a uma nova etapa de centrifugação, nas mesmas condições, por 20 min. Novamente o sobrenadante foi descartado, o sedimento ressuspensionado em 250 mL de solução de glicerol 10% (v/v) e submetido a outra etapa de centrifugação nas mesmas condições acima. O sobrenadante foi descartado mais uma vez e o sedimento ressuspensionado em 10 mL de solução de glicerol 10% (v/v) e centrifugado novamente. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 1 mL de meio GYT (glicerol 10% (v/v), extrato de levedura 0,125% (m/v) e triptona 0,25% (m/v)). A partir desse estoque de células, foi preparada uma suspensão diluída 1:1000 em meio GYT e medida a densidade óptica. Considerando a relação 1,0 DO₆₀₀ = ~ 2,5.10⁸ UFC mL⁻¹, o estoque foi diluído em meio

GYT até atingir uma concentração celular entre 2.10^{10} e 3.10^{10} UFC mL⁻¹. Alíquotas de 50 µL foram estocadas a -80 °C por um período de no máximo 3 meses.

3.2.8 Subclonagem do gene *bglhi* no vetor pT7BsXA

3.2.8.1 O vetor pT7BsXA

O vetor pT7BsXA foi desenvolvido por Ruller et al. (2006) para expressão de proteínas heterólogas em *E. coli*. Trata-se, basicamente, de um plasmídeo contendo a região codificadora da xilanase A de *B. subtilis* (XynA) juntamente com um sinal de secreção, de tal forma que a proteína sintetizada é secretada eficientemente e acumula-se no sobrenadante da cultura. Nessa etapa do projeto ele foi escolhido por tratar-se de um vetor relativamente pequeno, facilitando as etapas de mutagênese sítio dirigida necessárias para expressão da β -glucosidase de *H. insolens* em *P. pastoris* (descritas posteriormente no item 3.2.9 deste capítulo).

Os detalhes do mapa de restrições do vetor pT7BsXA estão apresentados na Figura 8.

Figura 8 - Mapa de restrições contendo a posição exata da endoxilanase de *B. subtilis* e algumas das enzimas de restrição disponíveis no vetor pT7BsXA

Figura 8 - Mapa de restrições contendo a posição exata da endoxilanase de *B. subtilis* e algumas das enzimas de restrição disponíveis no vetor pT7BsXA (conclusão)

3.2.8.2 Digestão enzimática dos plasmídeos pT7BsXA e pET28_*bglhi*

O plasmídeo pET28_*bglhi* foi construído em nosso laboratório para expressão em *E. coli* da β -glucosidase de *H. insolens* (SOUZA et al., 2014). A digestão desse plasmídeo com as enzimas de restrição *NheI* (GCTAGC) e *Bam*HI (GGATCC) liberam o fragmento correspondente ao gene *bglhi*. Quando submetido a digestão com as mesmas enzimas, o plasmídeo pT7BsXA libera somente o gene para endoxilanase de *B. subtilis*, mantendo intacta a região que contém o sinal de secreção. Dessa forma, por possuírem extremidades coesivas, *bglhi* e pT7 (plasmídeo pT7BsXA sem a endoxilanase) podem ser submetidos à etapa de ligação para formar o plasmídeo pT7_*bglhi*.

As reações de digestão (tanto do pET28_*bglhi* como do pT7BsXA) foram realizadas separadamente em volume final de 20 μ L, utilizando-se 2 μ L de tampão FastDigest 10X (Thermo Scientific, Wilmington, USA), 1 U de cada uma das enzimas de restrição (*NheI* e *Bam*HI, Thermo Scientific) e 1 μ g de cada um dos plasmídeos. O volume foi completado com água livre de nucleases e a mistura foi incubada por 45 min a 37 °C. Após este intervalo, as enzimas foram inativadas a 60 °C por 10 min e a seguir adicionou-se 1 μ L de fosfatase alcalina de intestino de bezerro (CIAP, Thermo Scientific) no tubo contendo o vetor pT7BsXA para desfosforilação da extremidade 3'. A reação foi mantida por 45 min a 37 °C. Os produtos da digestão foram aplicados em gel de agarose a 1% (m/v) e as bandas correspondentes ao gene *bglhi* e ao vetor pT7 linear foram isoladas e purificadas do gel, utilizando-se o kit de extração de gel (Thermo Scientific), de acordo com as instruções do fabricante.

3.2.8.3 Ligação do fragmento da *Bglhi* ao vetor pT7

A reação de ligação entre *bglhi* e o vetor linear pT7 foi feita na proporção molar 3:1 (fragmento:vetor) empregando 5 U de T4 DNA ligase e 4 μ L de tampão da T4 DNA ligase 10X fornecido pelo próprio fabricante (Tris-HCl 400 mmol L⁻¹, pH 7,8, MgCl₂ 100

mmol L⁻¹, DTT 100 mmol L⁻¹, ATP 5 mmol L⁻¹, Thermo Scientific), completando-se o volume para 40 µL com água livre de nucleases. A reação foi incubada a 22 °C por 1 h e a seguir a T4 DNA ligase foi inativada incubando-se a mistura a 65 °C por 10 min. Células DH5α eletrocompetente foram transformadas com o produto da reação de ligação (conforme será descrito no item 3.2.8.4).

3.2.8.4 Transformação em células de *E. coli* DH5α

A 50 µL de células eletrocompetentes foi adicionado 1 µL do produto da reação de ligação descrita no item 3.2.8.3. A suspensão foi mantida em gelo por 5 min, transferida para uma cubeta de eletroporação com 0,2 cm de espessura (BioRad, Hercules, CA, USA) e submetida a um pulso elétrico de 2500 V no eletroporador MicroPulser (BioRad). Imediatamente após o pulso elétrico foram adicionados, na própria cubeta, 800 µL de meio SOC (extrato de levedura 0,5% (m/v), triptona 2% (m/v), NaCl 10 mmol L⁻¹, KCl 2,5 mmol L⁻¹, MgCl₂ 10 mmol L⁻¹, MgSO₄ 10 mmol L⁻¹ e glicose 20 mmol L⁻¹) gelado. A suspensão foi então transferida para um microtubo estéril de 1,5 mL e incubada por 1 h a 180 rpm e 37 °C. Após esse intervalo de tempo, a suspensão foi lançada em placas contendo meio LB sólido acrescido de 100 µg mL⁻¹ de ampicilina. As placas foram mantidas a 37 °C por no mínimo 16 h.

Esse mesmo protocolo de transformação foi utilizado para multiplicação de todos os plasmídeos utilizados para desenvolvimento deste trabalho de doutorado. A única alteração diz respeito aos antibióticos utilizados no meio LB sólido. Para isso, respeitamos a resistência presente em cada plasmídeo.

3.2.8.5 PCR de colônia

Após o crescimento das células transformadas em meio LB sólido, foram selecionadas algumas colônias e realizou-se um PCR de colônia, a fim de verificar a

ocorrência de inserção dos fragmentos e não somente o crescimento de colônias contendo vetor vazio. Essas colônias foram ressuspensas em 20 μL de água, dos quais 3 μL foram utilizados para a realização do PCR de colônia e o restante lançado em 5 mL de meio LB líquido (acrescido dos antibióticos adequados) para futura extração dos DNAs plasmidiais dos clones positivos (conforme será descrito no item 3.2.8.6). Os 3 μL destinados à realização do PCR de colônia foram transferidos para tubos de 500 μL e aquecidos a 90 °C por 5 min para a lise das células e liberação do DNA. Após o resfriamento, adicionou-se aos tubos 0,5 pmol de cada um dos dois oligonucleotídeos que anelam especificamente em cada vetor, 2,5 mmol L⁻¹ do cofator MgCl₂, 0,1 mmol L⁻¹ de dNTP Mix (2 mmol L⁻¹ de cada um dos dNTP), 2,5 U de Taq DNA polimerase recombinante (Thermo Scientific) em tampão de PCR 10X do próprio fabricante (Tris-HCl 200 mmol L⁻¹, pH 8,4, e KCl 500 mmol L⁻¹, Thermo Scientific) e água estéril para um volume final de 50 μL . A reação do PCR de colônia foi realizada em termociclador (Veriti® 96-well Thermal Cycler, Life Technology, Foster City, CA, EUA), sendo os tubos incubados a 95 °C por 2 min e submetidos a 25 repetições do seguinte ciclo:

- 1 min a 95 °C,
- 1 min a 50 °C,
- 1 min a 72 °C.

Com o intuito confirmar se não houve nenhum problema com a reação de PCR (problemas com os reagentes ou anelamento dos oligonucleotídeos), alguns PCRs de colônia foram acompanhados de uma reação controle na qual 20 ng do plasmídeo contendo um inserto de tamanho conhecido foi submetido às mesmas condições de reação descritas acima.

Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose a 1,0% (m/v) e os clones que apresentaram resultados positivos (bandas correspondentes ao tamanho esperado para cada fragmento) tiveram seus DNAs plasmidiais extraídos.

3.2.8.6 Minipreparação de DNA plasmidial

As colônias positivas (selecionadas por PCR de colônia) foram inoculadas em 5 mL de meio LB líquido acrescido do antibiótico requerido e incubadas por 12 h a 37 °C e 180 rpm. Após o cultivo, 1,5 mL da suspensão bacteriana foram transferidos para microtubo estéril de 1,5 mL, o qual foi centrifugado a 12.000 x g por 1 min, com posterior descarte do sobrenadante. Ao *pellet* adicionou-se outras duas alíquotas da suspensão de 1,5 mL cada e o procedimento foi repetido. Assim, a massa celular obtida ao final do procedimento correspondeu àquela presente em 5 mL da suspensão bacteriana original. O DNA plasmidial foi então extraído das bactérias utilizando o kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega, Madison, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. Ao final do procedimento, o DNA foi recuperado em 25 µL de água estéril pré-aquecida a 50 °C e quantificado em BioSpec-nano (Shimadzu-Scientific Instruments, Columbia, MD, EUA). Os plasmídeos assim obtidos foram mantidos a -20 °C até o momento do uso.

3.2.9 Subclonagem do gene *bglhi* em pPIC9kf1CT para expressão em *P. pastoris*

3.2.9.1 O vetor pPIC9kf1CT

O vetor pPIC9kf1CT é uma modificação do vetor pPIC9kf1 - (gentilmente cedido pela professora Maria Celia Bertolini, UNESP, Araraquara- SP) usado para a expressão de proteínas heterólogas em *P. pastoris*. A modificação introduziu uma sequência codificadora de polihistidinas em continuidade à região carboxi-terminal da proteína a ser clonada (MALDONADO, 2013). O vetor é do tipo *shuttle*, podendo ser replicado em leveduras e em *E. coli* e apresenta as marcas de seleção para bactérias (gene que confere resistência à ampicilina- AmpR) e leveduras (complementação

auxotrófica pela presença do gene da histidinol desidrogenase -HIS4). Nesse vetor a expressão gênica está sob o controle do promotor induzível da AOX1 (álcool oxidase 1), o que permite o crescimento de uma grande massa celular antes da expressão do gene, em meio contendo metanol. Outra característica deste vetor é a presença de uma sequência sinal, após a região promotora responsável pela internalização da proteína expressa no retículo endoplasmático, que direciona a proteína para a via de secreção. As Figuras 9 e 10, representam o mapa físico do vetor pPIC9kf1CT e detalhes do sítio múltiplo de clonagem, respectivamente.

Figura 9 - Mapa físico do vetor pPIC9kf1CT

Amostra **pPIC9kf1CT** Restriction Map

Figura 10 - Mapa de restrições do vetor pPIC9kf1CT

A sequência mostra detalhes dos sítios múltiplos de clonagem (SMC) que contém sítios de restrição para as enzimas *XhoI*, *EcoRI*, *AvrII*, *NotI* e *SnaBI* (não indicada, mas localizada imediatamente antes de *EcoRI*).

3.2.9.2 Mutagênese sítio-dirigida para eliminação dos sítios de *StuI* nas posições 647 e 752 do gene *bglhi*

A fim de utilizar a enzima de restrição *StuI* (AGGCCT) na etapa de linearização do vetor pPIC9kf1CT (item 3.2.10.2), os dois sítios internos de *StuI* presentes no gene *bglhi* foram eliminados por meio de duas mutações silenciosas. A técnica escolhida para a realização dessas mutações foi a mutagênese sítio-dirigida, proposta por Liu e Naismith (2008), conforme representada na Figura 11.

Figura 11 - Esquema representativo da mutagênese sítio-dirigida utilizada para eliminar individualmente os dois sítios internos de *StuI* do gene *bglhi*

A figura foi adaptada de Liu e Naismith (2008).

Trata-se de uma reação de PCR normal na presença de oligonucleotídeos complementares apenas na região que contem a mutação de interesse (cada uma das mutações foi inserida separadamente, de modo que o mesmo protocolo foi realizado duas vezes).

Primeiramente foi feito o anelamento dos oligonucleotídeos contendo a mutação de interesse ao molde (Fig. 11A). Como molde, utilizamos o plasmídeo construído anteriormente (pT7_*bglh*). Na segunda etapa (Fig. 11B) foi feita a extensão dos oligonucleotídeos utilizando o plasmídeo parental como molde. Na terceira etapa (Fig. 11C) os oligonucleotídeos contendo a mutação aleraram-se tanto ao plasmídeo parental quanto às fitas recém-sintetizadas, aumentando o número de cópias contendo a mutação de interesse. Finalmente, foi feito um tratamento da mistura final (que contem plasmídeos parentais e recém-sintetizados) com a enzima *DpnI* (GATC) que reconhece e degrada apenas os plasmídeos parentais por serem metilados. Confirmada a inserção da primeira mutação (por meio de sequenciamento automático) este plasmídeo serviu de molde para a segunda reação na presença de oligonucleotídeos contendo a segunda mutação.

A tabela a seguir mostra os oligonucleotídeos utilizados para inserir as mutações silenciosas e eliminar os sítios internos de *Stul*.

Tabela 2: Oligonucleotídeos contendo as mutações silenciosas para eliminar os sítios internos de *StuI* do gene *bglhi*

Sítio interno	Oligonucleotídeos	Temperatura de anelamento (°C)	Produto esperado (pb)
<i>StuI</i> (647)	StuI1_F5'-3'	50	4500
	GCCGTCAAGGCATATCGCGAGGAC		
	StuI1_R5'-3'		
	CTGCTCGCGATATGCCTTGACGGC		
<i>StuI</i> (752)	StuI2_F5'-3'	50	4500
	GACATTGAAGCATGCGACCGCAAGAT		
	CGAGTTC		
	StuI2_R5'-3'		
	GTCGCATGCTTCAATGTGCGCCGGGT		
	CCTCGGG		

Para inserir a primeira mutação silenciosa (posição 647), a um microtubo contendo 10 ng do plasmídeo pT7_*bglhi* foram adicionados 5 µL de tampão da enzima *Pfu* DNA polimerase 10X fornecido pelo fabricante (Tris-HCl 200 mmol L⁻¹, pH 8,8, (NH₄)₂SO₄ 100 mmol L⁻¹, KCl 100 mmol L⁻¹, BSA 1 mg mL⁻¹, Triton X-100 1% (v/v) e MgSO₄ 20 mmol L⁻¹, Thermo Scientific), 5 µL de dNTP Mix, 5 µL do Primer StuI1_F5'-3' 10 pmol µL⁻¹, 5 µL do Primer StuI1_R5'-3' 10 pmol µL⁻¹, 2,5 U *Pfu* DNA Polimerase (Thermo Scientific) e água livre de nucleases suficiente para completar 50 µL.

Os microtubos foram levados ao termociclador, utilizando-se um programa que consiste em: uma etapa de 3 min a 95 °C para desnaturação inicial e ativação da enzima *Pfu* DNA polimerase e uma sequência de 30 ciclos, que incluíram uma segunda etapa de desnaturação de 1 min a 95 °C, uma etapa de anelamento de 1 min a 50 °C e uma etapa de extensão de 10 min a 72 °C. A reação foi finalizada com uma etapa de extensão adicional de 10 min a 72 °C. Alíquotas dos produtos obtidos foram analisadas em gel de agarose a 1% (m/v).

O produto da reação foi purificado diretamente da solução utilizando-se o kit de purificação de PCR (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Ao final do procedimento, o DNA foi recuperado em 25 µL de água estéril pré-aquecida a 50 °C. Adicionou-se então 2 U da enzima de restrição *DpnI* e 3 µL de tampão FastDigest 10X (Thermo Scientific), e a reação foi incubada por 3 h a 37 °C. O produto da reação foi purificado diretamente da solução, conforme explicado anteriormente. O DNA foi recuperado em 30 µL de água estéril pré-aquecida a 50 °C e submetido a ultracentrifugação a vácuo para concentração da amostra. O DNA foi ressuspenso em 2 µL de água estéril e submetido à etapa de transformação com células DH5α eletrocompetentes (conforme item 3.2.8.4). Após o crescimento das células transformadas, as etapas de PCR de colônia, minipreparação do DNA plasmidial e sequenciamento automático dos plasmídeos seguiram os mesmos protocolos descritos anteriormente.

Confirmada a mutação na posição 647, esse plasmídeo serviu de molde para a reação de inserção da mutação na posição 752. A reação foi realizada exatamente como descrito anteriormente, na presença dos oligonucleotídeos *StuI2_F5'*- 3' e *StuI2_R5'*- 3'. O plasmídeo contendo as duas mutações foi nomeado de *pT7_bglhi_mut*. Além do sequenciamento automático, a confirmação das mutações foi realizada por meio de um teste de digestão do *pT7_bglhi_mut* com a enzima de restrição *StuI*. A reação de digestão foi realizada conforme descrito no item 3.2.8.2.

3.2.9.3 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores para subclonagem do gene *bglhi* em pPIC9kf1CT

Com base nas informações sobre a sequência de nucleotídeos da β-glucosidase de *H. insolens*, depositada pelo nosso grupo de pesquisa no bando de dados NCBI (GenBank: KF588650) (SOUZA et al., 2014), foram idealizados os oligonucleotídeos para subclonagem do gene de interesse no vetor pPIC9kf1CT. Os oligonucleotídeos foram construídos flanqueando o gene de interesse com os sítios

de restrição *Sna*BI (TACGTA) e *Avr*II (CCTAGG) (Thermo Scientific) nas posições 5' e 3' respectivamente. Na Tabela 3 estão apresentados os oligonucleotídeos utilizados.

Tabela 3: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para subclonagem do gene *bglhi* em pPIC9kf1CT

Gene (GI)	Oligonucleotídeos	Temperatura de anelamento (°C)	Produto esperado (pb)
KF588650	bglhi_pichia_F5'-3'	50	1450
	GGGTACGTAATGTCTCTTCCTCCGGAC		
	bglhi_pichia_R5'-3'		
	GGGCCTAGGCTCCTTGCGAATCAAGCT		

3.2.9.4 Amplificação do gene *bglhi* e dos sítios de restrição *Sna*BI e *Avr*II para subclonagem em pPIC9kf1CT

A um microtubo contendo 80 ng do plasmídeo pT7_*bglhi*_mut foram adicionados 5 µL de tampão da enzima *Pfu* DNA polimerase 10X fornecido pelo fabricante (Thermo Scientific), 5 µL de dNTP Mix, 5 µL do Primer bglhi_pichia_F5'-3' 10 pmol µL⁻¹, 5 µL do Primer bglhi_pichia_R5'-3' 10 pmol µL⁻¹, 2,5 U *Pfu* DNA Polimerase (Thermo Scientific) e água livre de nucleases suficiente para completar 50 µL.

Os microtubos foram levados ao termociclador, utilizando-se um programa que consistiu em: uma etapa de 2 min a 95 °C para desnaturação inicial e ativação da enzima *Pfu* DNA Polimerase e uma sequência de 30 ciclos, que incluem uma segunda etapa de desnaturação de 30 segundos a 95 °C, uma etapa de anelamento de 30 segundos a 50 °C e uma etapa de extensão de 4 min a 72 °C. A reação foi finalizada com uma etapa de extensão adicional de 10 min a 72 °C. Os produtos da reação foram

aplicados em gel de agarose a 1% (m/v) e as bandas de interesse foram isoladas e purificadas do gel, utilizando-se o kit de extração de gel (Promega), de acordo com as instruções do fabricante.

3.2.9.5 Digestão enzimática e ligação do fragmento de interesse ao vetor pPIC9kf1CT

O fragmento gerado na amplificação anterior e o vetor pPIC9kf1CT foram submetidos a digestão com as enzimas de restrição *Sna*BI e *Avr*II, como descrito no item 3.2.8.2.

A reação de ligação entre os fragmentos de DNA e o vetor linear digeridos foi feita na proporção molar 5:1 (fragmento:vetor) empregando 5 U de T4 DNA ligase, 3 µL de uma solução 50% de polietilenoglicol, 3 µL de tampão da T4 DNA ligase 10X fornecido pelo próprio fabricante (Thermo Scientific), completando-se o volume para 40 µL com água livre de nucleases. A reação foi incubada a 16 °C por 6 h e a seguir a T4 DNA ligase foi inativada incubando-se a mistura a 65 °C por 10 min. O produto da reação de ligação foi utilizado para transformar células DH5α eletrocompetentes (conforme descrito no item 3.2.8.4). Após o crescimento das células transformadas, as etapas de PCR de colônia, minipreparação do DNA plasmidial e sequenciamento automático dos plasmídeos seguiram os mesmos protocolos descritos anteriormente. O vetor pPIC9kf1CT contendo o inserto de interesse foi nomeado pPIC9kf1CT_*bglhi*_mut.

3.2.10 Transformação em *P. pastoris*

3.2.10.1 Linhagem utilizada

A linhagem utilizada para expressão da β -glucosidase de *H. insolens* foi *P. pastoris* GS115 (Invitrogen). Essa linhagem possui uma mutação no gene da histidinol desidrogenase (*his4*) que impede a síntese do aminoácido histidina. O plasmídeo de expressão (pPIC9kf1CT) carrega o gene HIS4 que complementa o gene *his4* no genoma da levedura. Dessa forma, os transformantes são selecionados pela capacidade de crescimento em meio de cultura sem histidina. Outra particularidade do genoma desta levedura é a existência de dois genes AOX que codificam para duas isoformas da enzima álcool oxidase: a álcool oxidase 1 (AOX1) e a álcool oxidase 2 (AOX2). A AOX1 é a principal isoforma e a sua concentração na célula supera a de AOX2. A função destas duas enzimas é metabolizar o metanol a formaldeído por meio de uma reação de oxidação com oxigênio molecular. As leveduras podem apresentar dois fenótipos distintos quanto à metabolização do metanol: MutS (methanol utilization slow) e Mut+ (methanol utilization plus). Nas leveduras Mut+, os dois genes são funcionais e o AOX1 é responsável pela maior parte da produção da enzima. Nas leveduras apresentando o fenótipo MutS, o gene AOX1 está nocauteado e o AOX2 está em atividade. No atual trabalho foi utilizado somente o fenótipo Mut+.

3.2.10.2 Linearização do plasmídeo pPIC9kf1CT_*bglhi*_mut

O plasmídeo pPIC9kf1CT_*bglhi*_mut foi submetido a reação de digestão com a endonuclease *Stu*I para linearização. A reação consistiu de 2 μ g do plasmídeo pPIC9kf1CT_*bglhi*_mut, 2,5U de endonuclease *Stu*I e 2 μ L de tampão FastDigest 10X (Thermo Scientific), completando com água estéril para um volume final de 20 μ L. A mistura foi incubada por 30 min a 37 °C e o produto da reação foi purificado diretamente da solução utilizando-se o kit de purificação de PCR (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Ao final do procedimento, o DNA foi recuperado em 25 μ L de água estéril pré-aquecida a 50 °C e quantificado em BioSpec-nano imediatamente antes da transformação. A linearização em região pré-estabelecida, no gene da histidina desidrogenase, produz eventos de recombinação homóloga no genoma da levedura no momento da transformação (Fig. 12). A

integração no genoma via recombinação ocorre quando o vetor de expressão contém regiões que são homólogas ao genoma da *P. pastoris*.

Figura 12 - Integração do vetor no genoma de *P. pastoris* por inserção gênica no locus da histidina desidrogenase

O uso de cepa mutante *his4* (*P. pastoris* GS115) permite que os transformantes cresçam em meio sem histidina, pois o evento de complementação gênica desfaz o fenótipo mutante. *HIS4*, gene da histidina desidrogenase selvagem; *his4*, gene da histidina desidrogenase mutante; *GI*, gene de interesse; 5' AOX1, promotor AOX. A figura foi adaptada de Daly e Hearn (2005).

3.2.10.3 Preparo de células de *P. pastoris* GS115 eletrocompetentes

Uma colônia de *P. pastoris* recém inoculada em placa contendo meio de cultura YPD sólido (extrato de levedura 10 g L⁻¹, peptona 20 g L⁻¹, glicose 20 g L⁻¹ e ágar 15 g L⁻¹) foi lançada em 100 mL de meio de cultura YPD líquido (extrato de levedura 10 g L⁻¹, peptona 20 g L⁻¹ e glicose 20 g L⁻¹) e incubada a 30 °C por aproximadamente 18 h, sob agitação de 200 rpm, até atingir a DO de 2,0 em 600 nm. As células foram coletadas por centrifugação a 4000 rpm por 5 min e ressuspensas em 100 mL de água estéril gelada, seguido por mais um ciclo de centrifugação e mais uma lavagem com 100 mL de água estéril gelada. O mesmo procedimento foi repetido e então as células foram novamente centrifugadas e lavadas com 5 mL de uma solução estéril gelada de sorbitol 1 mol L⁻¹. Por fim, as células competentes foram coletadas por

centrifugação e ressuspendidas em 1 mL de solução de sorbitol 1 mol L⁻¹ estéril gelada, sendo conservadas em gelo e usadas imediatamente nas reações de transformação por eletroporação.

3.2.10.4 Transformação em células de *P. pastoris* GS115 eletrocompetentes

Em banho de gelo, foram transferidos 80 µL das células competentes para uma cubeta de eletroporação com 0,2 cm de espessura. Em seguida, foram adicionados 1 µg de DNA plasmidial linearizado e purificado (em até 20 µL de água estéril) e a mistura foi homogeneizada na própria cubeta e deixada em banho de gelo por 5 min. A seguir, a cubeta foi transferida para os eletrodos do eletroporador e submetida a um pulso elétrico de 1500 V. Imediatamente após o pulso elétrico, as células foram suspensas em 500 µL de sorbitol 1 mol L⁻¹ estéril e gelado e alíquotas de 250 µL foram transferidas para placas de Petri contendo meio MD sólido (Base nitrogenada para leveduras sem aminoácidos e sulfato de amônio (YNB, Sigma-Aldrich Chem. Co.) 3,4 g L⁻¹, glicose 10 g L⁻¹, sulfato de amônio 10 g L⁻¹, biotina 4.10⁻⁴ g L⁻¹ e ágar 15 g L⁻¹). As placas foram então incubadas por 3-4 dias a 30 °C.

3.2.10.5 Seleção das colônias transformadas que apresentaram atividade β-glucosidásica

Após o aparecimento das colônias em meio sólido (aproximadamente 3-4 dias), cerca de 15 colônias foram repicadas em meio MD sólido para manutenção e também em meio MD seletivo (meio MD sólido sem glicose 10 g L⁻¹ mas acrescido de esculina 1 g L⁻¹ e cloreto férrico 0,3 g L⁻¹), para detecção de atividade β-glucosidásica. As placas foram incubadas por 24-48 h a 30 °C até o aparecimento de halos escuros, indicando a presença de atividade β-glucosidásica.

3.2.11 Efeito do tempo e do meio de cultivo sobre a expressão da β -glucosidase de *H. insolens* em *P. pastoris*

Um dos clones transformados com o plasmídeo pPIC9kf1CT_*bglhi*_mut que apresentou halo escuro quando repicado em meio MD sólido seletivo foi escolhido para expressão em meio líquido. A mesma colônia foi lançada em 3 frascos de Erlenmeyer de 1 L cada um contendo 100 mL de um dos seguintes meios de crescimento: YPG (extrato de levedura 10 g L⁻¹, peptona 20 g L⁻¹, glicerol 1% (v/v) e fosfato de potássio 100 mmol L⁻¹, pH 6,0), BMG (YNB 3,4 g L⁻¹, sulfato de amônio 10 g L⁻¹, biotina 4.10⁻⁴ g L⁻¹, glicerol 1% (v/v) e fosfato de potássio 100 mmol L⁻¹, pH 6,0) e BMGY (meio BMG acrescido de extrato de levedura 10 g L⁻¹ e peptona 20 g L⁻¹). As culturas foram incubadas a 30 °C por aproximadamente 20 h, sob agitação de 200 rpm, até atingir DO entre 2,0-6,0 em 600 nm. As culturas foram centrifugadas a 4000 rpm a 25 °C por 5 min. Os sobrenadantes foram descartados e as células ressuspendidas em 5 mL do meio correspondente. As células crescidas em meio YPG foram transferidas para dois frascos de Erlenmeyer de 1 L contendo 100 mL de meio YPM (idêntico ao meio YPG com substituição do glicerol por metanol nas concentrações 0,5% (v/v) ou 1% (v/v)) de modo a atingir a densidade óptica de 1,0 em 600 nm. O mesmo foi feito para as células crescidas nos meios BMG ou BMGY, que foram transferidas para dois frascos de Erlenmeyer de 1 L contendo 100 mL de meios BMM ou BMMY (idênticos aos meios BMG e BMGY respectivamente, com substituição do glicerol por metanol nas concentrações 0,5% (v/v) ou 1% (v/v)) até atingir densidade óptica de 1,0 em 600 nm. Alíquotas de 1 mL dos diferentes meios de cultura foram retiradas em intervalos de 24 h e centrifugadas por 3 min a 12000 rpm. Os sobrenadantes foram utilizados como extrato bruto para dosagem da atividade β -glucosidásica e posterior análise em SDS-PAGE a 10% (LAEMMLI, 1970). Metanol (1% ou 0,5%) foi adicionado às culturas a cada 24 h. O pH foi corrigido diariamente por adição de 1 mL de fosfato de potássio 1 mol L⁻¹, pH 6,0, e a expressão da enzima foi acompanhada por 12 dias. No final desse período, as culturas foram centrifugadas a 5000 rpm durante 20 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram armazenados em geladeira (4 °C) até o momento da purificação.

3.2.12 Purificação por cromatografia de afinidade da β -glucosidase de *H. insolens* produzida em *P. pastoris*

A enzima expressa em *P. pastoris*, denominada Bglhi^{Pp}, foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. Uma coluna de resina de Ni²⁺ (2,0 x 2,0 cm) foi equilibrada com tampão Hepes 50 mmol L⁻¹, pH 8,0, contendo NaCl 500 mmol L⁻¹ (Tampão A). O sobrenadante da cultura que apresentou maior atividade β -glucosidásica teve seu pH acertado para 8,0 por adição de fosfato de potássio 1 mol L⁻¹, pH 8,0 e duas alíquotas (50 mL cada) foram incubadas a 4 °C por 1 h com 2 mL da resina de níquel pré-equilibrada com Tampão A. A mistura resina-sobrenadante foi aplicada sobre a coluna e após entrada de toda a amostra, a resina foi lavada com Tampão A até não ser mais possível detectar a eluição de proteínas por absorção em 280 nm. Em seguida, a coluna foi lavada com concentrações crescentes de imidazol (10, 25, 50 e 100 mmol L⁻¹) no Tampão A e alíquotas de 1 mL foram coletadas para análise de atividade β -glucosidásica. As alíquotas apresentando maior atividade β -glucosidásica foram reunidas e concentradas para troca do tampão A por água. A pureza da amostra final foi confirmada por SDS-PAGE a 10% (LAEMMLI, 1970).

3.2.13 Dosagem de carboidratos totais

O teor de carboidratos da Bglhi^{Pp} foi estimado empregando-se o método descrito por Dubois et al. (1956). Alíquotas da enzima purificada foram diluídas para 1 mL com água destilada e adicionadas de 25 μ L de fenol 80%, seguidos por 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi deixada em repouso por 10 min à temperatura ambiente. Após este intervalo, foi determinada a sua absorbância em 490 nm. O mesmo procedimento foi realizado empregando soluções padrão de manose de diferentes concentrações.

3.2.14 Temperatura e pH ótimos, estabilidade térmica e ao pH da Bglhi^{PP}

A temperatura ótima de reação foi determinada em tampão Bis-Tris 50 mmol L⁻¹, pH 6,0, na faixa de temperatura de 40 a 65 °C, utilizando pNP-Glc 2 mmol L⁻¹ como substrato. O pH ótimo de reação da Bglhi^{PP} foi determinado a 50 °C em tampão McIlvaine (MCILVAINE, 1921) na faixa de pH entre 3 e 8, utilizando pNP-Glc 2 mmol L⁻¹ como substrato.

A termoestabilidade da β -glucosidase recombinante foi analisada por incubação da enzima diluída em água em diferentes temperaturas (50 e 55 °C). Após intervalos de tempo convenientes alíquotas foram retiradas e a inativação interrompida por imersão em banho de gelo por 1 min. A seguir, quantificou-se a atividade residual a 50 °C, em tampão Bis-Tris 50 mmol L⁻¹, pH 6,0, utilizando pNP-Glc 2 mmol L⁻¹ como substrato.

A estabilidade ao pH foi estimada por meio da diluição de alíquotas da enzima purificada em tampão McIlvaine (MCILVAINE, 1921), numa faixa de pH entre 3,0 e 8,0. As amostras diluídas foram mantidas em geladeira (4 °C) por 24 h, determinando-se a seguir a atividade residual como descrito acima.

3.2.15 Expressão e purificação da Bglhi

A β -glucosidase de *H. insolens* expressa em *E. coli* foi produzida conforme protocolo descrito por Souza et al., 2014.

O planejamento da subclonagem foi feito baseando-se no vetor escolhido para trabalho, denominado pT7BsXA (RULLER et al., 2006). Uma vez que esse vetor apresentava uma endoxilanasase de *B. subtilis* em sua construção, o primeiro passo foi retirá-la, preservando a região responsável pela secreção da enzima. Para isso, conforme visto na Figura 8 (item 3.2.8.1), as opções para enzimas de restrição tiveram que ser obrigatoriamente *NheI* (que cliva exatamente entre o fim da sequência sinalizadora e o início da endoxilanasase) e alguma enzima com sítio de clivagem após o término da sequência da endoxilanasase. Para escolher a segunda enzima, foi então feito uma análise do gene *bglHI* com auxílio do programa BioEdit (Fig. 13), identificando-se o grupo de enzimas que não clivassem internamente a sequência. Assim, foram escolhidas as enzimas de trabalho: *NheI* e *BamHI*.

Figura 13 - Enzimas de restrição que não clivam internamente a sequência que codifica a β -glucosidase de *H. insolens*

3.3.2 Subclonagem do gene *bglhi* no vetor pT7BsXA

Os plasmídeos pT7BsXA (Fig. 14a) e pET28_*bglhi* (Fig. 14b) foram digeridos com as enzimas de restrição *NheI* e *BamHI*. A análise dos produtos de reação de digestão do plasmídeo pT7BsXA (Fig. 14a, linha 3) revelou a presença de um fragmento entre 500 e 750 pb (próximo ao tamanho esperado, 688 pb, da endoxilanase de *B. Subtilis*) e o vetor linear pT7 próximo a 3000 pb (exatamente 2939 pb). Podemos observar também que, enquanto o vetor linear pT7 migrou de acordo com o tamanho esperado, o controle (vetor não submetido a reação de digestão, Fig. 14a, linha 2) migrou de modo anômalo, além de apresentar algumas isoformas de acordo com a conformação adquirida pelo plasmídeo. Já a análise dos produtos de reação de digestão do plasmídeo pET28_*bglhi* com as mesmas enzimas (Fig. 14b, linha 3), revelou a presença de um fragmento próximo a 1500 pb, correspondendo ao fragmento de interesse (*bglhi*), e outras duas bandas, próximas a 5300 e 6800, pb correspondendo aos vetores pET-28a(+) vazio e pET28_*bglhi* não digerido, respectivamente. Podemos observar também que o vetor não submetido a reação de digestão (Fig. 14b, linha 2) migrou de modo anômalo, uma vez que era esperada uma banda próxima de 7000 pb, justamente pela conformação adquirida pelo plasmídeo.

Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose (1,0 %, m/v) após digestão dos plasmídeos pT7BsXA (a) e pET28_bglhi (b) com as enzimas *NheI* e *BamHI*

(1) padrão de massa molecular aparente, (2) plasmídeos não submetidos a reação de digestão (controles), (3) plasmídeos após reação de digestão com *NheI* e *BamHI*.

A seguir, o fragmento correspondente a *bglhi* e o vetor linear pT7 foram submetidos a reação de ligação e os produtos foram utilizados para transformar bactérias competentes *E. coli* DH5 α . Após o crescimento das células transformadas em meio LB sólido, realizou-se um PCR de colônia (com auxílio dos oligonucleotídeos M13Forward e M13Reverse que anelam especificamente no vetor pT7) para confirmação da presença do inserto no plasmídeo. A análise dos produtos obtidos por eletroforese em gel de agarose (Fig. 15) revelou a presença de um fragmento próximo a 1500 pb nas colônias C, D, E, H, I e J, indicando a presença do inserto no plasmídeo. As demais colônias não continham o inserto (colônias vazias).

Figura 15 - Análise eletroforética dos produtos de PCR de colônias selecionadas de células DH5 α transformadas com o plasmídeo pT7_ *bglhi*

A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1,0% (m/v), como descrito em Material e Métodos. (A) padrão de massa molecular aparente; (B – J) produtos de PCR de colônias selecionadas de células DH5 α transformadas com o plasmídeo pT7_ *bglhi*.

O DNA plasmidial dos clones selecionados (C, D, E, H, I e J) foi extraído, purificado e sequenciado automaticamente, para confirmação da inserção correta do gene *bglhi* no pT7. O sequenciamento foi feito com boa resolução, como ilustrado pelos cromatogramas das regiões de começo e fim do gene, mostrados na Figura 16, confirmando o sucesso da subclonagem.

Figura 16 - Cromatograma da análise do sequenciamento para confirmação da subclonagem do gene *bglhi* no vetor pT7

A sequência GCTAGC, correspondente à enzima de restrição *NheI*, pode ser visualizada imediatamente antes da região inicial do gene (trinca ATG). Antecedendo essa sequência de *NheI*, observamos a sequência CCTCTGCA, correspondente ao fim da sequência sinalizadora de secreção presente no vetor. A sequência GGATCC, correspondente a enzima *BamHI*, encontra-se após a trinca correspondente ao fim do gene, TAA.

3.3.3 Planejamento da subclonagem do gene *bglhi* no vetor pPIC9kf1CT

O planejamento da subclonagem foi feito baseando-se no vetor de trabalho escolhido (pPIC9kf1CT) e nas enzimas disponíveis no sítio múltiplo de clonagem desse vetor (*AvrII*, *SnaBI*, *XhoI*, *HindIII* e algumas menos comuns). A mesma análise do gene *bglhi* feita para subclonagem no vetor pT7BsXA foi utilizada aqui (Fig. 13, item 3.3.1). Nesse caso, as enzimas escolhidas foram *SnaBI* e *AvrII*. Durante o planejamento, entretanto, identificou-se que o gene *bglhi* apresenta dois sítios internos de *StuI*, como pode ser visto na Figura 17.

Figura 17 - Mapa de restrições da região do gene *bglhi* que contém os sítios internos da enzima *StuI*

Os sítios de *StuI* na sequência de *bglhi* estão evidenciados na cor vermelha.

Como a enzima *StuI* seria utilizada posteriormente para linearização do vetor pPIC9kf1CT contendo o gene de interesse antes da etapa de transformação em células de *P. pastoris*, foi necessário eliminar esses sítios por meio de mutações silenciosas, antes da subclonagem.

3.3.4 Mutagênese sítio dirigida por PCR para eliminação do sítio interno de *StuI* na posição 647 do gene *bglhi*

O plasmídeo pT7_*bglhi* foi submetido à etapa de PCR na presença de oligonucleotídeos contendo a mutação silenciosa na posição 647 do gene *bglhi*. A análise dos produtos da reação (Fig. 18, linha B), revelou a presença de uma banda intensa próxima a 4500 pb (tamanho esperado para a amplificação do plasmídeo pT7_*bglhi*). Além disso, podemos ver um rastro abaixo dessa banda, indicando possivelmente os produtos de degradação dos plasmídeos parentais formados após a ação da enzima *DpnI*.

Figura 18 - Eletroforese em gel de agarose (1,0 %, m/v) após reação de PCR para eliminação do sítio interno de *StuI* na posição 647 do gene *bglhi*

(A) padrão de massa molecular aparente, (B) pT7_*bglhi* após amplificação com os oligonucleotídeos contendo a mutação silenciosa 647.

A seguir, o fragmento correspondente ao plasmídeo pT7_ *bglhi* foi extraído do gel, purificado e utilizado para transformar bactérias competentes *E. coli* DH5 α . Após o crescimento das células transformadas em meio LB sólido, realizou-se um PCR de colônia (com auxílio dos oligonucleotídeos M13Forward e M13Reverse que anelam especificamente no vetor pT7) para confirmação da presença do inserto no plasmídeo. A análise dos produtos obtidos por eletroforese em gel de agarose (Fig. 19) revelou a presença de um fragmento próximo a 1500 pb nas colônias C - N, indicando a presença do inserto no plasmídeo. A colônia B não continha o inserto (colônia vazia).

Figura 19 - Análise eletroforética dos produtos de PCR de colônias selecionadas de células DH5 α transformadas com o plasmídeo contendo o gene *bglhi* após mutação silenciosa na posição 647

A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1,0% (m/v), como descrito em Material e Métodos. (A) padrão de massa molecular aparente; (B – N) colônias de células DH5 α submetidas a PCR.

O DNA plasmidial de alguns clones positivos foi extraído, purificado e sequenciado automaticamente, para confirmação da mutação silenciosa na posição 647 do gene *bglhi*. O sequenciamento foi feito com boa resolução, e a região contendo a mutação está mostrada na Figura 20, confirmando o sucesso do PCR. Empregando

as ferramentas do programa BioEdit, pudemos visualizar dois nucleotídeos mutados. Esse novo plasmídeo, contendo a mutação foi nomeado pT7_*bglhi*_647.

Figura 20- Cromatograma e alinhamento da região do gene *bglhi* submetida à mutação silenciosa 647

A sequência GCCTAC do gene *bglhi* foi substituída por GCATAT (indicado por uma caixa vermelha na imagem) para eliminação do sítio interno de *StuI*. Essa modificação, a nível de nucleotídeos, não provocou modificações na sequência de aminoácidos.

3.3.5 Mutagênese sítio dirigida por PCR para eliminação do sítio interno de *StuI* na posição 752 do gene *bglhi*

O plasmídeo pT7_*bglhi*_647 foi submetido a uma nova etapa de PCR na presença de oligonucleotídeos contendo a mutação silenciosa na posição 752 do gene *bglhi*. A análise dos produtos da reação (Fig. 21B), revelou a presença de uma banda intensa próxima a 4500 pb (tamanho esperado para amplificação do plasmídeo pT7_*bglhi*). Além disso, podemos ver um rastro abaixo dessa banda, indicando possivelmente os produtos de degradação dos plasmídeos parentais formadas após a ação da enzima *DpnI*.

Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose (1,0 %, m/v) após PCR para eliminação do sítio interno de *StuI* na posição 752 do gene *bglhi*

(A) padrão de massa molecular aparente, (B) pT7_*bglhi* após amplificação com os oligonucleotídeos contendo a mutação silenciosa 752.

A seguir, o fragmento correspondente ao plasmídeo pT7_*bglhi* foi extraído do gel, purificado e utilizado para transformar bactérias competentes *E. coli* DH5 α . Após o crescimento das células transformadas em meio LB sólido, realizou-se um PCR de colônia, como descrito anteriormente, para confirmação da presença do inserto no plasmídeo. A análise dos produtos obtidos por eletroforese em gel de agarose (Fig. 22) revelou a presença de um fragmento próximo a 1500 pb nas colônias B – G e I, indicando a presença do inserto no plasmídeo. As colônias H, J, L e M não continham o inserto (colônias vazias).

Figura 22 - Análise eletroforética dos produtos de PCR de colônias selecionadas de células DH5 α transformadas com o plasmídeo contendo o gene *bglhi* após mutação silenciosa na posição 752.

A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1,0% (m/v), como descrito em Material e Métodos. (A) padrão de massa molecular aparente; (B – M) colônias de células DH5 α submetidas a PCR

Os DNAs plasmidiais de alguns clones positivos foram extraídos, purificados e sequenciados automaticamente, para confirmação da mutação na posição 752 do gene *bglhi*. Como o resultado dos sequenciamentos foi demorado, o sucesso das mutações foi confirmado imediatamente com uma reação de digestão. Para isso, os DNAs plasmidiais extraídos dos clones positivos foram digeridos individualmente com a enzima *StuI*. A análise dos produtos da reação de digestão por eletroforese em gel de agarose (Fig. 23) revelou o sucesso das duas mutações silenciosas nos clones B, D, E e F. Observa-se também que o controle (pT7_*bglhi*_647 submetido à mesma reação de digestão com *StuI*, Fig. 23, linha G) apresentou um padrão de migração diferente quando comparado aos clones positivos, pois ainda possuía um sítio interno de *StuI*, sofrendo, portanto, linearização. O clone C apresentou esse mesmo padrão de migração, indicando que ainda mantinha um sítio interno de *StuI*. Uma possível explicação para isso pode ser a digestão incompleta do DNA parental (pT7_*bglhi*_647) pela enzima *DpnI*. Já nos clones positivos (B, D, E e F), podemos ver a migração anômala dos plasmídeos circulares e suas diferentes isoformas.

Figura 23 - Análise eletroforética dos produtos de digestão dos DNAs plasmidiais extraídos dos clones positivos com a enzima *StuI*

A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1,0% (m/v), como descrito em Material e Métodos. (A) padrão de massa molecular aparente; (B – F) DNAs plasmidiais extraídos de clones positivos; (G) controle (pT7_*bglhi*_647 submetido à mesma reação de digestão).

O resultado do sequenciamento (dos DNAs plasmidiais B, D, E e F), feito com boa resolução (Fig. 24), mostrou a região contendo a mutação na posição 752, confirmando o teste de digestão realizado anteriormente, podendo-se visualizar, com auxílio do BioEdit, os dois nucleotídeos mutados. Dessa forma, o plasmídeo pT7_*bglhi* sem os sítios internos de *StuI* (pT7_*bglhi*_mut) pôde ser utilizado para subclonagem no vetor pPIC9kf1CT e expressão em *P. pastoris*.

Figura 24 - Cromatograma e alinhamento da região do gene *bglhi* submetida a mutação silenciosa 752

A sequência GAGGCC do gene *bglhi* foi substituída por GAAGCA (indicado por uma caixa vermelha na imagem) para eliminação do sítio interno de *StuI*.

3.3.6 Amplificação do gene *bglhi* para inserção dos sítios de restrição *SnaBI* e *AvrII* nas posições inicial e final do gene, respectivamente, e clonagem em vetor pPIC9kf1CT

O plasmídeo pT7_*bglhi*_mut foi utilizado como molde para inserir os sítios de restrição *SnaBI* e *AvrII* nas posições inicial e final do gene *bglhi*, respectivamente. Dois pares de oligonucleotídeos contendo os sítios de restrição desejados, descritos em Material e Métodos (Tabela 3), foram utilizados.

Após PCR, o gene amplificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose, observando-se a presença de uma banda correspondente a aproximadamente 1500 pb, exatamente o tamanho esperado (Fig. 25).

Figura 25 - Eletroforese em gel de agarose (1,0 %, m/v) dos produtos da amplificação do gene *bglhi* para inserção dos sítios de restrição *Sna*BI e *Avr*II nas posições inicial e final do gene, respectivamente

(A) padrão de massa molecular aparente, (B) *bglhi* após amplificação com os oligonucleotídeos contendo os sítios de restrição *Sna*BI e *Avr*II nas posições inicial e final do gene, respectivamente.

A seguir, o gene amplificado e o vetor pPIC9kf1CT foram digeridos com as enzimas de restrição *Sna*BI e *Avr*II e submetidos a reação de ligação. Os produtos foram utilizados para transformar bactérias competentes *E. coli* DH5 α , e após o crescimento das células transformadas em meio LB sólido, realizou-se um PCR de colônia (com auxílio dos oligonucleotídeos NPIC e CPIC que anelam especificamente no vetor pPIC9kf1CT) para confirmação da presença do inserto no plasmídeo. A análise dos produtos obtidos por eletroforese em gel de agarose (Fig. 26) revelou a presença de um fragmento próximo a 1500 pb somente na colônia B, indicando a presença do inserto no plasmídeo. As demais colônias não continham o inserto (colônias vazias).

Figura 26 - Análise eletroforética dos produtos de PCR de colônias selecionadas de células DH5 α transformadas com o plasmídeo pT7_ *bglhi*_mut

A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1,0% (m/v), como descrito em Material e Métodos. (A) padrão de massa molecular aparente; (B – F) colônias de células DH5 α submetidas a PCR.

O DNA plasmidial do único clone positivo (Fig. 26, linha B) foi extraído, purificado e sequenciado automaticamente, para confirmação da inserção correta do gene *bglhi* (sem os sítios internos de *Stul*) no vetor pPIC9kf1CT. O novo plasmídeo foi então linearizado com a enzima *Stul* e submetido a etapas de transformação em células de *P. pastoris* GS115 eletrocompetentes. Após o crescimento das células transformadas em meio MD sólido, 15 colônias foram repicadas em meio MD sólido (Fig. 27) para manutenção das colônias.

Figura 27 - Colônias transformadas com o plasmídeo pPIC9kf1CT_ *bglhi*_mut

O plasmídeo pPIC9kf1CT_*bglhi*_mut linearizado foi utilizado para transformar células de *P. pastoris* GS115 eletrocompetentes. Quinze colônias (1-15) selecionadas da transformação foram repicadas em meio MD sólido para manutenção dos clones. C1: controle negativo (célula de *P. pastoris* transformada com vetor pPIC9kf1CT vazio).

As mesmas 15 colônias acima foram repicadas em meio MD seletivo para detecção de atividade β -glucosidásica (Fig. 28). De todas as colônias testadas, podemos ver que apenas três (6, 7, e 13) não apresentam halo escuro, como o controle (C1). Logo, todas as outras colônias de *P. pastoris* estão produzindo a β -glucosidase de interesse. A colônia 9 foi a escolhida para os testes de expressão em meio líquido.

Figura 28 - Detecção em meio sólido da expressão de β -glucosidases por colônias transformadas com o plasmídeo pPIC9kf1CT_ *bglhi*_mut

As colônias selecionadas da transformação do plasmídeo pPIC9kf1CT_ *bglhi*_mut em células de *P. pastoris* GS115 eletrocompetentes foram repicadas em meio MD sólido seletivo. C1: controle negativo (célula de *P. pastoris* transformada com vetor pPIC9kf1CT vazio). Flechas: colônias sem expressão de β -glucosidases.

3.3.7 Efeito do tempo e do meio de cultivo sobre a expressão da Bglhi^{PP}

Para a expressão em meio líquido, a cepa transformada escolhida (colônia 9, Figs. 27 e 28) foi crescida inicialmente em pré-inóculo e transferida para diferentes meios de expressão contendo metanol. A Figura 29 representa o efeito do tempo de cultivo e do tipo de meio de cultura sobre a expressão da Bglhi^{PP}. A produção da enzima foi máxima (17,54 U mL⁻¹ e 1754,2 U_{total}) quando se utilizou o meio BMMY induzindo a expressão da enzima com 1% (v/v) de metanol. A segunda melhor produção (11,23 U mL⁻¹ e 1123,0 U_{total}) foi alcançada no mesmo meio de cultura (BMMY), induzindo a expressão com 0,5% (v/v) de metanol, seguida das produções em meio YPM, 987,1 U_{total} e 894,8 U_{total}, utilizando 0,5% e 1% (v/v) de metanol, respectivamente. A expressão da enzima utilizando-se meio de cultura BMM foi cerca de 19 vezes menor, se comparada à melhor condição encontrada. Dessa forma,

aparentemente a adição de extrato de levedura e peptona ao meio de cultura foi essencial para a expressão da enzima.

Figura 29- Efeito do tempo e do meio de cultivo sobre a expressão da β -glucosidase de *H. insolens* em *P. pastoris*

A expressão da Bglhi^{PP} foi acompanhada por 12 dias em diferentes meios de cultura, empregando diferentes concentrações de metanol para indução, como descrito em Material e Métodos. Meios de cultura: (●) BMMY, metanol 1% (v/v), (○) BMMY, metanol 0,5% (v/v), (■) YPM, metanol 0,5%, (□) YPM, metanol 1% (v/v), (▲) BMM, metanol 1% (v/v), (△) BMM, metanol 0,5% (v/v).

3.3.8 Purificação e propriedades moleculares da Bglhi^{PP}

A purificação da enzima heteróloga foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel, com um rendimento de aproximadamente 60%. A análise da enzima purificada por PAGE revelou uma única banda proteica (Fig. 30, linha A),

coincidente com uma única banda de atividade β -glucosidásica (Fig. 30, linha B). A pureza da enzima recombinante foi confirmada por SDS-PAGE (Fig. 30, linha C).

A massa molecular aparente da enzima recombinante estimada por SDS-PAGE (Fig. 30, linha C) foi de 62 kDa.

Figura 30 - Análise eletroforética da Bglhi^{PP} por PAGE (A e B) e SDS-PAGE (C e D)

As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% em condições não desnaturantes (PAGE) e a 10 % em condições desnaturantes (SDS-PAGE), conforme descrito em Material e Métodos. (A, C e D) Revelação com Coomassie Brilliant Blue R; (B) Atividade β -glucosidásica no gel, revelada com esculina. (D) Padrão de massa molecular aparente. Nas linhas A e B foram aplicados 20 μ g de proteína e na linha C, 25 μ g.

A análise comparativa da Bglhi (Fig. 31, linha A) e Bglhi^{PP} (Fig. 31, linha B) revelou uma diferença de 3 kDa na massa molecular aparente, o que pode ser atribuído à presença de glicosilação na enzima recombinante produzida em *P. pastoris*.

Figura 31 - Análise por SDS-PAGE da Bglhi (A) e Bglhi^{PP} (B)

As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 10 % em condições desnaturantes (SDS-PAGE), conforme descrito em Material e Métodos. As bandas proteicas foram reveladas com Coomassie Brilliant Blue R. Nas linhas A e B foram aplicados 20 µg de proteína.

3.3.9 Análise dos possíveis sítios de glicosilação na sequência codificadora da β-glucosidase de *H. insolens* e estimativa do teor de carboidratos da Bglhi^{PP}

A análise da sequência de aminoácidos da β-glucosidase de *H. insolens* (Fig. 32) mostra apenas um possível sítio de N-Glicosilação (). Esse possível sítio também foi predito utilizando-se o programa NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). Já os possíveis sítios de O-glicosilação foram preditos utilizando-se o programa NetOGlyc 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) que apontou apenas um possível sítio na Ser¹⁸⁹ (Fig. 32). Dessa forma, Bglhi^{PP} deve ser pouco glicosilada, o que poderia justificar um aumento de massa molecular aparente de apenas 3 kDa em relação a Bglhi. De fato, o teor de carboidratos totais da Bglhi^{PP} foi estimado em 6% (m/m).

```
MSLPPDFKWWGFATAAYQIEGSVNEDGRGPSIWDTFCAIPGKIADGSSGAVACDS
YKRTKEDIALLLKELGANSYRFSISWSRIIPLGGRNDPINQKGIDHYVKFVDDLIEA
GITPFITLFHWDLPDALDKRYGGFLNKEEFAADFENYARIMFKAIPKCKHWITFN
EPWCSAILGYNTGYFAPGHTSDR SKSPVGDSAREPWIVGHNILIAHARAVKAYR
EDFKPTQGGGEIGITLNGDATLPWDPEDPADIEACDRKIEFAISWFADPIYFGKYP
DSMRKQLGDRLPEFTPEEVALVKGSNDFYGMNHYTANYIKHKTGVPPEDDFLG
NLETIFYNKYGDCIGPETQSFWLRPHAQGFRDLLNWLSKRYGYPKIYVTE NGTSL
KGENDMPLEQVLEDDFRVKYFNDYVRAMAAAVAEDGCNVRGYLAWSLLDNFE
WAEGYETRFGVTYVDYANDQKRYPKKSAKSLKPLFDSLIRKE
```

Figura 32 - Sequência de aminoácidos da β -glucosidase de *H. insolens* com identificação dos possíveis sítios de glicosilação

Em negrito e sublinhado está evidenciado o único possível sítio de N-Glicosilação presente na enzima e em vermelho indicado o possível sítio de O-Glicosilação.

3.3.10 Caracterização bioquímica e cinética da Bglhi^{Pp}

3.3.10.1 Efeito da temperatura e do pH sobre a atividade e a estabilidade da Bglhi^{Pp}

O efeito da temperatura sobre a atividade *p*NP-glucosidásica da enzima é mostrado na Figura 33A. Observa-se um aumento gradual da atividade específica entre 40 e 55 °C, atingindo um máximo em 55 °C. Acima desta temperatura, a atividade específica cai cerca de 29% da atividade máxima em 60 °C, chegando a praticamente zero em 65 °C.

Bglhi^{Pp} mostrou um platô de máxima atividade catalítica na faixa de pH de 5,5-6,5 como pode ser visto na Figura 33B. Além disso, manteve cerca de 84% da atividade máxima em pH 5,0 e 86% em pH 7,0.

Figura 33 - Efeito da temperatura (A) e do pH (B) sobre a atividade da Bglhi^{PP}

(A) A atividade foi determinada em diferentes temperaturas empregando tampão Bis-Tris 50 mmol L⁻¹, pH 6,0, contendo pNP-Glc 2 mmol L⁻¹ num volume final de 0,6 mL. (B) A atividade foi determinada a 50 °C, em meio reacional constituído de tampão Mcllvaine em diferentes valores de pH e pNP-Glc 2 mmol L⁻¹. Os valores apresentados representam a média $\pm$ desvio padrão dos valores calculados para três diferentes experimentos (n=3).

Bglhi^{PP} foi termoestável até 60 min a 45 °C, quando incubada em água e na ausência de substrato, com tempos de meia vida de 60 min a 50 °C e de menos de 5 min a 55 °C (Fig. 34A). Quanto à estabilidade da enzima quando incubada em diferentes pHs (Fig. 34B), mais de 90% da atividade máxima foi mantida na faixa de

pH de 4,5-8,0. Porém, houve uma queda brusca de 65% da atividade máxima em pH 4,0, indicando a grande sensibilidade da enzima a pHs mais ácidos (abaixo de 4,5).

Figura 34 - Estabilidade térmica (A) e ao pH (B) da Bglhi^{Pp}

(A) A enzima foi incubada em água em diferentes temperaturas e após intervalos de tempo adequados a atividade residual foi determinada a 50 °C em meio reacional constituído de tampão Bis-Tris 50 mmol L⁻¹, pH 6,0, contendo pNP-Glc 2 mmol L⁻¹. A atividade controle (100%) correspondeu a 37,1 U mg⁻¹. Temperaturas de incubação: (●) 45 °C, (●) 50 °C, (●) 55 °C. (B) A enzima foi mantida em geladeira por 24 h em tampão McIlvaine com pH ajustado na faixa de 3,0 a 8,0. Após este intervalo de tempo, a atividade residual foi estimada como descrito anteriormente. A atividade controle (100%) corresponde àquela determinada para a enzima submetida às mesmas condições, em água (37,3 U mg⁻¹). Os valores apresentados representam a média ± desvio padrão dos valores calculados para três diferentes experimentos (n=3).

3.3.10.2 Especificidade de substrato da Bglhi^{PP}

A especificidade de substrato da enzima recombinante foi analisada empregando diferentes substratos sintéticos (*p*NP-Glc, *p*NP-Gal, *p*NP-Xil e salicina), além de vários substratos naturais (Tabela 4). A enzima hidrolisou todos os substratos com ligações glicosídicas em configuração β , independente da presença de glicose, indicando alta especificidade para o tipo de ligação e não para o resíduo de glicose. Entretanto, não foram hidrolisados substratos poliméricos, mesmo apresentando monômeros de glicose ligados entre si por ligações glicosídicas em configuração β , como CMC e Avicel.

Tabela 4: Especificidade de substrato da β -glucosidase de *H. insolens* expressa em *P. pastoris*

Substrato	Atividade (%)	Tipo de ligação
Celobiose	100	Glicose $\beta 1 \rightarrow 4$
<i>p</i> NP-Glc	39,8	Glicose $\beta 1$
<i>p</i> NP-Gal	13,3	Galactose $\beta 1$
<i>p</i> NP-Xil	2,6	Xilose $\beta 1$
Salicina	5,6	Glicose $\beta 1$
Lactose	10,7	Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc
Maltose	ND	Glc($\alpha 1 \rightarrow 4$)Glc
Trealose	ND	Glc($\alpha 1 \rightarrow 1\alpha$)Glc
Sacarose	ND	Glc($\alpha 1 \rightarrow 2\beta$)Fru
CMC	ND	Glicose $\beta 1 \rightarrow 4$
Avicel	ND	Glicose $\beta 1 \rightarrow 4$

A atividade foi determinada a 50 °C, em tampão Bis-Tris 50 mmol L⁻¹, pH 6,0. A hidrólise dos substratos, em concentração final 5 mmol L⁻¹, foi avaliada por até 2 h. O controle (100%) correspondeu a 95,7 U mg⁻¹. (ND) – não detectável nas condições de medida. Os valores apresentados representam a média dos valores calculados para três diferentes experimentos (n=3).

3.3.10.3 Determinação dos parâmetros cinéticos para estimulação da Bglhi^{Pp} por pNP-Glc e celobiose

Uma curva simples de saturação foi observada para a estimulação da atividade da Bglhi^{Pp} por pNP-Glc (Fig. 35A). Os parâmetros cinéticos determinados foram $V_{\max} = 38,9 \pm 1,9 \text{ U mg}^{-1}$ e $K_{0,5} = 0,17 \pm 0,01 \text{ mmol L}^{-1}$, e a estimulação ocorreu com cooperatividade positiva ($n_H = 1,1$). Para o substrato natural celobiose (Fig. 35B), a atividade máxima ($98,4 \pm 3,9 \text{ U mg}^{-1}$) foi cerca de 2,5 vezes maior que aquela estimada para o pNP-Glc e a estimulação da atividade também ocorreu com cooperatividade positiva ($n_H = 1,2$). Porém, a afinidade aparente da enzima por celobiose ($0,32 \pm 0,02 \text{ mmol L}^{-1}$) foi cerca de 1,9 vezes menor que para o substrato sintético. A eficiência de utilização dos substratos, avaliada pela razão $k_{\text{cat}}/K_{0,5}$, mostrou que a celobiose ($k_{\text{cat}}/K_{0,5} = 308,1 \text{ L s}^{-1} \text{ mmol}^{-1}$) foi um melhor substrato para Bglhi^{Pp}, comparada ao pNP-Glc ($k_{\text{cat}}/K_{0,5} = 229,5 \text{ L s}^{-1} \text{ mmol}^{-1}$).

Figura 35 - Estimulação da atividade da Bglhi^{Pp} por pNP-Glc (A) e celobiose (B)

A atividade foi determinada a 50 °C em tampão Bis-Tris 50 mmol L⁻¹, pH 6,0 e a reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio reacional, conforme descrito em Material e Métodos.

3.3.10.4 Efeito de diferentes carboidratos sobre a atividade pNP-glucosidásica da Bglhi^{Pp}

O efeito de diversos carboidratos, em concentração final 50 mmol L⁻¹ no meio reacional, sobre a atividade pNP-glucosidásica da Bglhi^{Pp} está apresentado na Tabela

5. Podemos observar que a atividade é praticamente insensível a presença da maioria dos carboidratos testados e foi estimulada cerca de 1,9 vezes na presença de glicose e xilose.

Tabela 5: Efeito de diferentes carboidratos sobre a atividade *p*NP-glucosidásica da Bglhi^{PP}

Carboidratos (50 mmol L⁻¹)	Atividade (%)
Controle*	100
Glicose	190
Xilose	195
Manose	120
Frutose	107
Ribose	105
Galactose	116
Lactose	84
Arabinose	78
Maltose	76
Sacarose	98

*A atividade controle (100%) foi determinada em ausência de carboidratos livres no meio reacional e correspondeu a 37,1 U mg⁻¹.

Os valores apresentados representam a média dos valores calculados para três diferentes experimentos (n=3).

3.3.10.5 Análise cinética da estimulação da atividade *p*NP-glucosidásica da Bglhi^{PP} por glicose e xilose

O efeito de concentrações crescentes de glicose e xilose na faixa de 0-1000 mmol L⁻¹ sobre a atividade *p*NP-glucosidásica da Bglhi^{PP}, empregando *p*NP-Glc como substrato, é mostrado na Figura 36.

Figura 36 - Efeito da concentração de glicose (A) e xilose (B) sobre a atividade p NP-glucosidásica da Bglhi^{Pp}

A atividade foi determinada a 50 °C em meio reacional constituído de tampão Bis-Tris 50 mmol L^{-1} , pH 6,0, contendo p NP-Glc 2 mmol L^{-1} e concentrações crescentes de glicose (A) ou xilose (B). A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio reacional, conforme descrito em Material e Métodos.

Observa-se que ocorreu estimulação da atividade enzimática por glicose até um máximo de 1,9 vezes em concentração 50 mmol L^{-1} (Fig. 36A). Similarmente, a atividade foi estimulada por xilose na faixa de 80-150 mmol L^{-1} (Fig. 36B). Acima destas concentrações ótimas, entretanto, ocorreu uma diminuição do efeito

estimulatório, embora valores abaixo do controle, caracterizando inibição da atividade enzimática, só tenham sido observados em concentrações dos monossacarídeos acima de 300 mmol L⁻¹ para glicose e de 750 mmol L⁻¹ para xilose. O IC₅₀ determinado para glicose foi de aproximadamente 750 mmol L⁻¹ enquanto para xilose, cerca de 64% da atividade controle foi preservada mesmo em presença de xilose em concentração 1 mol L⁻¹, não sendo possível estimar esse valor.

Na Figura 37 está apresentada a estimulação da atividade *p*NP-glucosidásica da Bglhi^{Pp} por glicose (Fig. 37A) e por xilose (Fig. 37B), em presença de concentração saturante de substrato (2 mmol L⁻¹).

Os parâmetros cinéticos calculados para a estimulação da atividade *p*NP-glucosidásica da Bglhi^{Pp} por glicose e xilose estão reunidos na Tabela 6. Em condições saturantes de *p*NP-Glc, a constante de afinidade aparente de Bglhi^{Pp} para a glicose (9,0 ± 0,2 mmol L⁻¹) foi cerca de 1,7 vezes menor que aquela determinada para a xilose (15,5 ± 0,6 mmol L⁻¹). Além disso, glicose e xilose estimularam a atividade enzimática cerca 1,8 vezes quando comparada à atividade estimada na ausência dos monossacarídeos (38,9 ± 1,9 U mg⁻¹). É interessante notar que, nos dois casos, a estimulação da atividade pelos monossacarídeos ocorreu com cooperatividade positiva, sugerindo que há pelo menos 2 sítios aos quais os monossacarídeos podem se ligar, supostamente o SC e SM.

Figura 37 - Estimulação da atividade $p\text{NP}$ -glucosidásica da Bglhi^{PP} por glicose (A) e xilose (B)

A atividade foi determinada a 50 °C em meio reacional constituído de tampão Bis-Tris 50 mmol L^{-1} , pH 6,0, contendo $p\text{NP-Glc}$ 2 mmol L^{-1} e concentrações crescentes de glicose (A) ou xilose (B). A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio reacional, conforme descrito em Material e Métodos.

Tabela 6: Parâmetros cinéticos calculados para a estimulação da atividade pNP-glucosidásica da Bglhi^{Pp} por glicose e xilose em concentração saturante de pNP-Glc

Monossacarídeo	V _{max} (U mg ⁻¹)	K _{Glicose} (mmol L ⁻¹)	K _{Xilose} (mmol L ⁻¹)	η _H
Glicose (1-100 mmol L ⁻¹)	70,5 ± 2,1	9,0 ± 0,2	-	1,4
Xilose (1-200 mmol L ⁻¹)	71,6 ± 2,9	-	15,5 ± 0,6	1,3

A atividade foi determinada a 50 °C em meio reacional constituído de tampão Bis-Tris 50 mmol L⁻¹, pH 6,0, contendo pNP-Glc 2 mmol L⁻¹ e diferentes concentrações dos monossacarídeos. A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio reacional, conforme descrito em Material e Métodos.

A estimulação da atividade da Bglhi^{Pp} por pNP-Glc em presença de concentrações estimulatórias fixas de glicose (50 mmol L⁻¹, Fig. 38A) ou xilose (100 mmol L⁻¹, Fig. 38B) também foi investigada. A estimulação ocorreu com cooperatividade positiva e os parâmetros cinéticos calculados estão apresentados na Tabela 7. Em presença de glicose ou xilose, houve um aumento de 2,5 vezes no valor da constante de afinidade aparente para o substrato, sugerindo que os monossacarídeos competem com o substrato pela ligação ao sítio ativo.

Figura 38 - Estimulação da atividade da Bglhi^{Pp} por pNP-Glc em presença de concentrações estimulatórias fixas de glicose (A) ou xilose (B)

A atividade foi determinada a 50 °C em meio reacional constituído de tampão Bis-Tris 50 mmol L⁻¹, pH 6,0, em presença de concentrações estimulatórias fixas de glicose (50 mmol L⁻¹, A) ou xilose (100 mmol L⁻¹, B). A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio reacional, conforme descrito em Material e Métodos.

Tabela 7 - Parâmetros cinéticos calculados para a estimulação da atividade β -glucosidásica da Bglhi^{Pp} por pNP-Glc em presença de concentrações estimulatórias fixas de glicose e xilose

Parâmetros	Controle	Glicose	Xilose
		50 mmol L ⁻¹	100 mmol L ⁻¹
$V_{\max}$ (U mg ⁻¹)	38,9 $\pm$ 1,9	75,9 $\pm$ 2,3	79,4 $\pm$ 3,1
n_H	1,1	1,4	1,5
$K_{0,5}$ (mmol L ⁻¹)	0,2 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,2

A atividade foi determinada a 50 °C em meio reacional constituído de tampão Bis-Tris 50 mmol L⁻¹, pH 6,0, na ausência (controle) ou presença de concentrações estimulatórias fixas de glicose (50 mmol L⁻¹) ou xilose (100 mmol L⁻¹). A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio reacional, conforme descrito em Material e Métodos.

3.4 Discussão

Esta parte do trabalho consistiu na subclonagem do gene *bglhi* e expressão da enzima recombinante em *P. pastoris* (Bglhi^{Pp}). O gene *bglhi* já havia sido anteriormente clonado em nosso grupo de pesquisa e a enzima recombinante (Bglhi) foi expressa primeiramente em *E. coli* (SOUZA et al., 2014). Além disso, conforme destacado no Capítulo 1, o gene *bglhi* apresentou 100% de similaridade com o gene que codifica para uma das β -glucosidases de *H. grisea* var. *thermoidea* (BGL4) que foi expressa em *A. oryzae* (BGL4^{AO}, TAKASHIMA et al., 1999) e *S. cerevisiae* (BGL4^{Sc}, BENOLIEL et al., 2010). Dessa forma, foi possível comparar as propriedades bioquímicas e cinéticas das β -glucosidases expressas em diferentes sistemas de expressão.

A subclonagem do gene *bglhi* no vetor pPIC9kf1CT foi realizada com sucesso após duas etapas de mutações sítio-dirigidas para eliminação de dois sítios internos da enzima *Stul*. As condições de expressão da Bglhi^{Pp} foram otimizadas e a produção atingiu 1754,2 U_{total} após 12 dias de cultivo em meio BMMY induzido com 1% (v/v) de metanol. Outras β -glucosidases já foram expressas em *P. pastoris* e níveis de expressão muito elevados foram relatados. Os níveis de produção de β -glucosidases de *T. reesei* (CHEN et al., 2011) e de *Phanerochaete chrysosporium* (KAWAI et al., 2003) foram cerca de 3,5 e 1,4 vezes maiores, respectivamente, quando comparados aos obtidos na melhor condição de expressão padronizada para Bglhi^{Pp}. Por outro lado, nossa produção foi cerca de 500 vezes maior que aquela relatada para uma β -glucosidase de *Nasutitermes takasagoensis*, tolerante a glicose (UCHIMA et al., 2012). As β -glucosidases de *Thermoascus aurantiacus* (HONG; TAMAKI; KUMAGAI, 2007), *Aspergillus fumigatus* Z5 (LIU, D. et al., 2012) e *Myceliophthora thermophila* (ZHAO et al., 2015) também foram expressas em *P. pastoris*, igualmente em níveis menores, comparadas aos obtidos neste trabalho.

Comparando a eficiência dos dois sistemas de expressão testados em nosso grupo de pesquisa (*P. pastoris* e *E. coli*) para a produção da β -glucosidase de *H. insolens*, observou-se que a produção em *P. pastoris* foi cerca de 1,7 vezes maior.

Porém, enquanto o tempo de expressão em *E. coli* foi de apenas 5 h, a expressão máxima em *P. pastoris* foi atingida após 264 h. Entretanto, o inconveniente da expressão de enzimas recombinantes em *E. coli* é a ausência de modificações pós-traducionais, o que pode afetar as propriedades das enzimas (BROADWAY, 2012). De modo bastante interessante, porém, a ausência de glicosilação da Bglhi não afetou de maneira importante as propriedades da enzima, quando comparadas às da enzima nativa, que apresenta um conteúdo de carboidratos totais ligados de cerca de 21% (SOUZA et al., 2014).

A massa molecular aparente determinada para a Bglhi^N foi de 54-55 kDa (SOUZA et al., 2013, 2010). As enzimas recombinantes estudadas por nosso grupo apresentaram massas moleculares superiores: 62 kDa para Bglhi^{Pp} e 59 kDa para Bglhi (SOUZA et al., 2014). Essa diferença pode ser atribuída à presença da cauda de polihistidinas (aproximadamente 2,1 kDa) presente na região N-terminal da Bglhi e C-terminal da Bglhi^{Pp}. O aumento na massa molecular da Bglhi^{Pp} em relação a Bglhi pode ser atribuído à glicosilação. *Pichia pastoris* pode modificar uma cadeia proteica com os tipos principais de glicosilações, N-Glicosilação e O-Glicosilação. As glicosilações do tipo N ocorrem no aminoácido asparagina, no interior da sequência consenso Asn- Xaa-Ser/Thr, tanto em eucariotos (ROTH et al., 1988; OSAWA; TSUJI, 1987; SHARON; LIS, 1982) quanto em procariotos (DELL et al., 2010), onde Xaa pode ser qualquer aminoácido, exceto prolina, entretanto a ocorrência desta sequência não é uma condição obrigatória para que ocorra a glicosilação de fato. Porém, o teor de carboidratos estimado para Bglhi^{Pp} foi de apenas 6% (m/m), muito abaixo daquele estimado para Bglhi^N, de 21% (SOUZA et al., 2013, 2010). Embora com um conteúdo menor de carboidratos, Bglhi^{Pp} apresentou uma massa molecular aparente maior que a determinada para Bglhi^N, em SDS-PAGE. Porém, proteínas glicosiladas apresentam migração anômala em gel de SDS-PAGE (STOYANOV; ZHUKOV; RIGHETTI, 2001), além disso, o padrão de glicosilação inserido por *P. pastoris* difere daquele inserido pelo fungo *H. insolens*. BGL4^{AO} (TAKASHIMA et al., 1999) e BGL4^{Sc} (BENOLIEL et al., 2010) também apresentam massas moleculares superiores à massa molecular deduzida a partir da sequência de aminoácidos. No caso da BGL4^{AO}, os autores atribuíram o fato à presença de glicosilação inserida pelo hospedeiro (TAKASHIMA et al., 1999). De fato, as diferenças observadas nas massas moleculares das enzimas

recombinantes quando comparadas à enzima nativa podem ser atribuídas as glicosilações inseridas pelos hospedeiros, mas apenas um estudo detalhado das posições e dos conteúdos de carboidratos inseridos por cada hospedeiro traria informações conclusivas a esse respeito.

Independentemente do conteúdo de carboidratos, conforme descrito para a enzima nativa, as enzimas recombinantes são monoméricas (SOUZA et al., 2013). De fato, a maioria das β -glucosidases estimuladas por glicose são monoméricas e apresentam massa molecular na faixa de 40-60 kDa (Tabela 8). A única exceção é a β -glucosidase de *Penicillium funiculosum* NCL1 que apresenta uma massa molecular de 130 kDa. Porém, essa enzima é a única representante da família 3 das GH entre as enzimas estimuladas por glicose (RAMANI et al., 2015).

A temperatura ótima da Bglhi^{Pp} foi cerca de 5 °C inferior àquela determinada para as enzimas Bglhi^N e Bglhi (SOUZA et al., 2014, 2010). BGL4^{Ao} apresentou temperatura ótima de atividade idêntica à determinada para Bglhi^{Pp} (TAKASHIMA et al., 1999) enquanto BGL4^{Sc} apresentou uma temperatura ótima de apenas 40 °C (BENOLIEL et al., 2010). Logo, os diferentes sistemas de expressão tiveram grande influência nessa propriedade da enzima. Temperaturas ótimas similares foram encontradas para outras β -glucosidases estimuladas por glicose, embora algumas exceções também tenham sido notadas (Tabela 8).

Similarmente ao encontrado para Bglhi^N (SOUZA et al., 2010), Bglhi (SOUZA et al., 2014) e Bglhi^{Pp}, as enzimas BGL4^{Ao} (TAKASHIMA et al., 1999) e BGL4^{Sc} (BENOLIEL et al., 2010) mostraram pH ótimos de reação de 6,0. Porém estas enzimas mostraram-se mais estáveis na faixa de pHs mais alcalinos, enquanto Bglhi^N, Bglhi e Bglhi^{Pp} mostraram-se estáveis na faixa de pH de 4,5-8,0. A maioria das β -glucosidases estimuladas por glicose apresentam pH ótimo entre 5,0 e 7,0 (Tabela 8), com exceção para β -glucosidase de origem metagenômica que apresentou pH ótimo de reação de 8,0 (BIVER et al., 2014).

As condições ótimas de pH e temperatura tanto da enzima nativa como das formas recombinantes produzidas em nosso grupo de pesquisa sugerem o grande potencial dessas enzimas para o processo de hidrólise da celulose.

Tabela 8: Propriedades moleculares e bioquímicas de β -glucosidases estimuladas por glicose

Enzima/ Fonte	Hospedeiro	MW (kDa)	Família	pH ótimo/ temperatura ótima	Referências
Bglhi^{Pp}/ <i>Humicola insolens</i>	<i>P. pastoris</i>	62	GH1	5,5-6,5/ 55 °C	Este trabalho
Bglhi/ <i>Humicola insolens</i>	<i>E. coli</i>	59	GH1	5,0-7,0/ 60 °C	SOUZA et al., 2014
Bglhi ^N / <i>Humicola insolens</i>	Nativa	55,0	GH1	6,0-6,5/ 60 °C	SOUZA et al., 2013, 2010
<i>BglA</i> / <i>Thermotoga naphthophila</i> RKU-10T	<i>E. coli</i>	51,5	GH1	7,0/ 95 °C	AKRAM et al., 2016
<i>EaBgl1A</i> / <i>Exiguobacterium antarcticum</i> B7	<i>E. coli</i>	~53,9	GH1	7,0/ 30°C	CRESPIM et al., 2016
L167W/P172L/ mutante de Cel1A	<i>E. coli</i>	50,0	GH1	5,0-7,0/ 55 °C	GUO; AMANO; NOZAKI, 2016
L167W/P172L/P338F/ mutante de Cel1A	<i>E. coli</i>	50,0	GH1	5,0/ 55 °C	
MeBglD2/ Metagenoma	<i>E. coli</i>	NI	GH1	6,0/ 60 °C	MATSUZAWA; YAIIO, 2016a
Bgl6/ Metagenoma	<i>E. coli</i>	51,5	GH1	-	CAO, L. C. et al., 2015b

Tabela 8: Propriedades moleculares e bioquímicas de β -glucosidases estimuladas por glicose

(continuação)

Enzima/ Fonte	Hospedeiro	MW (kDa)	Família	pH ótimo/ temperatura ótima	Referências
TpBgl1/ <i>Thermotoga petrophila</i>	<i>E. coli</i>	51,5	GH1	6,0/ > 80°C	COTA et al., 2015
GH1-1/ <i>Neurospora crassa</i>	<i>E. coli</i>	54,2	GH1	5,5-6,5/ 40-45 °C	MELEIRO et al., 2015
Bgl4/ <i>Penicillium funiculosum</i> NCL1	<i>P. pastoris</i>	130	GH3	5,0/ 50 °C	RAMANI et al., 2015
Ks5A7/ metagenoma	<i>E. coli</i>	54	GH1	5,0-6,0/ 50 °C	UCHIYAMA et al., 2015
BGL/ <i>Thermoanaerobacterium aotearoense</i> P8G3#4	<i>E. coli</i>	49,1	GH1	6,0/ 60 °C	YANG, F. et al., 2015
AS-Esc10/ Metagenoma	<i>E. coli</i>	54,8	GH1	8,0/ 60 °C	BIVER et al., 2014
Unbgl1A/ metagenoma	<i>E. coli</i>	51,7	GH1	6,0/ 50°C	LU et al., 2013
r-BglNH/ <i>Streptomyces</i> sp. SCSIO 04578	<i>E. coli</i>	51	GH1	6,0/ 45°C	MAI et al., 2013
Td2F2/ Metagenoma	<i>E. coli</i>	52,0	GH1	5,5/ 75 °C	UCHIYAMA et al., 2013

Tabela 8: Propriedades moleculares e bioquímicas de β -glucosidases estimuladas por glicose (conclusão)

Enzima/ Fonte	Hospedeiro	MW (kDa)	Família	pH ótimo/ temperatura ótima	Referências
G1NkBG/ <i>Neotermes kosshunensis</i>	<i>A. oryzae</i>	60	GH1	5,0/ 50 °C	UCHIMA et al., 2011
-/ <i>Humicola. grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	nativa	60,0	NI	6,0/ 50 °C	NASCIMENTO et al., 2010
Bgl1A/ Metagenoma	<i>E. coli</i>	51,0	GH1	6,5/ 40 °C	FANG et al., 2010
-/ <i>Scytalidium thermophilum</i>	Nativa	40,0	NI	6,5/ 60 °C	ZANOELO et al., 2004
-/ <i>Streptomyces</i> sp. QM-B814	Nativa	42,0	NI	6,0-6,5/ 50°C	PÉREZ-PONS et al. 1995

O substrato utilizado nas dosagens foi pNP-Glc.

NI – Dado não informado pelos autores.

Surpreendentemente, Bglhi^{PP} foi menos termoestável quando comparada às enzimas Bglhi^N e Bglhi (SOUZA et al., 2014, 2013, 2010). Além disso, as enzimas BGL4^{Ao} (TAKASHIMA et al., 1999) e BGL4^{Sc} (BENOLIEL et al., 2010), ambas glicosiladas, também foram muito sensíveis à temperatura. A glicosilação geralmente aumenta a estabilidade térmica das enzimas, possivelmente protegendo algumas regiões instáveis, como dobradiças ou o sítio ativo. No entanto, o efeito da glicosilação sobre a resistência das enzimas à exposição ao calor é muito variável, e algumas enzimas tiveram sua estabilidade térmica diminuída ou não afetada quando deglicosiladas ou expressa com um conteúdo de carboidratos inferior (SKROPETA, 2009; BROWN et al., 2007). Diferenças de glicosilação também foram apontadas como as principais responsáveis por mudanças na temperatura ótima de reação (20 °C inferior) de uma endoglucanase de *Macrophomina phaseolina* expressa em *S. cerevisiae*, quando comparada à mesma enzima expressa em *E. coli* (WANG; JONES, 1999). De fato, o conteúdo de carboidratos parece influenciar muito a termoestabilidade da Bglhi. Um estudo de glicosilação sítio-dirigida poderia contribuir muito para o entendimento das posições cruciais de glicosilação que poderiam melhorar essa propriedade na enzima.

Com algumas exceções (CRESPIM et al., 2016; GUO; AMANO; NOZAKI, 2016; MELEIRO et al., 2015; UCHIYAMA et al., 2015; BIVER et al., 2014; MAI et al., 2013; UCHIMA et al., 2011; FANG et al., 2010;), a maioria das β -glucosidases estimuladas por glicose mostraram-se mais termoestáveis que Bglhi^{PP} (CAO, L. C. et al., 2015b; RAMANI et al., 2015; YANG, F. et al., 2015; UCHIYAMA et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2010; ZANOELO et al., 2004; PÉREZ-PONS et al. 1995). A β -glucosidase de *Thermotoga naphthophila*, por exemplo, apresentou temperatura ótima de 90-95 °C e foi completamente estável por pelo menos 8 h a 80 °C (AKRAM et al., 2016).

Bglhi^{PP} hidrolisou a mesma gama de substratos que as enzimas Bglhi^N (SOUZA et al., 2010) e Bglhi (SOUZA et al., 2014), além da celobiose ter sido o melhor substrato para todas. Propriedades similares foram descritas para outras β -glucosidases estimuladas por glicose (AKRAM et al., 2016; BIVER et al., 2014; UCHIYAMA et al., 2013; UCHIMA et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2010; ZANOELO et al., 2004; PÉREZ-PONS et al. 1995).

Os valores dos parâmetros cinéticos determinados para estimulação da Bglhi^{Pp} por *p*NP-Glc e celobiose estão reunidos na Tabela 9, juntamente com aqueles determinados para Bglhi^N (SOUZA et al., 2010), Bglhi (SOUZA et al., 2014), BGL4^{Sc} (BENOLIEL et al., 2010) e BGL4^{Ao} (TAKASHIMA et al., 1999). Podemos notar que as velocidades máximas de hidrólise do substrato sintético foram muito próximas para Bglhi^{Pp} e Bglhi, e cerca de 1,5 vezes maiores quando comparadas à estimada para a enzima nativa e para BGL4^{Ao}. A menor velocidade máxima de hidrólise para este substrato foi estimada para BGL4^{Sc}, apenas 6,72 U mg⁻¹. Já as afinidades aparentes das cinco enzimas por esse substrato foram similares. Considerando o substrato natural, Bglhi apresentou maior atividade máxima (183,4 ± 12 U.mg⁻¹), seguida da Bglhi^{Pp} (98,4 ± 3,9 U.mg⁻¹) e Bglhi^N (86,0 ± 6,9 U.mg⁻¹). Já a afinidade aparente para esse substrato foi próxima entre as enzimas recombinantes, e maiores que a determinada para a enzima nativa. Os parâmetros cinéticos para estimulação das atividades das enzimas BGL4^{Sc} e BGL4^{Ao} com este substrato não foram avaliados pelos autores. De maneira geral, podemos concluir que a expressão heteróloga da enzima fúngica não teve efeito pronunciado no reconhecimento e interação dos substratos com o sítio ativo, mas afetou as constantes de velocidade em um ou mais passos catalíticos.

Tabela 9: Parâmetros cinéticos calculados para a estimulação por *p*NP-Glc e celobiose da Bglhi^{Pp}, Bglhi, Bglhi^N, BGL4^{Sc} e BGL4^{Ao}

Substrato	Enzima	Vmax (μmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	K _{0,5} (mmol L ⁻¹)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} / K _{0,5} (L mmol ⁻¹ s ⁻¹)
<i>p</i> NP-Glc	Bglhi ^{Pp}	38,9 ± 1,9	0,17 ± 0,01	39,0	229,5
	Bglhi	36,4 ± 1,4	0,20 ± 0,01	33,9	169,3
	Bglhi ^N	22,4 ± 1,0	0,22 ± 0,01	20,1	91,6
	BGL4 ^{Sc}	6,72	0,16	6,4	39,9
	BGL4 ^{Ao}	25,0	0,32	23,7	74,2
Celobiose	Bglhi ^{Pp}	98,4 ± 3,9	0,32 ± 0,02	98,6	308,1
	Bglhi	183,4 ± 12	0,38 ± 0,02	172,1	453,0
	Bglhi ^N	86,0 ± 6,9	0,51 ± 0,04	77,4	151,8

Uma das características mais interessantes dessa enzima em estudo é a maior velocidade máxima para hidrólise de celobiose, comparada ao *p*NP-Glc. Salvo algumas exceções, a maioria das β -glucosidases estimuladas por glicose conhecidas não apresentam essa característica (Tabela 10). Porém, embora as velocidades máximas de hidrólise do *p*NP-Glc sejam superiores à da celobiose, algumas velocidades muito altas para o substrato natural foram relatadas, como é o caso das β -glucosidases de *Thermotoga naphthophila* RKU-10T (AKRAM et al., 2016) e *Penicillium funiculosum* NCL1 (RAMANI et al., 2015). Além dessas duas enzimas, apenas a β -glucosidase de *Thermoanaerobacterium aotearoense* P8G3#4 (YANG, F. et al., 2015) apresentou velocidade máxima de hidrólise da celobiose superior às relatadas para nossas enzimas. Esta é uma característica cinética particularmente relevante que reforça a aplicação industrial desta enzima em processos de sacarificação de celulose.

Tabela 10: Parâmetros cinéticos para a estimulação por pNP-Glc e celobiose das β -glucosidasas estimuladas por glicose

Enzima/ Fonte	Hospedeiro	Vmax ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	K _{0,5} (mmol L ⁻¹)	k _{cat} / K _{0,5} (L mmol ⁻¹ s ⁻¹)	Referências
Bglhi^{Pp}/ <i>Humicola insolens</i>	<i>P. pastoris</i>	38,9 98,4	0,17 0,32	229,5 308,1	Este trabalho
Bglhi/ <i>Humicola insolens</i>	<i>E. coli</i>	36,4 183,4	0,20 0,38	169,3 453,0	SOUZA et al., 2014
Bglhi ^N / <i>Humicola insolens</i>	Nativa	22,4 86,0	0,22 0,51	91,6 151,8	SOUZA et al., 2013, 2010
BglA/ <i>Thermotoga naphthophila</i> RKU-10T	<i>E. coli</i>	297000 263,0	1,5 7,76	1018518,7 174,3	AKRAM et al., 2016
EaBgl1A/ <i>Exiguobacterium antarcticum</i> B7	<i>E. coli</i>	36,7 15,4	1,07 6,18	30,8 1,12	CRESPIM et al., 2016
L167W/P172L/ mutante de Cel1A	<i>E. coli</i>	13,3 NI	0,23 NI	48,2 NI	GUO; AMANO; NOZAKI, 2016
MeBglD2/ Metagenoma	<i>E. coli</i>	NI NI	0,49 $\pm$ 0,07 NI	63,7 NI	MATSUZAWA; YAIIO, 2016a
Bgl6/ Metagenoma	<i>E. coli</i>	NI 25,05	NI 38,45	NI 0,56	CAO, L. C. et al., 2015b
M3/ mutante de Bgl6	<i>E. coli</i>	NI 96,83	NI 49,19	NI 1,69	

Tabela 10: Parâmetros cinéticos para a estimulação por pNP-Glc e celobiose das β -glucosidases estimuladas por glicose (continuação)

Enzima/ Fonte	Hospedeiro	Vmax ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	K _{0,5} (mmol L ⁻¹)	k _{cat} / K _{0,5} (L mmol ⁻¹ s ⁻¹)	Referências
V174C/ mutante de Bgl6	<i>E. coli</i>	NI 56,45	NI 45,07	NI 1,07	CAO, L. C. et al., 2015b
A404 V/ mutante de Bgl6	<i>E. coli</i>	NI 37,25	NI 50,52	NI 0,63	
L441F/ mutante de Bgl6	<i>E. coli</i>	NI 17,16	NI 25,91	NI 0,57	
TpBgl1/ <i>Thermotoga petrophila</i>	<i>E. coli</i>	321,5 NI	0,28 NI	985,7 NI	COTA et al., 2015
GH1-1/ <i>Neurospora crassa</i>	<i>E. coli</i>	16,1 52,0	0,28 0,21	51,8 223,8	MELEIRO et al., 2015
Bgl4/ <i>Penicillium funiculosum</i> NCL1	<i>P. pastoris</i>	3332 2083	2,5 1,25	2887,7 3610,5	RAMANI et al., 2015
Ks5A7/ Metagenoma	<i>E. coli</i>	90,8 155	0,078 0,358	1045 386	UCHIYAMA et al., 2015
BGL/ <i>Thermoanaerobacterium aotearoense</i> P8G3#4	<i>E. coli</i>	180,6 740,5	0,66 25,45	226,33 314,4	YANG, F. et al., 2015

Tabela 10: Parâmetros cinéticos para a estimulação por pNP-Glc e celobiose das β -glucosidases estimuladas por glicose (continuação)

Enzima/ Fonte	Hospedeiro	Vmax ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	K _{0,5} (mmol L ⁻¹)	k _{cat} / K _{0,5} (L mmol ⁻¹ s ⁻¹)	Referências
AS-Esc10/ Metagenoma	<i>E. coli</i>	7,9 2,2	0,2 16,9	35,5 0,12	BIVER et al., 2014
Unbgl1A/ Metagenoma	<i>E. coli</i>	183,9 NI	2,09 NI	75,8 NI	LU et al, 2013
r-BglNH/ <i>Streptomyces</i> sp. SCSIO 04578	<i>E. coli</i>	24,1 NI	10,9 NI	1,88 NI	MAI et al, 2013
Td2F2/ Metagenoma	<i>E. coli</i>	13,8 8,23	0,39 4,44	30,6 1,61	UCHIYAMA et al., 2013
G1NkBG/ <i>Neotermes koshunensis</i>	<i>A. oryzae</i>	16 NI	0,77 NI	20,8 NI	UCHIMA et al., 2011
Bgl1A/ Metagenoma	<i>E. coli</i>	50,7 15,5	0,39 20,4	108,2 0,63	FANG et al., 2010
-/ <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	Nativa	41,3 28,7	0,12 0,27	344,4 106,4	NASCIMENTO et al., 2010
-/ <i>Scytalidium thermophilum</i>	Nativa	13,27 4,12	0,29 1,61	8,8 2,7	ZANOELO et al., 2004

Tabela 10: Parâmetros cinéticos para a estimulação por pNP-Glc e celobiose das β -glucosidases estimuladas por glicose
(conclusão)

Enzima/ Fonte	Hospedeiro	Vmax ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	$K_{0,5}$ (mmol L^{-1})	$k_{\text{cat}}/K_{0,5}$ ($\text{L mmol}^{-1} \text{s}^{-1}$)	Referências
-/	Nativa	0,45 ^a /7,1 ^b	0,12 ^a /8,7 ^b	2,6 ^a /0,6 ^b	PÉREZ-PONS et al. 1995
<i>Streptomyces</i> sp. QM-B814		0,16 ^a /7,4 ^b	0,19 ^a /29,9 ^b	0,59 ^a /0,17 ^b	

Os dados para o substrato pNP-Glc estão mostrados em vermelho e os dados com celobiose em azul.

NI – Dado não informado pelos autores

^a – sítios de baixa afinidade.

^b – sítios de alta afinidade.

Semelhante às enzimas Bglhi^N (SOUZA et al., 2013, 2010) e Bglhi (SOUZA et al., 2014), a atividade *p*NP-glucosidásica da Bglhi^{Pp} foi estimulada cerca de 1,9 vezes por glicose e xilose. Os níveis de estimulação por glicose e xilose da Bglhi^{Pp} e as concentrações de cada um dos monossacarídeos requeridas para a máxima estimulação foram similares aos observados para Bglhi^N (SOUZA et al., 2013, 2010) e Bglhi (SOUZA et al., 2014). Como observado para Bglhi (SOUZA et al., 2014), houve uma diminuição um pouco mais abrupta da atividade da Bglhi^{Pp} acima de 50 mmol L⁻¹ de glicose, atingindo valores próximos ao controle em concentrações cerca de 20% mais baixos do que os observados para a enzima nativa (SOUZA et al., 2013, 2010). Já no que diz respeito à tolerância a altas concentrações de xilose, Bglhi^{Pp} comportou-se de modo parecido com o relatado para Bglhi^N, onde a atividade manteve-se acima do controle até concentrações próximas a 750 mmol L⁻¹ (SOUZA et al., 2013, 2010). Há relatos de que diferenças na glicosilação podem afetar a afinidade de certas enzimas por seus substratos e também de alguns receptores por seus ligantes (SKROPETA, 2009). Essa pode ser uma possível explicação para as diferenças observadas entre as enzimas em estudo neste trabalho.

Contrastando com os nossos dados, BGL4^{Sc} (BENOLIEL et al., 2010) mostrou apenas moderada tolerância a glicose, uma vez que a enzima foi competitivamente inibida por glicose com uma constante aparente de inibição de 70 mmol L⁻¹. Takashima e colaboradores (1999) não avaliou esta característica para BGL4^{Ao}. Considerando a similaridade de 100% com o gene para a β -glucosidase de *H. insolens*, as diferenças na sensibilidade a glicose certamente resultam das modificações pós-traducionais, possivelmente a glicosilação. Até onde sabemos, não há relatos de outras β -glucosidases tolerantes ou estimuladas por glicose que tenham sido expressas em diferentes sistemas heterólogos, para avaliarmos o possível efeito desta variável.

A Tabela 11 reúne os dados disponíveis na literatura sobre a estimulação da atividade *p*NP-glucosidásica por glicose. Os fatores de estimulação, as concentrações requeridas para máxima estimulação bem como a tolerância à glicose são muito variadas entre estas enzimas.

Tabela 11: Estimulação da atividade pNP-glucosidásica de β -glucosidases por glicose

Enzima/ Fonte	Hospedeiro	FEG ^a (vezes)	CG _{máx} ^b (mmol L ⁻¹)	IC ₅₀ ^c (mmol L ⁻¹)	TG ^d (mmol L ⁻¹)	Referências
Bglhi^{PP}/ <i>Humicola insolens</i>	<i>P. pastoris</i>	1,9	50	750	300	Este trabalho
Bglhi/ <i>Humicola insolens</i>	<i>E. coli</i>	1,8	50	~800	370	SOUZA et al., 2014
Bglhi ^N / <i>Humicola insolens</i>	Nativa	1,8	50	~800	450	SOUZA et al., 2010, 2013
<i>BglA</i> / <i>Thermotoga naphthophila</i> RKU-10T	<i>E. coli</i>	1,6	100	1200	600	AKRAM et al., 2016
<i>EaBgl1A</i> / <i>Exiguobacterium antarcticum</i> B7	<i>E. coli</i>	1,35	200	1000	500	CRESPIM et al., 2016
L167W/P172L/ mutante de Cel1A	<i>E. coli</i>	2,0	50	600	~400	GUO; AMANO; NOZAKI, 2016
L167W/P172L/P338F/ mutante de Cel1A	<i>E. coli</i>	1,3	50	600	~ 300	
MeBglID2/ Metagenoma	<i>E. coli</i>	6,6	250	> 1000	> 1000	MATSUZAWA; YAIIO, 2016a
Bgl6/ Metagenoma	<i>E. coli</i>	4,0	200-600	3500	~2500	CAO, L. C. et al., 2015b

Tabela 11: Estimulação da atividade pNP-glucosidásica de β -glucosidases por glicose

(continuação)

Enzima/ Fonte	Hospedeiro	FEG ^a (vezes)	CG _{máx} ^b (mmol L ⁻¹)	IC ₅₀ ^c (mmol L ⁻¹)	TG ^d (mmol L ⁻¹)	Referências
M3/ mutante de Bgl6	<i>E. coli</i>	2,1	200-500	3000	~2000	CAO, L. C. et al., 2015b
V174C/ mutante de Bgl6	<i>E. coli</i>	1,5	200-500	2500	~1500	
A404 V/ mutante de Bgl6	<i>E. coli</i>	2,9	200-500	2500	~2000	
L441F/ mutante de Bgl6	<i>E. coli</i>	2,9	200-500	3000	~2000	
TpBgl1/ <i>Thermotoga petrophila</i>	<i>E. coli</i>	~1,5	~600	> 1000	> 1000	COTA et al., 2015
GH1-1/ <i>Neurospora crassa</i>	<i>E. coli</i>	1,8	100-150	> 1000	1000	MELEIRO et al., 2015
Ks5A7/ Metagenoma	<i>E. coli</i>	~1,3	200	> 1000	> 1000	UCHIYAMA et al., 2015
BGL/ <i>Thermoanaerobacterium aotearoense</i> P8G3#4	<i>E. coli</i>	~1,4	100	~800	~300	YANG, F. et al., 2015

Tabela 11: Estimulação da atividade pNP-glucosidásica de β -glucosidases por glicose

(continuação)

Enzima/ Fonte	Hospedeiro	FEG ^a (vezes)	CG _{máx} ^b (mmol L ⁻¹)	IC ₅₀ (mmol L ⁻¹)	TG ^c (mmol L ⁻¹)	Referências
Bgl4/ <i>Penicillium funiculosum</i> NCL1	<i>P. pastoris</i>	1,43	150	> 550	400	RAMANI et al., 2015
AS-Esc10/ Metagenoma	<i>E. coli</i>	2,7	500-1000	> 2500	2500	BIVER et al., 2014
Unbgl1A/ Metagenoma	<i>E. coli</i>	1,2	150	300	~ 1500	LU et al, 2013
r-BglNH/ <i>Streptomyces</i> sp. SCSIO 04578	<i>E. coli</i>	1,4	100	> 500	300	MAI et al, 2013
Td2F2/ Metagenoma	<i>E. coli</i>	6,7	1000	> 1000	> 1000	UCHIYAMA et al., 2013
G1NkBG/ <i>Neotermes koshunensis</i>	<i>A. oryzae</i>	1,3	200	> 1000	600	UCHIMA et al., 2011
Bgl1A/ Metagenoma	<i>E. coli</i>	~1,3	100	~950	~400	FANG et al., 2010
-/ <i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i>	Nativa	2,2	100-175	> 600	500	NASCIMENTO et al., 2010
-/ <i>Scytalidium thermophilum</i>	Nativa	2,6	150	> 500	500	ZANOELO et al., 2004

Tabela 11: Estimulação da atividade pNP-glucosidásica de β -glucosidases por glicose

(conclusão)

Enzima/ Fonte	Hospedeiro	FEG ^a (vezes)	CG _{máx} ^b (mmol L ⁻¹)	IC ₅₀ (mmol L ⁻¹)	TG ^c (mmol L ⁻¹)	Referências
-/ <i>Streptomyces</i> sp. QM-B814	Nativa	2,0	100	> 500	300	PÉREZ-PONS et al. 1995

^a – FEG: Fator de estimulação da atividade pNP-glucosidásica por glicose.

^b - CG_{máx}: Concentração de glicose requerida para máxima estimulação da atividade pNP-glucosidásica.

^c – TG: tolerância à glicose (concentração de glicose acima da qual a atividade enzimática atinge níveis inferiores à atividade controle, determinada na ausência de glicose).

Já a estimulação de β -glucosidases por xilose tem sido menos estudada. A atividade *p*NP-glucosidásica das enzimas de *N. crassa* (MELEIRO et al., 2015), *S. thermophilum* (ZANOELO et al., 2004) e *H. grisea* var. *thermoidea* (NASCIMENTO et al., 2010) foi estimulada pelo monossacarídeo cerca de 2,0, 2,4 e 2,0 vezes, respectivamente, na faixa de concentração de 100 - 175 mmol L⁻¹. Já a β -glucosidase de *T. petrophila* foi estimulada cerca de 2,4 vezes por xilose em concentração de 800 mmol L⁻¹.

Como observado para Bglhi^{PP}, a enzima nativa também apresentou maior afinidade aparente para glicose quando comparada a xilose (SOUZA et al., 2013). Até esse momento do trabalho, o estudo detalhado de Bglhi não estava disponível para comparação. De qualquer forma, comparando Bglhi^{PP} e Bglhi^N podemos concluir que as afinidades aparentes pelos moduladores não foram afetadas pelo sistema de expressão ou pela glicosilação.

Os mecanismos envolvidos na estimulação da atividade *p*NP-glucosidásica pelos monossacarídeos será abordado no Capítulo 4, empregando técnicas de evolução dirigida e estudos de transglicosilação. O ponto crucial deste capítulo foi avaliar como os diferentes sistemas de expressão poderiam afetar as propriedades bioquímicas e cinéticas da enzima.

3.5 Conclusões

- ✓ A subclonagem do gene *bglhi* no vetor pT7 foi realizada com sucesso.
- ✓ A eliminação dos dois sítios internos de *StuI* do gene *bglhi* foi realizada por meio de duas etapas de mutação sítio-dirigida antes da subclonagem em vetor pPIC9kf1CT para expressão da enzima em *P. pastoris*.
- ✓ A expressão da enzima recombinante (Bglhi^{Pp}) foi otimizada e a máxima expressão ocorreu após 12 dias de cultivo em meio BMMY induzido com 1% (v/v) de metanol a cada 24 hrs.
- ✓ A enzima purificada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel apresentou 62 kDa e um conteúdo de carboidratos estimado em 6% (m/m).
- ✓ O pH ótimo e a estabilidade ao pH da Bglhi^{Pp} foram similares ao descrito para enzima nativa e a forma recombinante expressa em *E. coli* mas houve uma redução na temperatura ótima e na estabilidade térmica da enzima possivelmente devido ao conteúdo e o tipo de carboidratos inseridos pelo hospedeiro.
- ✓ A estimulação da atividade pNP-glucosidásica da Bglhi^{Pp} por glicose e xilose e a alta eficiência catalítica para hidrólise do substrato natural foram mantidos quando a enzima foi expressa em *P. pastoris* indicando o potencial da enzima para compor coquetéis enzimáticos para hidrólise da biomassa.

Capítulo 4

**Relação estrutura-função da β -glucosidase
de *H. insolens*: estudos de evolução dirigida**

4.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste capítulo foram:

- Padronização da biblioteca de diversidade gênica.
- Escolha do melhor sistema de expressão para *screening* da biblioteca.
- Padronização das técnicas de *screening*.
- Seleção dos mutantes expressando β -glucosidase com padrão alterado de estimulação da atividade *p*NP-glucosidásica por glicose.
- Sequenciamento dos mutantes de interesse, identificação e mapeamento das mutações.
- Estudo cinético detalhado de Bglhi.
- Expressão, purificação e caracterização bioquímica e cinética dos mutantes selecionados.
- Investigação da atividade de transglicosilação da Bglhi e das enzimas selecionadas.

4.2 Material e métodos

Algumas metodologias empregadas nesse Capítulo são idênticas às aquelas descritas no Capítulo 3, como:

- Dosagens de proteínas (**item 3.2.1**)
- Tratamento dos dados cinéticos (**item 3.2.4**)
- Eletroforese (**item 3.2.5**)
- Sequenciamento automático de DNA e análise dos resultados (**item 3.2.6**)
- Preparo de células de *E. coli* DH5 α eletrocompetente (**item 3.2.7**)
- Digestão enzimática de plasmídeos e fragmentos (**item 3.2.8.2**)
- Transformação em células de *E. coli* DH5 α (**item 3.2.8.4**)
- PCR de colônia (**item 3.2.8.5**)
- Minipreparação de DNA plasmidial (**item 3.2.8.6**)

As demais metodologias utilizadas, ou modificações daquelas já apresentadas no Capítulo 3, estão detalhadas abaixo.

4.2.1 Determinação da atividade pNP-glucosidásica

A atividade pNP-glucosidásica foi definida e determinada conforme descrito no item 3.2.2 do Capítulo 3. Nesse capítulo, vale ressaltar e diferenciar que o *p*-nitrophenol é liberado na primeira etapa da reação que antecede a formação do intermediário glicosil-enzima (ver Figura 6, etapa ①, Capítulo 1). Logo sua liberação é comum tanto para a reação de hidrólise (ver Figura 6, etapa ②, Capítulo 1), como para a reação de transglicosilação (ver Figura 6, etapa ③, Capítulo 1).

4.2.2 Determinação da atividade celobiásica

A atividade celobiásica foi definida e determinada conforme descrito no item 3.2.3 do Capítulo 3. Nesse capítulo, vale ressaltar que, quando o substrato é a celobiose, uma molécula de glicose livre é necessariamente o primeiro produto liberado na etapa de glicosilação, ou seja, após a ruptura da ligação glicosídica (ver Figura 6, etapa ①, Capítulo 1). Caso a reação de hidrólise ocorra (ver Figura 6, etapa ②, Capítulo 1), a segunda molécula de glicose livre é liberada para cada molécula de celobiose. Porém, caso a enzima siga a rota de transglicosilação (ver Figura 6, etapa ③, Capítulo 1), não haverá liberação da segunda molécula de glicose livre, pois esta será incorporada nos produtos de transglicosilação, resultando em uma menor razão glicose/celobiose.

A glicose livre liberada da reação foi estimada utilizando-se o kit da Hexoquinase/ Glicose-6-fosfato desidrogenase (Sigma-Aldrich Chem. Co). Nesse kit, a glicose foi determinada indiretamente por uma reação acoplada das enzimas Hexokinase (HK) e Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (Fig. 39). Para isso, 25 μL da reação já inativada foram adicionados a 125 μL do reagente do kit (contendo as duas enzimas) e a nova reação foi mantida a temperatura ambiente por 15 min. O produto dessa reação, o NADH, proporcional à concentração de glicose presente no meio, foi dosado em 340 nm, após a adição de 850 μL de água.

Figura 39: Reação da HK e G6PDH utilizada para quantificação de glicose livre

Quaisquer modificações das condições padrão mencionadas acima estão descritas nas legendas das figuras e tabelas.

4.2.3 Preparo de células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS eletrocompetente

A preparação das células BL21(DE3)pLysS eletrocompetente foi realizada conforme protocolo descrito no item 3.2.7, com exceção da adição do antibiótico cloranfenicol na concentração de 34 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a todos os meios de crescimento das células BL21(DE3)pLysS.

4.2.4 Padronização do epPCR

4.2.4.1 Utilizando como molde pT7_*bglhi*

O plasmídeo pT7_*bglhi* (cuja subclonagem foi apresentada no Capítulo 3) foi inicialmente escolhido para as etapas da geração da biblioteca de diversidade gênica e padronização das técnicas de screening por dois motivos:

- Devido à vantagem deste sistema de expressão em secretar a enzima de interesse para o meio extracelular e,
- Por ser relativamente pequeno e facilitar o trabalho com a biblioteca.

A criação da biblioteca foi realizada por meio da técnica de epPCR. A primeira reação de epPCR testada baseou-se no protocolo proposto por Cadwell e Joyce (1992). A um microtubo contendo 200 ng de molde (pT7_*bglhi*) foram adicionados 10 μL de dNTP Mix_mutagênico (dGTP 2 mmol L^{-1} , dATP 2 mmol L^{-1} , dCTP 10 mmol L^{-1} e dTTP 10 mmol L^{-1}), 10 μL de tampão mutagênico (MgCl_2 70 mmol L^{-1} , KCl 500 mmol L^{-1} , Tris-HCl 100 mmol L^{-1} , pH 8,3 e gelatina 0,1% (m/v)), 10 μL do oligonucleotídeo

M13Forward 10 pmol μL^{-1} , 10 μL do oligonucleotídeo M13Reverse 10 pmol μL^{-1} , 10 μL de MnCl_2 5 mmol L^{-1} e 10 U de Taq DNA polimerase recombinante (Thermo Scientific), além de água estéril para um volume final de 100 μL . A reação do epPCR foi realizada em termociclador, sendo os tubos incubados a 95 °C por 2 min e submetidos a 30 repetições do seguinte ciclo:

- 1 min a 94 °C,
- 1 min a 45 °C,
- 2 min a 72 °C.

Variações desse protocolo foram testadas: diferentes concentrações de molde (2, 20 e 200 ng), substituição do tampão mutagênico pelo tampão de PCR 10X, adição de dimetil sulfoxido (DMSO) nas concentrações 1% e 3% (v/v) e aumento no tempo de extensão dos ciclos do PCR para 6 min. As modificações foram realizadas individualmente e mantidas as outras condições do protocolo de Cadwell e Joyce (1992) constantes, como descrito acima.

Além dessas variações, foi testada uma condição padrão de PCR com pequenas alterações. A condição padrão foi: 20 fmol de molde (pT7_ *bglhi*), 0,3 pmols de cada um dos oligonucleotídeos (M13Forward e M13Reverse), 1,5 mmol L^{-1} do cofator MgCl_2 , 0,2 mmol L^{-1} de dNTP Mix, 2,5 U de Taq DNA polimerase recombinante em tampão de PCR 10X e água estéril para um volume de 100 μL . A essa condição padrão foram adicionadas as seguintes modificações:

- Condição 1: alteração da concentração de MgCl_2 para 7 mmol L^{-1} e adição de MnCl_2 0,1 mmol L^{-1} ,
- Condição 2: alteração da concentração de MgCl_2 para 7 mmol L^{-1} e adição de MnCl_2 0,5 mmol L^{-1} ,
- Condição 3: alteração da concentração de MgCl_2 para 7 mmol L^{-1} , adição de MnCl_2 0,1 mmol L^{-1} e substituição de dNTP Mix por dNTP Mix_mutagênico,
- Condição 4: alteração das concentrações de MgCl_2 e dNTP Mix para 7 mmol L^{-1} e 0,4 mmol L^{-1} , respectivamente, e adição de MnCl_2 0,1 mmol L^{-1} .

As reações foram realizadas em termociclador, sendo os tubos incubados a 95 °C por 2 min e submetidos a 30 repetições do seguinte ciclo:

- 1 min a 94 °C,
- 1 min a 45 °C,
- 3 min a 72 °C.

Os produtos de todas as reações foram aplicados em gel de agarose a 1% (m/v) e os fragmentos de interesse foram isoladas e purificadas do gel, utilizando-se o kit de extração de gel (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Os fragmentos purificados foram quantificados em BioSpec-nano.

4.2.4.2 Utilizando como molde pET28_*bglhi*

Uma biblioteca de diversidade gênica também foi construída utilizando-se como molde para reação de epPCR o plasmídeo pET28_*bglhi*, construído em nosso laboratório para expressão em *E. coli* da β -glucosidase de *H. insolens* (SOUZA et al., 2014). A um microtubo contendo 200 ng do molde (pET28_*bglhi*) foram adicionados 10 μ L de dNTP Mix, 3 μ L do oligonucleotídeo T7Promoter 10 pmol μ L⁻¹, 10 μ L do oligonucleotídeo T7Terminator 10 pmol μ L⁻¹, 0,2 μ L de MnCl₂ 50 mmol L⁻¹, 28 μ L de MgCl₂ 25 mmol L⁻¹, 5 U de Taq DNA polimerase recombinante em tampão de PCR 10X e água estéril para um volume final de 100 μ L.

A reação do epPCR foi realizada em termociclador, sendo os tubos incubados a 95 °C por 2 min e submetidos a 25 repetições do seguinte ciclo:

- 1 min a 94 °C,
- 1 min a 45 °C,
- 3 min a 72 °C.

Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose a 1% (m/v) e os fragmentos de interesse foram isolados e purificados do gel, utilizando-se o kit de extração de gel (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Os fragmentos purificados foram quantificados em BioSpec-nano.

4.2.5 Digestão enzimática e ligação dos fragmentos de interesse aos vetores pT7BsXA e pET-28a(+)

Cerca de 1 µg dos vetores pT7BsXA e pET-28a(+) foram submetidos a reação de digestão com as enzimas de restrição *NheI* e *BamHI* como descrito no item 3.2.8.2. Os fragmentos obtidos da reação de epPCR também foram submetidos a digestão com as mesmas enzimas. Cada reação de digestão foi realizada em volume final de 40 µL, utilizando-se 4 µL de tampão FastDigest 10X (Thermo Scientific), 1 U de cada uma das enzimas de restrição (*NheI* e *BamHI*) e 0,2 µg dos fragmentos. O volume foi completado com água livre de nucleases e a mistura foi incubada por 45 min a 37 °C. Após este intervalo, as enzimas foram inativadas a 60 °C por 10 min. Os produtos da digestão foram aplicados em gel de agarose a 1% (m/v) e as bandas de interesse foram isoladas e purificadas do gel, utilizando-se o kit de extração de gel (Promega), de acordo com as instruções do fabricante.

As reações de ligação entre os fragmentos de DNA e os vetores lineares digeridos foram feitas na proporção molar 3:1 (fragmento:vetor) empregando 5 U de T4 DNA ligase e 4 µL de tampão da T4 DNA ligase 10X fornecido pelo próprio fabricante (Thermo Scientific), completando-se o volume para 40 µL com água livre de nucleases. As reações foram incubadas a 22 °C por 1 h e a seguir a T4 DNA ligase foi inativada incubando-se a mistura a 65 °C por 10 min. Células DH5α foram transformadas (conforme descrito no item 3.2.8.4) com os produtos das reações de ligação (denominadas de bibliotecas). Após o crescimento das células, as etapas de PCR de colônia, minipreparação do DNA plasmidial e sequenciamento automático dos plasmídeos seguiram os mesmos protocolos descritos anteriormente.

4.2.6 Transformação em células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS eletrocompetentes

A 50 μL de células eletrocompetentes foi adicionado 1 μL do produto da reação de ligação (ou seja, das bibliotecas) descrita no item 4.2.5. A suspensão foi mantida em gelo por 5 min, transferida para uma cubeta de eletroporação com 0,2 cm de espessura (BioRad, Hercules, CA, USA) e submetida a um pulso elétrico de 2500 V no eletroporador MicroPulser (BioRad). Imediatamente após o pulso elétrico foram adicionados, na própria cubeta, 800 μL de meio SOC gelado. A suspensão foi então transferida para um microtubo estéril de 1,5 mL e incubada por 1 h a 180 rpm e 37 °C. Após esse intervalo de tempo, a suspensão foi lançada em placas contendo meio LB sólido acrescido de 34 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cloranfenicol e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina (quando utilizado o vetor pT7) ou 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de canamicina (quando utilizado o vetor pET-28a(+)). As placas foram mantidas a 37 °C por no mínimo 16 h.

4.2.7 Padronização das técnicas de *screening* usando o sistema pET28_*bglhi*

Para avaliar a eficiência e padronizar a utilização do sistema pET28_*bglhi* nas etapas de *screening*, a linhagem de *E. coli* BL21(DE3)pLysS competente foi transformada com o plasmídeo pET28_*bglhi* conforme descrito acima (item 4.2.6).

4.2.7.1 *Screening* em meio líquido

Colônias isoladas da placa foram inoculadas em tubos tipo Falcon com capacidade de 15 mL (uma colônia por tubo) contendo 5 mL de meio LB líquido seletivo para detecção de atividade β -glucosidásica (idêntico ao meio LB líquido e acrescido de canamicina 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, cloranfenicol 34 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e IPTG (Promega) 0,05 mmol L^{-1}). Os tubos foram mantidos sob agitação de 200 rpm a 37 °C por 24h e a

seguir, centrifugados por 5 min a 5000 x *g* e o sobrenadante utilizado para dosar a atividade *p*NP-glucosidásica (na ausência e na presença de glicose 100 mmol L⁻¹).

4.2.7.2 Screening em meio sólido

Colônias transformadas com o plasmídeo pET28_*bglhi* foram repicadas em outra placa contendo meio LB sólido seletivo para detecção de atividade β-glucosidásica (idêntico ao meio LB sólido e acrescido de canamicina 40 µg mL⁻¹, cloranfenicol 34 µg mL⁻¹, esculina 1 g L⁻¹, cloreto férrico 0,3 g L⁻¹ e IPTG 0,05 mmol L⁻¹). Diferentes concentrações de IPTG (0,5; 0,1; 0,05 e 0,01 mmol L⁻¹) também foram testadas. A placa foi incubada a 37 °C até o aparecimento de halos escuros (cerca de 24 h). Controles (colônias transformadas com o vetor pET-28a(+) vazio) também foram repicadas no mesmo meio seletivo, a fim de avaliar a existência de outras enzimas que pudessem levar a falsos resultados positivos.

4.2.8 Seleção dos clones capazes de expressar β-glucosidases com percentuais de estimulação da atividade *p*NP-glucosidásica por glicose diferente do determinado para o controle

As etapas de seleção dos clones capazes de expressar β-glucosidases com percentuais de estimulação da atividade *p*NP-glucosidásica por glicose diferente do controle, representado pela β-glucosidase de *H. insolens* sem mutações, seguiram o esquema apresentado na Figura 40:

Figura 40 - Representação esquemática das etapas de *screening* de clones capazes de expressar β-glucosidases com percentuais de estimulação da atividade pNP-glucosidásica por glicose alterados

4.2.8.1 Transformação de uma alíquota da biblioteca

Uma alíquota da biblioteca foi utilizada para transformar células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS conforme descrito anteriormente (item 4.2.6) e as células transformadas foram plaqueadas em placas de petri de 15 cm de diâmetro contendo 50 mL de meio LB sólido acrescido de canamicina 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e cloranfenicol 34 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O plasmídeo pET28_*bglhi* foi submetido às mesmas condições para ser utilizado como controle.

As placas foram mantidas a 37 °C por 16 h.

4.2.8.2 Seleção de colônias isoladas com auxílio do sistema automatizado K6-2

Após 16 h de crescimento, as colônias foram selecionadas com o auxílio de um sistema automatizado para seleção de colônias K6-2 (kbiosystems Limited, Basildon, UK) e lançadas em placas de 96 poços contendo 200 μl (em cada poço) de meio LB líquido seletivo para detecção de atividade β -glucosidásica.

Alguns parâmetros do equipamento foram mantidos constante durante as etapas de seleção:

- Espaçamento mínimo entre as colônias = 1,2 mm;
- Tamanho máximo de cada colônia = 4,0 mm;
- Tamanho mínimo de cada colônia = 0,5 mm;

A placa controle (contendo colônias transformadas com o plasmídeo pET28_*bglhi*) foi submetida à mesma seleção descrita acima e as colônias foram lançadas em uma placa de 96 poços.

Após inoculadas, as placas foram mantidas a 37 °C por 16 h.

4.2.8.3 Plaqueamento em meio LB sólido seletivo para detecção de atividade β -glucosidásica

Após 16 h de crescimento, as culturas foram repicadas, com auxílio de um carimbo repicador (para placas de 96 poços), para uma placa grande (25 cm x 25 cm) contendo 250 mL de meio LB sólido seletivo para atividade β -glucosidásica. Em cada placa grande foi repicada um total de 4 placas de 96 poços. No centro de cada placa grande foram repicadas colônias da placa controle. As placas foram mantidas a 37 °C por 24 h, até o aparecimento de halos escuros.

4.2.8.4 Seleção dos clones expressando enzimas com atividade β -glucosidásica

Após aproximadamente 24 h de crescimento e expressão, cada colônia apresentando halo escuro foi repicada manualmente para duas novas placas de 96 poços contendo 200 μ l (em cada poço) de meio LB líquido seletivo para atividade β -glucosidásica, de modo a obter duplicatas de cada placa de 96 poços. As placas foram mantidas a 37 °C por 24 h. As colônias controle também foram lançadas, conforme descrito anteriormente.

4.2.8.5 Micro-ensaio para detecção de β -glucosidases recombinantes com atividade pNP-glucosidásica com percentual de estimulação por glicose alterado em relação ao controle

Após 24 h de crescimento e expressão, em um dos conjuntos de placas foi adicionado glicerol 20% (v/v) para armazenamento da biblioteca em freezer -80 °C. O outro conjunto de placas foi submetido a centrifugação a 4000 x g por 15 min e os

sobrenadantes foram transferidos para novas placas de 96 poços para utilização em micro-ensaios, a fim de dosar a atividade *p*NP-glucosidásica na ausência e na presença de glicose 100 mmol L⁻¹.

Os micro-ensaios foram realizados em termociclador, em placas para PCR de 96 poços. As condições padrão dos micro-ensaios foram tampão Bis-Tris 50 mmol L⁻¹, pH 6,0, contendo *p*NP-Glc 2 mmol L⁻¹ num volume final de 90 µL. A reação foi conduzida a 50 °C e iniciada pela adição de 10 µL da enzima convenientemente diluída ao meio reacional e interrompida pela adição de 160 µL de tetraborato de sódio saturado, após 5 min de reação. O efeito da glicose (em concentração final de 100 mmol L⁻¹ no meio reacional) sobre a atividade *p*NP-glucosidásica foi avaliado nas mesmas condições descritas acima. Controles sem adição de enzima foram incluídos com a finalidade de avaliar a hidrólise espontânea do substrato nas condições dos micro-ensaios. Após interrupção da reação, as enzimas foram adicionadas ao meio reacional a fim de descontar a influência da coloração do meio de cultura sobre as dosagens. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados apresentados correspondem às médias dos valores obtidos.

4.2.8.6 Leitura da atividade *p*NP-glucosidásica nos micro-ensaios e determinação do fator de estimulação

Com o auxílio de pipetas multicanal, 200 µL de cada poço da placa de PCR foram transferidos para placas de Elisa de 96 poços e a absorbância foi lida a 410 nm em leitor de placa (Molecular Devices, Sunnyvale, California).

O fator de estimulação foi definido pela relação:

$$\text{Fator de estimulação (FE}_{\text{glc}}) = \frac{(\text{Abs média}_{410 \text{ nm}} \text{ na presença de glicose})}{(\text{Abs média}_{410 \text{ nm}} \text{ na ausência de glicose})}$$

Os clones de interesse foram armazenados em glicerol 20% (v/v) a -80 °C.

4.2.8.7 Expressão dos clones pré-selecionados em meio líquido para confirmação dos fatores de estimulação

Os clones de interesse foram descongelados e, com o auxílio de uma alça estéril, foram inoculadas em tubos tipo Falcon com capacidade de 15 mL contendo 5 mL de meio LB líquido seletivo para detecção de atividade β -glucosidásica. Os tubos foram mantidos sob agitação de 200 rpm a 37 °C por 24h e a seguir centrifugados por 5 min a 5000 x *g* e o sobrenadante foi utilizado para dosar a atividade *pNP*-glucosidásica na ausência e na presença de glicose 100 mmol L⁻¹. Os *pellets* foram congelados para posterior etapa de extração dos DNAs plasmidiais e sequenciamento automático, conforme descrito anteriormente.

4.2.9 Análise das sequências e modelagem das estruturas das β -glucosidases provenientes da biblioteca de diversidade gênica

As análises dos resultados do sequenciamento automático dos genes codificadores das β -glucosidases modificadas foram realizadas com auxílio do programa BioEdit versão 7.1.11 (HALL, 1999). Os programas BLASTx e BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) também foram usados para análise das sequências de nucleotídeos e aminoácidos, respectivamente (ALTSCHUL et al., 1997). O alinhamento entre múltiplas sequências e as correspondentes figuras foram realizadas com auxílio dos programas Clustal Ômega (SIEVERS et al., 2011) e ESPript 3.0 (ROBERT; GOUET, 2014), respectivamente. As estruturas tridimensionais das enzimas modificadas foram modeladas com auxílio do programa MODELLER 9.10 (SALI; BLUNDELL, 1993) e foram baseadas na estrutura tridimensional de Bglhi disponível em banco de dados (PDB code: 4MDO, DE GIUSEPPE et al., 2014). As figuras baseadas nas estruturas tridimensionais modeladas das β -glucosidases modificadas foram geradas usando o programa PyMOL (<http://www.pymol.org/>).

4.2.10 Expressão em *E. coli* dos clones de interesse para purificação e caracterização bioquímica das enzimas recombinantes

A linhagem de *E. coli* BL21(DE3)pLysS eletrocompetente foi transformada com os plasmídeos dos clones selecionados e do controle (pET28_*bglhi*), conforme descrito no item 4.2.6. Uma colônia isolada de cada placa foi inoculada em 5 mL de meio HDM (triptona 15 g L⁻¹ e extrato de levedura 25 g L⁻¹ com pH ajustado para 7,5) acrescido de canamicina 40 µg mL⁻¹, cloranfenicol 34 µg mL⁻¹ e MgSO₄ 10 mmol L⁻¹ (meio HDM seletivo). Após 16 h de crescimento, as células foram inoculadas em erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de meio HDM seletivo, os quais foram mantidos sob agitação de 200 rpm a 37 °C até atingir a DO de 0,6 em 600 nm. Nesse momento, as culturas foram induzidas com 1 mmol L⁻¹ de IPTG. Após 5 h de indução, as culturas foram centrifugadas a 5000 x *g* por 20 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* ressuspensos em 5 mL de tampão A. As células foram sonificadas para liberação das enzimas de interesse e submetidas à nova centrifugação nas mesmas condições descritas acima. Os *pellets* foram descartados e os sobrenadantes contendo as β-glucosidases modificadas foram submetidos à etapa de purificação descrita abaixo.

4.2.11 Purificação das β-glucosidases modificadas expressas em *E. coli* por cromatografia de afinidade

As enzimas modificadas e Bglhi foram purificadas em uma única etapa por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. Para cada amostra uma coluna de resina de Ni²⁺ (2,0 x 2,0 cm) (*HisLink*TM, Promega) foi equilibrada em tampão A. Uma amostra proteica, extraída no mesmo tampão, foi aplicada sobre a resina e a coluna foi lavada com o mesmo tampão até não ser mais possível detectar a eluição de proteínas por absorção em 280 nm. Em seguida, a coluna foi eluída com concentrações crescentes de imidazol (10, 25, 50, 75, 100, 150 e 300 mmol L⁻¹) no

Tampão A e a eluição das proteínas de interesse foi acompanhada por leitura da absorbância em 280 nm e dosagem de atividade *p*NP-glucosidásica. As alíquotas apresentando maior atividade β -glucosidásica foram reunidas e concentradas para troca do tampão A por água. A pureza da amostra final foi confirmada por SDS-PAGE a 10% (LAEMMLI, 1970).

4.2.12 Determinação da temperatura e pH ótimos de reação das β -glucosidases modificadas

A temperatura ótima de reação foi determinada em tampão Bis-Tris 50 mol L⁻¹, pH 6,0, na faixa de temperatura de 30 a 65 °C, utilizando *p*NP-Glc 2 mmol L⁻¹ como substrato. O pH ótimo de reação de cada enzima recombinante foi determinado na temperatura ótima determinada para cada uma das enzimas, em tampão McIlvaine (MCILVAINE, 1921) na faixa de pH entre 3 e 8, utilizando *p*NP-Glc 2 mmol L⁻¹ como substrato.

4.2.13 Determinação das taxas de hidrólise e transglicosilação usando *p*NP-Glc como substrato

O íon *p*NP⁻ é um produto comum para ambas as rotas, hidrólise e transglicosilação, quando utilizamos o substrato *p*NP-Glc (ver Figura 6, etapa ① do Capítulo 1). Porém, a glicose livre só é liberada caso o intermediário covalente glicosil-enzima siga a rota da reação de hidrólise (ver Figura 6, etapa ② do Capítulo 1). Dessa forma, para o substrato sintético, podemos assumir que a velocidade de produção de glicose é a velocidade de hidrólise (v_H) e a velocidade de produção de *p*NP⁻ é a somatória das velocidades de hidrólise (v_H) e transglicosilação (v_T), ou seja, $v_H + v_T$. Assim, as frações de moléculas de enzima que seguem a rota da reação de hidrólise

(%H) ou a rota da reação de transglicosilação (%T) pode ser calculada experimentalmente, e corresponderá a:

$$\%H = \frac{v_H}{(v_H + v_T)} \quad \text{Equação 1}$$

$$\%T = 100\% - \%H \quad \text{Equação 2}$$

conforme descrito por Frutuoso e Marana (2013).

Para determinar os valores de %H e %T, as reações enzimáticas foram realizadas conforme descrito no item 4.2.1, em concentração saturante de substrato (pNP-Glc) para cada uma das enzimas estudadas. Além disso, as reações foram conduzidas na ausência e presença de xilose em concentração que resultou em máxima estimulação da atividade enzimática (MC_{max}). Em cada caso, o total de unidades de atividade enzimática e os intervalos de tempo de reação foram ajustados para atingir 5% de consumo de substrato no final da reação (na ausência de xilose inicial). As reações foram interrompidas por aquecimento em banho de água fervente por 10 min e tiveram seu volume reduzido de 600 µL para 100 µL usando ultracentrifugação a vácuo. A mesma alíquota foi utilizada para dosagem das concentrações de pNP⁻ e glicose, conforme descrito nos itens 4.2.1 e 4.2.2, respectivamente. Os ensaios enzimáticos foram repetidos seis vezes e os valores de %H e %T foram dados como as medias ± desvio padrão desses ensaios (n=6).

4.2.14 Análise dos produtos de reação de Bglhi e das β-glucosidases modificadas

Os produtos de reação resultantes da ação de Bglhi e das β-glucosidases modificadas sobre o substrato natural celobiose foram analisados por duas metodologias: cromatografia em camada delgada de sílica (CCD, item 4.2.14.1) e espectrometria de massas (MS, item 4.2.14.2).

As reações enzimáticas foram realizadas em tubos cônicos, com tampa, contendo tampão acetato de amônio, 10 mmol L⁻¹, pH 5,5, em um volume final de 600 µL e em três diferentes condições:

- i) Em concentrações saturantes de celobiose determinadas para cada uma das enzimas,
- ii) Em concentrações saturantes de celobiose e na presença de xilose ou glicose correspondente a MC_{max}, determinada para cada uma das enzimas que apresentaram efeito estimulatório por algum desses monossacarídeos,
- iii) Em concentrações saturantes de celobiose e na presença de xilose ou glicose em concentração máxima que não inibiu a atividade enzimática (MT) determinada para cada uma das enzimas que não apresentaram efeito estimulatório por algum desses monossacarídeos.

Para cada uma das enzimas, a quantidade total de unidades enzimáticas foram ajustadas para atingir 5% de consumo de substrato após 5 min de reação com base na liberação de glicose livre (na ausência de xilose ou glicose). Os tubos foram incubados na temperatura ótima de reação de cada enzima e após cada intervalo de tempo desejado a reação foi interrompida por aquecimento em banho fervente por 5 min, seguido de centrifugação por 10 min a 10000 x g, preservando-se o sobrenadante. Cada uma das amostras foi submetida a análise por CCD e MS.

4.2.14.1 Análise dos produtos de reação de Bglhi e das β-glucosidases modificadas por CCD

A análise por CCD foi realizada em placas de sílica gel Kieselgel 60 (Merck – Darmstadt, Alemanha) de 20 cm x 20 cm, segundo a metodologia descrita por Fontana et al. (1988). Após o preparo das reações, alíquotas previamente padronizadas para garantir melhor visualização dos produtos foram aplicadas em uma placa, que foi

submetida a duas corridas utilizando como fase móvel acetato de etila/ácido acético/ácido fórmico/água (9:3:1:4, v/v/v/v). Após cada corrida, a placa foi seca com auxílio de um secador e após a segunda corrida, borrifada com solução reveladora contendo 0,4% (m/v) de orcinol em uma mistura de H₂SO₄ concentrado e etanol (1:9, v/v). Depois de seca, a placa foi mantida a 100 °C em estufa até o aparecimento de manchas avermelhadas nítidas. Como padrão foram utilizados glicose (G₁), celobiose (G₂), celotriose (G₃), celotetraose (G₄), xilose (X₁), xilobiose (X₂), gentibiose (Ge) e uma mistura equimolar de soforose (S) e celobiose (SG₂).

4.2.14.2 Análise dos produtos de reação por MS da Bglhi e das β-glucosidases modificadas

Os produtos de reação resultantes da ação de Bglhi e das β-glucosidases modificadas sobre o substrato natural celobiose foram submetidos à análise via inserção direta (ID-MS) sem o uso de coluna cromatográfica, usando um sistema ACQUITY UPLC H-Class acoplado ao espectrômetro de massas quadrupolo tandem Xevo® TQ-S (Waters Corporation, Milford, MS, USA), equipado com uma fonte de ionização Z-spray operando em modo positivo. Um volume de 5 µL de cada amostra foi injetado e a fase móvel usada para eluição dos compostos consistiu de ácido fórmico 0,1% (v/v) como sistema A e acetonitrila + 0,1% (v/v) de ácido fórmico como sistema B. A taxa de fluxo foi de 0,1 mL min⁻¹. Os parâmetros de operação utilizados na fonte de ionização Z-spray foram: voltagem do capilar 3,2 kV, voltagem do cone 40 V, temperatura da fonte Z-spray 150 °C, temperatura de dessolvatação do gás N₂ 250 °C, fluxo do gás de dessolvatação 600 L h⁻¹. A faixa de massas usada no modo de análise *Full-scan* foi de 100 a 1000 unidades de massa (u). Os experimentos de espectrometria de massas em tandem (MS/MS) foram realizados por dissociação dos íons moleculares induzida por colisão (do inglês, *Collision-induced dissociation* - CID) usando argônio como gás de colisão para o íon precursor de interesse ([M + Na]⁺). A energia de colisão variou de 10 a 50 eV. A aquisição e o processamento de dados foram realizados utilizando o *software* MassLynx V4.1.

4.3 Resultados

4.3.1 Padronização do epPCR

A biblioteca de diversidade gênica foi gerada, no decorrer deste projeto, com o auxílio da técnica de epPCR. Para isso, inicialmente foram padronizadas as condições da reação do PCR mutagênico, a fim de inserir o mínimo de mutações possíveis no gene *bglhi*.

Inicialmente, testamos o protocolo proposto por Cadwell e Joyce (1992) conforme descrito em Material e Métodos. A análise eletroforética dos produtos da reação (Fig. 41) não revelou a presença de bandas, indicando que não houve reação, notando-se apenas uma mancha intensa abaixo de 250 pb, correspondente aos oligonucleotídeos da reação.

Figura 41 - Análise eletroforética dos produtos do epPCR obtidos nas condições propostas por Cadwell & Joyce (1992)

A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1,0% (m/v), como descrito em Material e Métodos. (A) padrão de massa molecular aparente; (B) produtos da reação de epPCR.

Várias modificações foram testadas no protocolo de Cadwell e Joyce (1992) (diferentes concentrações de molde, diferentes tampões de reação, adição de DMSO e aumento no tempo de extensão dos ciclos de PCR), entretanto não foram obtidos bons resultados e todas as análises dos produtos de reação foram negativas (as análises eletroforéticas foram similares à apresentada anteriormente na Fig. 41).

Optamos então por testar pequenas modificações no protocolo padrão de PCR. As modificações foram feitas conforme descrito em Material e Métodos e a análise dos produtos obtidos nas condições testadas está apresentada na Figura 42. Podemos observar que os produtos desejados não foram obtidos apenas na condição 3 (Fig. 42, linha D), na qual utilizou-se os dNTPs desbalanceados (dNTP Mix_mutagênico). Em todas as outras condições, foi observada uma banda acima de 1500 pb (tamanho esperado para o fragmento), embora na condição em que se usou excesso de dNTPs algumas bandas inespecíficas possam ser visualizadas.

Figura 42 - Análise eletroforética dos produtos de epPCR em condições modificadas do protocolo padrão de PCR

A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1,0% (m/v), como descrito em Material e Métodos. (A) padrão de massa molecular aparente; (B-E) produtos da reação de epPCR nas condições 1-4 descritas em Material e Métodos.

Todos os fragmentos próximos ao tamanho esperado (1500 pb) foram isolados e purificados do gel. A seguir, os fragmentos e o vetor linear pT7 foram submetidos a reação de ligação e os produtos foram utilizados para transformar bactérias competentes *E. coli* DH5 α . Após o crescimento das células transformadas em meio LB sólido, realizou-se um PCR de colônia (com auxílio dos oligonucleotídeos M13Forward e M13Reverse que anelam especificamente no vetor pT7) para confirmação da presença do inserto no plasmídeo. Dez clones positivos de cada uma das condições testadas tiveram seus DNAs plasmidiais extraídos, purificados e sequenciados automaticamente, para avaliação da taxa de mutação em cada uma das condições.

Os sequenciamentos foram realizados com boa resolução e a análise dos resultados revelou que a média de mutações por molde sequenciado foi de apenas duas quando utilizada a condição 1 (excesso de íons Mg²⁺ (7 mmol L⁻¹) e 0,1 mmol L⁻¹ de íons Mn²⁺). Nas demais condições testadas, a média de mutações foi muito maior por molde, ficando entre 5 e 6.

Com base nesses resultados, a condição 1 foi escolhida para a realização do epPCR e construção da biblioteca de diversidade gênica.

4.3.2 Mudança de vetor de trabalho e revalidação da biblioteca

As etapas cruciais para o desenvolvimento deste projeto foram a criação de uma biblioteca de diversidade gênica e a padronização de um método eficiente para seleção dos mutantes de interesse. O vetor de trabalho escolhido inicialmente (pT7BsXA) foi utilizado durante toda a padronização das metodologias de epPCR. Porém, testes preliminares de expressão realizados com Bglhi nesse sistema mostrou-se inviável, uma vez que se trata de um sistema de expressão constitutiva, no qual não se tem controle sobre a expressão das proteínas de interesse. Além disso, por conter um peptídeo sinal de *B. subtilis*, apenas uma pequena parte das enzimas expressas era detectada no sobrenadante das culturas, enquanto a maioria

permanecia de alguma maneira associada às células. Optamos então por trocar o vetor de trabalho. Diante disso, repetimos a padronização do epPCR para garantir a reprodutibilidade do que já havia sido padronizado, principalmente no que diz respeito ao número de mutações por molde.

A condição 1, anteriormente escolhida, foi novamente utilizada alterando-se o molde para o plasmídeo pET28_*bglhi*, conforme descrito em Material e Métodos (item 4.2.4.2). A análise eletroforética dos produtos da reação (Fig. 43) revelou a presença de uma banda acima de 1500 pb (tamanho esperado para o fragmento).

Figura 43 - Análise eletroforética dos produtos da reação do epPCR utilizando como molde o vetor pET28_*bglhi*

A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1,0% (m/v), como descrito em Material e Métodos. (A) padrão de massa molecular aparente; (B) produtos da reação do epPCR nas condições descritas em Material e Métodos.

O fragmento próximo ao tamanho esperado (1500 pb) foi isolado e purificado do gel. O fragmento purificado e o vetor pET-28a(+) foram digeridos com as enzimas

de restrição *NheI* e *BamHI*. A análise dos produtos de reação por eletroforese em gel de agarose (Fig. 44) revelou a presença do vetor linearizado próximo de 5000 pb (Fig. 44C) e do fragmento digerido perto de 1500 pb (Fig. 44E). A comparação com o vetor (Fig. 44B) e o fragmento (Fig. 44D) não digeridos permitiu concluir que a digestão foi completa.

Figura 44 - Eletroforese em gel de agarose (1,0 %, m/v) do fragmento resultante do epPCR e do vetor pET-28a(+) após digestão com *NheI* e *BamHI*

(A) padrão de massa molecular aparente, (B) vetor pET-28a(+) não digerido, (C) vetor pET-28a(+) após digestão com *NheI* e *BamHI*, (D) fragmento resultante do epPCR, (E) fragmento resultante do epPCR após digestão com *NheI* e *BamHI*.

A seguir, o fragmento e o vetor foram submetidos a reação de ligação e os produtos foram utilizados para transformar bactérias competentes *E. coli*. DH5 α . Após o crescimento das células transformadas em meio LB sólido, realizou-se um PCR de colônia para confirmação da presença do inserto no plasmídeo. A análise dos produtos obtidos por eletroforese em gel de agarose (Fig. 45) revelou a presença de um fragmento próximo a 1500 pb em 70% das colônias.

Figura 45 - Análise eletroforética dos produtos de PCR de colônias selecionadas de células DH5 α transformadas com o plasmídeo contendo o fragmento resultante do epPCR

A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1,0% (m/v), como descrito em Material e Métodos. (A) padrão de massa molecular aparente; (B – H) colônias de células DH5 α submetidas a PCR.

Os clones positivos tiveram seus DNAs plasmidiais extraídos, purificados e sequenciados automaticamente, para avaliação da taxa de mutação. Os sequenciamentos foram realizados com boa resolução e a análise, com auxílio do programa BioEdit, revelou que a média de mutações por molde sequenciado foi de duas a três mutações, conforme padronizado anteriormente.

Outras reações de epPCR, digestão e ligação foram repetidas a fim de aumentar a eficiência da ligação. Diferentes marcas de enzimas de digestão e de ligação, assim como diferentes condições das reações foram alteradas sem êxito. Optou-se por seguir o trabalho com a melhor biblioteca obtida, contendo 70% dos clones com inserto.

4.3.3 Padronização das técnicas de *screening* usando o sistema pET28_*bglhi*

A fim de padronizar as técnicas de *screening*, bactérias da linhagem *E. coli* BL21(DE3)pLysS eletrocompetentes foram transformadas com o plasmídeo pET28_*bglhi* e Bglhi foi expressa em meio LB líquido seletivo para detecção de atividade β -glucosidásica, sob indução por IPTG $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$. Após 24 h de crescimento e expressão, a atividade pNP-glucosidásica das enzimas expressas atingiu níveis detectáveis (aproximadamente $1,2 \text{ U mL}^{-1}$), cerca de 18 vezes maiores que os observados utilizando o sistema pT7BsXA. Além disso, o efeito estimulatório (cerca de 1,7-1,8 vezes) da glicose (100 mmol L^{-1}) sobre a atividade da enzima também foi observado.

Além da padronização em meio líquido, visando uma padronização de uma metodologia de *screening* em meio sólido, colônias contendo o plasmídeo pET28_*bglhi* foram repicadas em placas contendo o substrato (esculina), na ausência e na presença de IPTG (Fig. 46). A presença de halos foi observada somente nas placas contendo o substrato e o indutor (Fig. 46A). Já na placa contendo somente o substrato (Fig. 46B), nada foi observado, confirmando então a necessidade de IPTG para que a expressão da enzima ocorra.

Figura 46 - Screening de atividade β -glucosidásica em meio sólido

Colônias de *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformadas com o plasmídeo pET28_*bglhi* foram repicadas em placas contendo meio LB sólido seletivo para detecção de atividade β -glucosidásica (A), como descrito em Material e Métodos. A placa (B) contém o mesmo meio sólido, exceto a presença de IPTG. O halo escuro é característico da hidrólise de esculina.

Além disso, como controle, colônias contendo o plasmídeo pET-28a(+) vazio, também foram repicadas nas mesmas condições descritas acima (Fig. 47). Nesse caso, nenhuma das colônias apresentou halos, confirmando que apenas na presença de plasmídeo contendo o gene codificador para β -glucosidases o halo estará presente. Dessa forma, ficou descartada uma possível interferência de alguma enzima expressa pela própria *E. coli* no que diz respeito à hidrólise da esculina, o que poderia levar a resultados falso positivos no processo de *screening*.

Figura 47 - Controle do *screening* de atividade β -glucosidásica em meio sólido

Colônias de BL21(DE3)pLysS transformadas com o plasmídeo pET-28a(+) vazio foram repicadas em placas contendo meio LB sólido seletivo para detecção de atividade β -glucosidásica (A), como descrito em Material e Métodos. A placa (B) contém o mesmo meio sólido, exceto a presença de IPTG.

Com o intuito de minimizar os custos do *screening*, diferentes concentrações de IPTG foram testadas para a realização da seleção em meio sólido (Fig. 48). Podemos observar que nenhuma alteração significativa foi observada na intensidade dos halos utilizando IPTG nas concentrações de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ (Fig. 48A), $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ (Fig. 48B), $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ (Fig. 48C) e $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ (Fig. 48D). Dessa maneira, optou-se por utilizar a menor concentração testada.

Figura 48: Screening de atividade β -glucosidásica em meio sólido em diferentes concentrações de IPTG

Colônias de *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformadas com o plasmídeo pET28_*bglhi* foram repicadas em placas contendo meio LB sólido seletivo para detecção de atividade β -glucosidásica, contendo diferentes concentrações de IPTG, como descrito em Material e Métodos. (A) IPTG 0,5 mmol L⁻¹, (B) IPTG 0,1 mmol L⁻¹, (C) IPTG 0,05 mmol L⁻¹ e (D) IPTG 0,01 mmol L⁻¹.

4.3.4 Seleção dos clones capazes de expressar β -glucosidases com percentuais de estimulação da atividade *p*NP-glucosidásica por glicose diferente do controle

Um total de 4435 clones foram analisados. As etapas de seleção seguiram o esquema apresentado na Figura 40 de Material e Métodos. O resultado representativo obtido após 16 h de crescimento e expressão é apresentado na Figura 49. Os halos escuros foram bem evidentes, o que permitiu a eliminação dos clones que expressam enzimas inativas das próximas etapas.

Figura 49 - Screening de atividade β -glucosidásica, em meio sólido, de colônias selecionadas com o auxílio do sistema automatizado K6-2

Após 16 h de crescimento das colônias de *E. coli* BL21(DE3)pLysS selecionadas com o auxílio do sistema automatizado, as culturas foram repicadas em placas contendo meio LB sólido seletivo para detecção de atividade β -glucosidásica, como descrito em Material e Métodos. O halo escuro no centro de cada placa corresponde à colônia transformada com o plasmídeo controle (pET28_bglhi).

Dos 4435 clones analisados, apenas 418 expressaram enzimas com atividade catalítica detectável em meio sólido, o que significa que aproximadamente 90% dos genes para β -glucosidases modificadas, apresentaram mutações deletérias à atividade catalítica da enzima.

Os resultados da 2ª etapa de *screening* estão reunidos nas tabelas a seguir, respeitando a ordem da análise.

Tabela 12: Fator de estimulação das enzimas expressas pelos clones da Placa 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,64	-	1,70	1,55	1,49	1,50	1,41	-	1,28	-	-	1,40
B	1,58	1,35	1,74	1,56	1,51	1,53	1,16	-	1,92	-	1,70	1,48
C	1,30	1,41	1,70	-	-	1,97	-	-	1,89	-	1,55	-
D	1,30	1,70	1,46	1,74	1,58	1,12	-	1,44	1,70	1,44	1,49	1,56
E	1,79	1,37	1,96			1,65	1,43	1,59	1,72	1,56		1,59
F	1,46	1,76	1,70	1,70	1,63	1,71	1,64	1,71	1,43	1,61	1,70	-
G	1,58	1,74	1,62	1,67	1,66	1,72	1,53	-	1,78	1,74	-	-
H	1,72	1,61	-	-	-	1,70	-	-	-	-	1,48	1,62

O símbolo (-) indica que o fator de estimulação foi desprezado devido aos baixos valores de absorvância medidos.

Tabela 13: Fator de estimulação das enzimas expressas pelos clones da Placa 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,54	1,66	-	1,40	1,64	1,74	1,83	1,59	1,37	1,20	1,58	1,73
B	1,80	1,43	-	1,68	2,12	2,02	1,47	1,68	1,65	2,13	1,65	-

O símbolo (-) indica que o fator de estimulação foi desprezado devido aos baixos valores de absorvância medidos.

Tabela 14: Fator de estimulação das enzimas expressas pelos clones da Placa 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,49	-	1,60	-	2,3	-	1,78	-	-	-	-	-
B	-	-	-	-	1,78	-	1,9	-	1,61	-	1,3	-
C	-	1,65	1,8	1,36	-	1,9	-	1,9	1,92	1,67	1,87	-
D	1,53	1,75	1,39	1,69								

O símbolo (-) indica que o fator de estimulação foi desprezado devido aos baixos valores de absorvância medidos.

Tabela 15: Fator de estimulação das enzimas expressas pelos clones da Placa 4

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	1,51	-	2,01	-	1,91	-	2,51	1,92	1,92	1,51	1,74
B	1,71	1,92	-	1,61	-	2,04	2,05	-	1,81	1,32	-	1,50
C	1,65	1,46	1,33	1,44	1,57	1,75	1,4	1,64	-	1,73	1,79	-
D	1,74	-	1,84	1,99	1,54	1,53	2,00	1,96	1,8	2,01	1,95	1,18
E	1,76	1,93	-	1,84	2,01	1,98	-	2,01	-	-	1,82	1,99
F	1,62	1,75	1,70	2,01	1,69	1,91	1,82	2,01	2,02	2,00	1,61	-
G	2,02	1,70	-	1,60	1,93	-	-	-	1,81	-	1,73	1,75
H	1,63	-	-	1,57	1,93	1,52	1,70	1,77	2,00	1,78	-	2,0

O símbolo (-) indica que o fator de estimulação foi desprezado devido aos baixos valores de absorbância medidos.

Tabela 16: Fator de estimulação das enzimas expressas pelos clones da Placa 5

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,72	1,52	1,72	1,53	-	-	1,81	-	1,82	1,71	-	-
B	-	2,12	-	2,08	1,76	1,98	-	-	1,4	2,02	1,73	-
C	2,01	-	-	2,07	1,43	1,86	1,10	-	2,02	1,41	-	1,91
D	1,99	1,43	-	-	-	1,92	-	-	-	-	-	-
E	-	-	-	1,73	1,77	1,51	-	-	1,78	1,51	1,77	1,50
F	-	2,00	1,85	-	-	-	-	-	1,77	-	1,89	-
G	-	2,00	1,85	-	-	-	-	-	1,78	-	1,89	-
H	1,47	1,61	-	1,64	1,72	1,42	1,15	1,45	1,65	-	-	-

O símbolo (-) indica que o fator de estimulação foi desprezado devido aos baixos valores de absorbância medidos.

Tabela 17: Fator de estimulação das enzimas expressas pelos clones da Placa 6

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,63	1,90		-	-	-	-	1,61	2,01	-	-	-

O símbolo (-) indica que o fator de estimulação foi desprezado devido aos baixos valores de absorbância medidos.

Apesar do número de clones analisados não ser muito grande, resultados interessantes com relação ao efeito da glicose sobre a atividade catalítica das enzimas modificadas foram observados. Assim, seguimos para uma caracterização mais criteriosa de algumas delas. Primeiramente, os clones foram classificados em 3 grupos, de acordo com o fator de estimulação. No primeiro grupo foram reunidos os clones apresentando fatores de estimulação menores que 1,3. No segundo, aqueles que apresentaram estimulação entre 1,3 - 2,0 e no terceiro aqueles que mostraram fatores maiores que 2,1. Uma atenção maior foi dada, inicialmente, ao primeiro e ao terceiro grupos, pois aparentemente apresentavam mutações responsáveis por grande alteração no efeito estimulatório da atividade *pNP*-glucosidásica pela glicose. O estudo detalhado das enzimas do terceiro grupo foi parte do projeto de doutorado de um aluno do nosso laboratório (SALGADO, 2016). Os estudos das enzimas do primeiro grupo são apresentados a seguir.

Para facilitar a identificação, os clones foram nomeados seguindo o número da placa, o número da coluna e a letra da linha. Assim, por exemplo o clone 1-1A é o clone da placa 1, coluna 1 e linha A. Assim, os clones 1-9A, 1-7B, 1-1C, 1-1D, 1-6D, 2-10A, 4-12D, 5-7C e 5-7H foram classificados no grupo 1 e os clones 3-5A e 4-8A no grupo 3.

4.3.5 Expressão das enzimas dos clones do grupo 1 em meio líquido para confirmação dos fatores de estimulação

Na Tabela 18 estão apresentados os fatores de estimulação por glicose determinados para as enzimas expressas em meio líquido pelos clones anteriormente selecionados e classificados membros dos grupos 1.

Observa-se boa concordância com os resultados obtidos anteriormente nas etapas de *screening*. Essa validação reforça a confiabilidade das etapas de *screening* padronizadas.

Tabela 18: Fatores de estimulação das enzimas expressas pelos clones dos grupos 1

Clone	Atividade (U mL ⁻¹)		Fator de estimulação
	Glicose (mmol L ⁻¹)		
	0	100	
1-9A	0,027	0,034	1,24
1-7B	0,240	0,310	1,29
1-1C	0,160	0,194	1,21
1-1D	0,065	0,093	1,43
1-6D	0,802	0,928	1,16
2-10A	0,084	0,101	1,19
4-12D	0,035	0,041	1,17
5-7C	0,067	0,075	1,12
5-7H	0,090	0,115	1,28

Os clones armazenados em glicerol foram descongelados e lançados em tubos para crescimento, expressão das enzimas e dosagem das atividades β -glucosidásicas com e sem glicose, conforme descrito em Material e Métodos.

Em função destes resultados, todos os clones acima tiveram seus DNAs plasmidiais extraídos, purificados e sequenciados automaticamente, para avaliação das mutações.

4.3.6 Análise dos sequenciamentos, identificação e localização das mutações presentes nos genes das enzimas modificadas expressas pelos clones dos grupos 1

Os sequenciamentos dos clones 1-9A, 1-7B, 1-1C, 1-1D, 1-6D, 2-10A, 4-12D, 5-7C e 5-7H foram realizados com boa resolução.

Para o clone 1-9A, os nucleotídeos mutados na sequência estão reunidos na Tabela 19. Nas posições 228, 511 e 766 do gene *bglhi* houve mutações do tipo

transição, onde há troca de bases nitrogenadas da mesma classe (purinas-purinas ou pirimidinas-pirimidinas). Já na posição 977 houve uma mutação do tipo transversão, na qual uma base pirimídica foi substituída por uma base púrica (WONG; ZHURINA; SCHWANEBERG, 2006).

Tabela 19 - Nucleotídeos mutados no clone 1-9A

Posição do gene	Nucleotídeo original	Nucleotídeo inserido
228	C	T
511	G	A
766	A	G
977	T	A

Algumas dessas mutações podem ser silenciosas. Assim, para analisá-las foi realizado o alinhamento entre os aminoácidos da Bglhi e do clone 1-9A (Fig. 50), revelando que a mutação na posição 228 foi silenciosa. Já a mutação da posição 511 acarretou em uma substituição de uma Ala¹⁷¹ (aminoácido apolar e alifático) por uma Thr¹⁷¹ (aminoácido polar e não carregado). Além disso, a mutação na posição 766 acarretou em uma substituição de uma Lys²⁵⁶ (aminoácido carregado positivamente) por um Glu²⁵⁶ (aminoácido carregado negativamente) e a mutação da posição 977 em uma substituição de uma Leu³²⁶ (aminoácido apolar e alifático) por His³²⁶ (aminoácido carregado positivamente).

Bglhi	MSLPDFKWFATAAYQIEGSVNEDGRGPSIWDTFCAIPGKIADGSSGAVACDSYKRTKE 60
1-9A	MSLPDFKWFATAAYQIEGSVNEDGRGPSIWDTFCAIPGKIADGSSGAVACDSYKRTKE 60

Bglhi	DIALLKELGANSYRFSISWSRIIPLGGRNDPINQKGIDHYVKFVDDLIEAGITPFITLFH 120
1-9A	DIALLKELGANSYRFSISWSRIIPLGGRNDPINQKGIDHYVKFVDDLIEAGITPFITLFH 120

	pos. 171 ←
Bglhi	WDLPDALDKRYGGFLNKEEFAADFENYARIMFKAI PKCKHWITFNEPWC SAILGYNTGYF 180
1-9A	WDLPDALDKRYGGFLNKEEFAADFENYARIMFKAI PKCKHWITFNEPWCSTILGYNTGYF 180
	*****;*****
Bglhi	APGHTSDRSKSPVGDSAREPWI VGHNILIAHARAVKAYREDFKPTQGGEIGITLNGDATL 240
1-9A	APGHTSDRSKSPVGDSAREPWI VGHNILIAHARAVKAYREDFKPTQGGEIGITLNGDATL 240

	pos. 256 ←
Bglhi	PWDPEDPADIEACDRKIEFAISWFADPIYFGKYPSMRKQLGDRLPEFTPEEVALVKGSN 300
1-9A	PWDPEDPADIEACDREIEFAISWFADPIYFGKYPSMRKQLGDRLPEFTPEEVALVKGSN 300
	*****;*****
	pos. 326 ←
Bglhi	DFYGMNHYTANYIKHKTGVPPEDDFLGNLETIFYNKYGDCIGPETQSFWLRPHAQGFRDL 360
1-9A	DFYGMNHYTANYIKHKTGVPPEDDFHGNLETIFYNKYGDCIGPETQSFWLRPHAQGFRDL 360
	***** *****
Bglhi	LNWLSKRYGYPKIYVTENGTSKLGENDMPLEQVLEDDFRVKYFNDYVRAMAAVAEDGCN 420
1-9A	LNWLSKRYGYPKIYVTENGTSKLGENDMPLEQVLEDDFRVKYFNDYVRAMAAVAEDGCN 420

Bglhi	VRGYLAWSLLDNFEWAEGYETRFVGYVDYANDQKRYPKSAKSLKPLFDSLIRKE 476
1-9A	VRGYLAWSLLDNFEWAEGYETRFVGYVDYANDQKRYPKSAKSLKPLFDSLIRKE 476

Figura 50 - Alinhamento entre as sequências de aminoácidos da Bglhi e do clone 1-9A

O alinhamento foi realizado com auxílio do programa BioEdit.

A modelagem da estrutura tridimensional da enzima expressa pelo mutante 1-9A realizada com auxílio do software MODELLER está representada na Figura 51. Podemos observar que as três mutações do clone 1-9A estão localizadas na região próxima a entrada do sítio ativo.

Figura 51 - Estrutura tridimensional predita da β -glucosidase do mutante 1-9A

A estrutura tridimensional está representada no formato de fitas. Os resíduos catalíticos (E^{166} e E^{377}) estão representados na forma de esferas vermelhas. Os resíduos que formam o sítio da glicona estão representados na forma de esferas verdes e os resíduos que delimitam a entrada do sítio ativo estão representados como esferas rosas. Os resíduos que foram modificados em relação à estrutura nativa da Bglhi (DE GIUSEPPE et al., 2014) estão representados na forma de esferas amarelas e estão devidamente identificados na estrutura. Cada figura na sequência apresenta uma rotação no eixo y de 90° C em relação à anterior. As imagens foram feitas com auxílio do programa PyMOL Viewer.

Para o clone 1-7B, os nucleotídeos mutados na sequência estão reunidos na Tabela 20. Nas posições 37, 99, 253 e 760 do gene *bglhi* houve mutações do tipo transição enquanto nas posições 702, 842 e 1029 houve mutações do tipo transversão.

Tabela 20: Nucleotídeos mutados no clone 1-7B

Posição do gene	Nucleotídeo original	Nucleotídeo inserido
37	A	G
99	C	T
253	C	T
673	A	T
760	G	A
842	T	A
1029	G	C

O alinhamento entre os aminoácidos da Bglhi e do clone 1-7B (Fig. 52) mostrou que as mutações nas posições 99, 253 e 1029 foram silenciosas. Em contraste, a mutação na posição 37 acarretou na substituição de uma Thr¹³ por uma Ala¹³ e a mutação na posição 673 na substituição de uma Thr²²⁵ por uma Ser²²⁵, ambos aminoácidos polares e não carregados. Já a mutação da posição 760 acarretou na substituição de Asp²⁵⁴ (aminoácido carregado negativamente) por Asn²⁵⁴ (aminoácido polar e não carregado), enquanto a mutação na posição 842 acarretou substituição de uma Leu²⁸¹ por Gln²⁸¹ (aminoácido polar e não carregado).

	pos. 13 ←	
Bglhi	MSLPDFKWFATAAYQIEGSVNEDGRGPSIWDTFCAIPGKIADGSSGAVACDSYKRTKE	60
1-7B	MSLPDFKWFATAAYQIEGSVNEDGRGPSIWDTFCAIPGKIADGSSGAVACDSYKRTKE	60
	*****;	
Bglhi	DIALLKELGANSYRFSISWSRIIPLGGRNDPINQKIDHYVKFVDDLIEAGITPFITLFH	120
1-7B	DIALLKELGANSYRFSISWSRIIPLGGRNDPINQKIDHYVKFVDDLIEAGITPFITLFH	120

Bglhi	WDLPDALDKRYGGFLNKEEFAADFENYARIMFKAIPKCKHWITFNEPWC SAILGYNTGYF	180
1-7B	WDLPDALDKRYGGFLNKEEFAADFENYARIMFKAIPKCKHWITFNEPWC SAILGYNTGYF	180

	pos. 225 ←	
Bglhi	APGHTSDRSKSPVGDSAREPWIVGHNILIAHARAVKAYREDFKPTQGGEIGITLNGDATL	240
1-7B	APGHTSDRSKSPVGDSAREPWIVGHNILIAHARAVKAYREDFKPSQGGEIGITLNGDATL	240
	*****;	
	pos. 254 ←	pos. 281 ←
Bglhi	PWDPEDPADIEACDRKIEFAISWFADPIYFGKYPDSMRKQLGDRLEPFTPEEVALVKGSN	300
1-7B	PWDPEDPADIEACNRKIEFAISWFADPIYFGKYPDSMRKQQLGDRLEPFTPEEVALVKGSN	300
	*****;	
Bglhi	DFYGMNHYTANYIKHKTGVPPEDD FLGNLETIFYNKYGDCIGPETQSFWL RPHAQGFRDL	360
1-7B	DFYGMNHYTANYIKHKTGVPPEDD FLGNLETIFYNKYGDCIGPETQSFWL RPHAQGFRDL	360

Bglhi	LNWLSKRYGYPKIYVTENGTSKLGENDMPLEQVLEDDFRVKYFNDYVRAMAAVAEDGCN	420
1-7B	LNWLSKRYGYPKIYVTENGTSKLGENDMPLEQVLEDDFRVKYFNDYVRAMAAVAEDGCN	420

Bglhi	VRGYLAWSLLDNFEWAEGYETRFVTVVDYANDQKRYPKSAKSLKPLFDSLIRKE	476
1-7B	VRGYLAWSLLDNFEWAEGYETRFVTVVDYANDQKRYPKSAKSLKPLFDSLIRKE	476

Figura 52 - Alinhamento entre as sequências de aminoácidos da Bglhi e do clone 1-7B

O alinhamento foi realizado com auxílio do programa BioEdit.

A modelagem da estrutura tridimensional da β -glucosidase do mutante 1-7B fornecida pelo software MODELLER está representada na Figura 53. Podemos observar que as mutações N²⁵⁴, Q²⁸¹ e S²²⁵ estão em regiões distintas e periféricas da molécula enquanto a mutação A¹³ está muito próxima do sítio da glicona.

Figura 53 - Estrutura tridimensional predita da β -glucosidase do mutante 1-7B

A estrutura tridimensional está representada no formato de fitas. Os resíduos catalíticos (E¹⁶⁶ e E³⁷⁷) estão representados na forma de esferas vermelhas. Os resíduos que formam o sítio da glicona estão representados na forma de esferas verdes e os resíduos que delimitam a entrada do sítio ativo estão representados como esferas rosas. Os resíduos que foram modificados em relação à estrutura nativa da Bglhi (DE GIUSEPPE et al., 2014) estão representados na forma de esferas amarelas e estão devidamente identificados na estrutura. Cada figura na sequência apresenta uma rotação no eixo y de 90° C em relação à anterior. As imagens foram feitas com auxílio do programa PyMOL Viewer.

Para o clone 1-1C, os nucleotídeos mutados na sequência estão reunidos na Tabela 21. Nas posições 925, 1032 e 1059 do gene *bglhi* houve mutações do tipo transição enquanto nas posições 122 e 571 houve mutações do tipo transversão.

Tabela 21: Nucleotídeos mutados no clone 1-1C

Posição do gene	Nucleotídeo original	Nucleotídeo inserido
122	A	T
571	T	A
925	A	G
1032	G	A
1059	C	T

O alinhamento entre os aminoácidos da Bglhi e do clone 1-1C foi realizado (Fig. 54) revelando que as mutações nas posições 1032 e 1059 foram silenciosas, enquanto a mutação da posição 122 acarretou na substituição de uma Lys⁴¹ por uma Met⁴¹ (aminoácido apolar e alifático). Além disso, a mutação da posição 571 acarretou em uma substituição de uma Ser¹⁹¹ por uma Thr¹⁹¹ e a mutação na posição 925 acarretou em uma substituição de uma Thr³⁰⁹ por Ala³⁰⁹.

		pos. 41 ←	
Bglhi	MSLPPDFKWGFATAAYQIEGSVNEDGRGPSIWDTFCAIPGKIADGSSGAVACDSYKRTKE	60	
1-1C	MSLPPDFKWGFATAAYQIEGSVNEDGRGPSIWDTFCAIPGMIADGSSGAVACDSYKRTKE	60	

Bglhi	DIALLKELGANSYRFSISWSRIIPLGGRNDPINQKGIDHYVKFVDDLIAGITPFITLFH	120	
1-1C	DIALLKELGANSYRFSISWSRIIPLGGRNDPINQKGIDHYVKFVDDLIAGITPFITLFH	120	

Bglhi	WDLPDALDKRYGGFLNKEEFAADFENYARIMFKAI PKCKHWITFNEPWCSAILGYNTGYF	180	
1-1C	WDLPDALDKRYGGFLNKEEFAADFENYARIMFKAI PKCKHWITFNEPWCSAILGYNTGYF	180	

	pos. 191 ←		
Bglhi	APGHTSDRSKSPVGDSAREPWIVGHNILIAHARAVKAYREDFKPTQGGEIGITLNGDATL	240	
1-1C	APGHTSDRSKTPVGDSAREPWIVGHNILIAHARAVKAYREDFKPTQGGEIGITLNGDATL	240	
	***** ; *****		
Bglhi	PWDPEDPADIEACDRKIEFAISWFADPIYFGKYPD SMRKQLGDRLEPFTPEEVALVKGSN	300	
1-1C	PWDPEDPADIEACDRKIEFAISWFADPIYFGKYPD SMRKQLGDRLEPFTPEEVALVKGSN	300	

	pos. 309 ←		
Bglhi	DFYGMNHYTANYIKHKTGVPPEDDFLGNLETIFYNKYGDCIGPETQSFWRPHAQGFRDL	360	
1-1C	DFYGMNHYAANYIKHKTGVPPEDDFLGNLETIFYNKYGDCIGPETQSFWRPHAQGFRDL	360	
	***** ; *****		
Bglhi	LNWLSKRYGYPKIYVTENGTSKLGENDMPLEQVLEDDFRVKYFN DYVRAMAAVAEDGCN	420	
1-1C	LNWLSKRYGYPKIYVTENGTSKLGENDMPLEQVLEDDFRVKYFN DYVRAMAAVAEDGCN	420	

Bglhi	VRGYLAWSLLDNFEWAEGYETRFGVTYVDYANDQKRYPKKSAKSLKPLFDSLIRKE	476	
1-1C	VRGYLAWSLLDNFEWAEGYETRFGVTYVDYANDQKRYPKKSAKSLKPLFDSLIRKE	476	

Figura 54 - Alinhamento entre as sequências de aminoácidos da Bglhi e do clone 1-1C

O alinhamento foi realizado com auxílio do programa BioEdit.

A modelagem da estrutura tridimensional da β -glucosidase do mutante 1-1C fornecida pelo software MODELLER está representada na Figura 55. Podemos observar que as mutações T¹⁹¹ e M⁴¹ estão em regiões periféricas da molécula enquanto a mutação A³⁰⁹ está muito próxima do sítio da glicona.

Figura 55 - Estrutura tridimensional predita da β -glucosidase do mutante 1-1C

A estrutura tridimensional está representada no formato de fitas. Os resíduos catalíticos (E¹⁶⁶ e E³⁷⁷) estão representados na forma de esferas vermelhas. Os resíduos que formam o sítio da glicona estão representados na forma de esferas verdes e os resíduos que delimitam a entrada do sítio ativo estão representados como esferas rosas. Os resíduos que foram modificados em relação à estrutura nativa da Bglhi (DE GIUSEPPE et al., 2014) estão representados na forma de esferas amarelas e estão devidamente identificados na estrutura. Cada figura na sequência apresenta uma rotação no eixo y de 90° C em relação à anterior. As imagens foram feitas com auxílio do programa PyMOL Viewer.

Para o clone 1-1D, os nucleotídeos mutados na sequência estão reunidos na Tabela 22. Nas posições 133, 239, 768, 1068 e 1141 do gene *bglhi* houve mutações do tipo transição enquanto na posição 288 houve mutação do tipo transversão.

Tabela 22: Nucleotídeos mutados no clone 1-1D

Posição do gene	Nucleotídeo original	Nucleotídeo inserido
133	G	A
239	C	T
288	C	A
768	G	A
1068	C	T
1141	T	C

O alinhamento entre os aminoácidos da Bglhi e do clone 1-1D foi realizado (Fig. 56) mostrando que as mutações nas posições 288, 768 e 1068 foram silenciosas. A mutação na posição 133 acarretou em uma substituição de uma Gly⁴⁵ (aminoácido apolar e alifático) por uma Ser⁴⁵, enquanto a mutação da posição 239 acarretou em uma substituição de uma Ser⁸⁰ por uma Leu⁸⁰. Já a mutação na posição 1141 acarretou em uma substituição de uma Ser³⁸¹ por uma Pro³⁸¹ (aminoácido apolar e alifático).

		pos. 45 ←	
Bglhi	MSLPDFKWFATAAYQIEGSVNEDGRGPSIWDTFCAIPGKIADSSSGAVACDSYKRTKE	60	
1-1D	MSLPDFKWFATAAYQIEGSVNEDGRGPSIWDTFCAIPGKIADSSSGAVACDSYKRTKE	60	

		pos. 80 ←	
Bglhi	DIALLKELGANSYRFSISWSRIIPLGGRNDPINQKGIDHYVKFVDDLIEAGITPFITLFH	120	
1-1D	DIALLKELGANSYRFSISWLRIIPLGGRNDPINQKGIDHYVKFVDDLIEAGITPFITLFH	120	

Bglhi	WDLPDALDKRYGGFLNKEEFAADFENYARIMFKAIPKCKHWITFNEPWCSAILGYNTGYF	180	
1-1D	WDLPDALDKRYGGFLNKEEFAADFENYARIMFKAIPKCKHWITFNEPWCSAILGYNTGYF	180	

Bglhi	APGHTSDRSKSPVGDSAREPWIVGHNILIAHARAVKAYREDFKPTQGGEIGITLNGDATL	240	
1-1D	APGHTSDRSKSPVGDSAREPWIVGHNILIAHARAVKAYREDFKPTQGGEIGITLNGDATL	240	

Bglhi	PWDPEDPADIEACDRKIEFAISWFADPIYFGKYPDSMRKQLGDRLPEFTPEEVALVKGSN	300	
1-1D	PWDPEDPADIEACDRKIEFAISWFADPIYFGKYPDSMRKQLGDRLPEFTPEEVALVKGSN	300	

Bglhi	DFYGMNHYTANYIKHKTGVPPEDDFLGNLETLFYNKYGDCIGPETQSFWLRPHAQGFRDL	360	
1-1D	DFYGMNHYTANYIKHKTGVPPEDDFLGNLETLFYNKYGDCIGPETQSFWLRPHAQGFRDL	360	

		pos. 381 ←	
Bglhi	LNWLSKRYGYPKIYVTENGTSILKGENDMPLEQVLEDDFRVKYFNDYVRAMAAVAEDGCN	420	
1-1D	LNWLSKRYGYPKIYVTENGTFPLKGENDMPLEQVLEDDFRVKYFNDYVRAMAAVAEDGCN	420	

Bglhi	VRGYLAWSLLDNFEWAEGYETRFVTVYVDYANDQKRYPKKSAKSLKPLFDSLIRKE	476	
1-1D	VRGYLAWSLLDNFEWAEGYETRFVTVYVDYANDQKRYPKKSAKSLKPLFDSLIRKE	476	

Figura 56 - Alinhamento entre as sequências de aminoácidos da Bglhi e do clone 1-1D

O alinhamento foi realizado com auxílio do programa BioEdit.

A modelagem da estrutura tridimensional da β -glucosidase do mutante 1-1D fornecida pelo software MODELLER está representada na Figura 57. Podemos observar que as mutações L⁸⁰ e S⁴⁵ estão em regiões periféricas da molécula enquanto a mutação P³⁸¹ está muito próxima do sítio da glicona.

Figura 57- Estrutura tridimensional predita da β -glucosidase do mutante 1-1D

A estrutura tridimensional está representada no formato de fitas. Os resíduos catalíticos (E¹⁶⁶ e E³⁷⁷) estão representados na forma de esferas vermelhas. Os resíduos que formam o sítio da glicona estão representados na forma de esferas verdes e os resíduos que delimitam a entrada do sítio ativo estão representados como esferas rosas. Os resíduos que foram modificados em relação à estrutura nativa da Bglhi (DE GIUSEPPE et al., 2014) estão representados na forma de esferas amarelas e estão devidamente identificados na estrutura. Cada figura na sequência apresenta uma rotação no eixo y de 90° C em relação à anterior. As imagens foram feitas com auxílio do programa PyMOL Viewer.

Para o clone 4-12D, os nucleotídeos mutados na sequência estão reunidos na Tabela 23. Nas posições 879, 1184 e 1424 do gene *bglhi* houve mutações do tipo transição enquanto na posição 710 e 1166 houve mutação do tipo transversão.

Tabela 23: Nucleotídeos mutados no clone 4-12D

Posição do gene	Nucleotídeo original	Nucleotídeo inserido
710	A	T
879	C	T
1166	C	A
1184	A	G
1424	A	G

O alinhamento entre os aminoácidos da Bglhi e do clone 4-12D foi realizado (Fig. 58) e mostrou que a mutação na posição 879 foi silenciosa. Em contraste, a mutação na posição 710 acarretou na substituição de Asp²³⁷ por Val²³⁷ (aminoácido apolar e alifático), e a mutação na posição 1166 em substituição de Pro³⁸⁹ por His³⁸⁹. Já a mutação na posição 1184 acarretou em substituição de Glu³⁹⁵ por Gly³⁹⁵. Por fim, a mutação na posição 1424 acarretou em uma substituição de uma Lys⁴⁷⁵ por uma Arg⁴⁷⁵ (aminoácido carregado positivamente).

Bglhi	MSLPPDFKWGFATAAYQIEGSVNEDGRGPSIWDTFCAIPGKIADGSSGAVACDSYKRTKE 60
4-12D	MSLPPDFKWGFATAAYQIEGSVNEDGRGPSIWDTFCAIPGKIADGSSGAVACDSYKRTKE 60

Bglhi	DIALLKELGANSYRFSISWSRIIPLGGRNDPINQKGIDHYVKFVDDLEAGITPFITLFH 120
4-12D	DIALLKELGANSYRFSISWSRIIPLGGRNDPINQKGIDHYVKFVDDLEAGITPFITLFH 120

Bglhi	WDLPDALDKRYGGFLNKEEFAADFENYARIMFKAI PKCKHWITFNEPWCSAILGYNTGYF 180
4-12D	WDLPDALDKRYGGFLNKEEFAADFENYARIMFKAI PKCKHWITFNEPWCSAILGYNTGYF 180

	pos. 237 ←
Bglhi	APGHTSDRSKSPVGDSAREPWIVGHNILIAHARAVKAYREDFKPTQGGEIGITLNGDATL 240
4-12D	APGHTSDRSKSPVGDSAREPWIVGHNILIAHARAVKAYREDFKPTQGGEIGITLNGVATL 240
	***** *
Bglhi	PWDPEDPADIEACDRKIEFAISWFADPIYFGKYPDSMRKQLGDRLEFTPEEVALVKGSN 300
4-12D	PWDPEDPADIEACDRKIEFAISWFADPIYFGKYPDSMRKQLGDRLEFTPEEVALVKGSN 300

Bglhi	DFYGMNHYTANYIKHKTGVPPEDDFLGNLETLFYNKYGD CIGPETQSFWLRPHAQGFRDL 360
4-12D	DFYGMNHYTANYIKHKTGVPPEDDFLGNLETLFYNKYGD CIGPETQSFWLRPHAQGFRDL 360

	pos. 389 ← → pos. 395
Bglhi	LNWLSKRYGYPKIYVTENGTSKLGENDMPLEQVLEDDFRVKYFNDYVRAMAAVAEDGCN 420
4-12D	LNWLSKRYGYPKIYVTENGTSKLGENDMHLEQVLGDDFRVKYFNDYVRAMAAVAEDGCN 420
	***** *
	pos. 475 ←
Bglhi	VRGYLAWSLLDNFEWAEGYETRFVTVYDYANDQKRYPKKSAKSLKPLFDSLIRKE 476
4-12D	VRGYLAWSLLDNFEWAEGYETRFVTVYDYANDQKRYPKKSAKSLKPLFDSLIRRE 476
	***** :

Figura 58 - Alinhamento entre as sequências de aminoácidos da Bglhi e do clone 4-12D

O alinhamento foi realizado com auxílio do programa BioEdit.

A modelagem da estrutura tridimensional da β -glucosidase do mutante 4-12D fornecida pelo software MODELLER está representada na Figura 59. Podemos observar que as mutações H³⁸⁹, G³⁹⁵ e R⁴⁷⁵ estão em regiões periféricas da molécula enquanto a mutação V²³⁷ está muito próxima do sítio da glicona.

Figura 59 - Estrutura tridimensional predita da β -glucosidase do mutante 4-12D

A estrutura tridimensional está representada no formato de fitas. Os resíduos catalíticos (E¹⁶⁶ e E³⁷⁷) estão representados na forma de esferas vermelhas. Os resíduos que formam o sítio da glicona estão representados na forma de esferas verdes e os resíduos que delimitam a entrada do sítio ativo estão representados como esferas rosas. Os resíduos que foram modificados em relação à estrutura nativa da Bglhi (DE GIUSEPPE et al., 2014) estão representados na forma de esferas amarelas e estão devidamente identificados na estrutura. Cada figura na sequência apresenta uma rotação no eixo y de 90° C em relação à anterior. As imagens foram feitas com auxílio do programa PyMOL Viewer.

Para o clone 1-6D, os nucleotídeos mutados na sequência estão reunidos na Tabela 24. Nas duas posições (704 e 717) do gene *bglhi* houve mutações do tipo transição.

Tabela 24: Nucleotídeos mutados no clone 1-6D

Posição do gene	Nucleotídeo original	Nucleotídeo inserido
704	A	G
717	C	T

O alinhamento entre os aminoácidos da Bglhi e do clone 1-6D foi realizado (Fig. 60) e mostrou que a mutação na posição 717 foi silenciosa. Em contraste, a mutação na posição 704 acarretou na substituição de Asn²³⁵ por Ser²³⁵.

Bglhi	MSLPDFKWFATAAYQIEGSVNEDGRGPSIWDTFCAIPGKIADGSSGAVACDSYKRTKE	60
1-6D	MSLPDFKWFATAAYQIEGSVNEDGRGPSIWDTFCAIPGKIADGSSGAVACDSYKRTKE	60

Bglhi	DIALLKELGANSYRFSISWSRIIPLGGRNDPINQKGIDHYVKFVDDLIEAGITPFITLFH	120
1-6D	DIALLKELGANSYRFSISWSRIIPLGGRNDPINQKGIDHYVKFVDDLIEAGITPFITLFH	120

Bglhi	WDLDPALDKRYGGFLNKEEFAADFENYARIMFKAIPKCKHWITFNEPWCSAILGYNTGYF	180
1-6D	WDLDPALDKRYGGFLNKEEFAADFENYARIMFKAIPKCKHWITFNEPWCSAILGYNTGYF	180

		pos. 235 ←
Bglhi	APGHTSDRSKSPVGDSAREPWIVGHNILIAHARAVKAYREDFKPTQGGEIGITLNGDATL	240
1-6D	APGHTSDRSKSPVGDSAREPWIVGHNILIAHARAVKAYREDFKPTQGGEIGITLNGDATL	240

Bglhi	PWDPEDPADIEACDRKIEFAISWFADPIYFGKYPDSMRKQLGDRLEFTPEEVALVKGSN	300
1-6D	PWDPEDPADIEACDRKIEFAISWFADPIYFGKYPDSMRKQLGDRLEFTPEEVALVKGSN	300

Bglhi	DFYGMNHYTANYIKHKTGVPPEDDFLGNLETLFYNKYGDCIGPETQSFWLRPHAQGFRDL	360
1-6D	DFYGMNHYTANYIKHKTGVPPEDDFLGNLETLFYNKYGDCIGPETQSFWLRPHAQGFRDL	360

Bglhi	LNWLSKRYGYPKIYVTENGTSKLGENDMPLEQVLEDDFRVKYFNDYVRAMAAVAEDGCN	420
1-6D	LNWLSKRYGYPKIYVTENGTSKLGENDMPLEQVLEDDFRVKYFNDYVRAMAAVAEDGCN	420

Bglhi	VRGYLAWSLLDNFEWAEGYETREGVTYVDYANDQKRYPKKSASLKLPLFDSLIRKE	476
1-6D	VRGYLAWSLLDNFEWAEGYETREGVTYVDYANDQKRYPKKSASLKLPLFDSLIRKE	476

Figura 60 - Alinhamento entre as sequências de aminoácidos da Bglhi e do clone 1-6D

O alinhamento foi realizado com auxílio do programa BioEdit.

A modelagem da estrutura tridimensional da β -glucosidase do mutante 1-6D fornecida pelo software MODELLER está representada na Figura 61. Podemos observar que a única mutação está localizada na região dentro do sítio ativo.

Figura 61 - Estrutura tridimensional predita da β -glucosidase do mutante 1-6D

A estrutura tridimensional está representada no formato de fitas. Os resíduos catalíticos (E^{166} e E^{377}) estão representados na forma de esferas vermelhas. Os resíduos que formam o sítio da glicona estão representados na forma de esferas verdes e os resíduos que delimitam a entrada do sítio ativo estão representados como esferas rosas. Os resíduos que foram modificados em relação à estrutura nativa da Bglhi (DE GIUSEPPE et al., 2014) estão representados na forma de esferas amarelas e estão devidamente identificados na estrutura. Cada figura na sequência apresenta uma rotação no eixo y de 90° C em relação à anterior. As imagens foram feitas com auxílio do programa PyMOL Viewer.

Para o clone 2-10A, os nucleotídeos mutados na sequência estão reunidos na Tabela 25. Nas posições 240, 437, 814 e 1230 do gene *bglhi* houve mutações do tipo transição enquanto na posição 1192 houve mutação do tipo transversão.

Tabela 25: Nucleotídeos mutados no clone 2-10A

Posição do gene	Nucleotídeo original	Nucleotídeo inserido
240	G	A
437	A	G
814	A	G
1192	T	A
1230	G	A

O alinhamento entre os aminoácidos da Bglhi e do clone 2-10A foi realizado (Fig. 62) e mostrou que as mutações nas posições 240 e 437 foram silenciosas. Em contraste, a mutação na posição 814 acarretou na substituição de Lys²⁷² por Glu²⁷², e a mutação na posição 1192 em substituição de Phe³⁹⁸ (aminoácido aromático) por Ile³⁹⁸ (aminoácido apolar e alifático). Já a mutação na posição 1230 acarretou em substituição de Met⁴¹⁰ por Ile⁴¹⁰.

Bglhi	MSLPDFKWFATAAYQIEGVSNEEDGRGPSIWDTFCAIPGKIADGSSGAVACDSYKRTKE	60
2-10A	MSLPDFKWFATAAYQIEGVSNEEDGRGPSIWDTFCAIPGKIADGSSGAVACDSYKRTKE	60

Bglhi	DIALLKELGANSYRFSISWSRIIPLGGRNDPINQKGIDHYVKFVDDLIEAGITPFITLFH	120
2-10A	DIALLKELGANSYRFSISWSRIIPLGGRNDPINQKGIDHYVKFVDDLIEAGITPFITLFH	120

Bglhi	WDLPDALDKRYGGFLNKEEFAADFENYARIMFKAI PKCKHWITFNEPWCSAILGYNTGYF	180
2-10A	WDLPDALDKRYGGFLNKEEFAADFENYARIMFKAI PKCKHWITFNEPWCSAILGYNTGYF	180

Bglhi	APGHTSDRSKSPVGD SAREPWIVGHNILIAHARAVKAYREDFKPTQGGEIGITLNGDATL	240
2-10A	APGHTSDRSKSPVGD SAREPWIVGHNILIAHARAVKAYREDFKPTQGGEIGITLNGDATL	240

pos. 272 ←		
Bglhi	PWDPEDPADIEACDRKIEFAISWFADPIYFGKY PDSMRKQLGDRLEPFTPEEVALVKGSN	300
2-10A	PWDPEDPADIEACDRKIEFAISWFADPIYFGKY PDSMRKQLGDRLEPFTPEEVALVKGSN	300
*****;*****		
Bglhi	DFYGMNHYTANYIKHKTGVPPEDDFLGNLETIFYNKYGDCIGPETQSFWRPQAQGFRL	360
2-10A	DFYGMNHYTANYIKHKTGVPPEDDFLGNLETIFYNKYGDCIGPETQSFWRPQAQGFRL	360

pos. 398 ← pos. 410		
Bglhi	LNWLSKRYGYPKIYVTENGTSKLGENDMPLEQVLEDDFRVKYFNDYVRAIAAAVAEDGCN	420
2-10A	LNWLSKRYGYPKIYVTENGTSKLGENDMPLEQVLEDDIRVKYFNDYVRAIAAAVAEDGCN	420
*****;*****;*****		
Bglhi	VRGYLAWSLLDNFEWAEGYETRFVTVYVDYANDQKRYPKKSAKSLKPLFDSLIRKE	476
2-10A	VRGYLAWSLLDNFEWAEGYETRFVTVYVDYANDQKRYPKKSAKSLKPLFDSLIRKE	476

Figura 62 - Alinhamento entre as sequências de aminoácidos da Bglhi e do clone 2-10A

O alinhamento foi realizado com auxílio do programa BioEdit.

A modelagem da estrutura tridimensional da β -glucosidase do mutante 2-10A fornecida pelo software MODELLER está representada na Figura 63. Podemos observar que todas as mutações estão localizadas na periferia da molécula, mas em regiões distintas umas das outras.

Figura 63 - Estrutura tridimensional predita da β -glucosidase do mutante 2-10A

A estrutura tridimensional está representada no formato de fitas. Os resíduos catalíticos (E^{166} e E^{377}) estão representados na forma de esferas vermelhas. Os resíduos que formam o sítio da glicona estão representados na forma de esferas verdes e os resíduos que delimitam a entrada do sítio ativo estão representados como esferas rosas. Os resíduos que foram modificados em relação à estrutura nativa da Bglhi (DE GIUSEPPE et al., 2014) estão representados na forma de esferas amarelas e estão devidamente identificados na estrutura. Cada figura na sequência apresenta uma rotação no eixo y de 90° C em relação à anterior. As imagens foram feitas com auxílio do programa PyMOL Viewer.

Para o clone 5-7C, os nucleotídeos mutados na sequência estão reunidos na Tabela 26. Nas duas posições (421 e 704) do gene *bglhi* houve mutações do tipo transição.

Tabela 26: Nucleotídeos mutados no clone 5-7C

Posição do gene	Nucleotídeo original	Nucleotídeo inserido
421	G	A
704	A	G

O alinhamento entre os aminoácidos da Bglhi e do clone 5-7C foi realizado (Fig. 64) e mostrou que a mutação na posição 421 acarretou na substituição de Ala¹⁴¹ por Thr¹⁴¹, e a mutação na posição 704 em substituição de Asn²³⁵ por Ser²³⁵, a mesma mutação observada no clone 1-6D.

Bglhi	MSLPDFKWFATAAYQIEGSVNEDGRGPSIWDTFCAIPGKIADGSSGAVACDSYKRTKE	60
5-7C	MSLPDFKWFATAAYQIEGSVNEDGRGPSIWDTFCAIPGKIADGSSGAVACDSYKRTKE	60

Bglhi	DIALLKELGANSYRFSISWSRIIPLGGRNDPINQKGIDHYVKFVDDLIEAGITPFITLFH	120
5-7C	DIALLKELGANSYRFSISWSRIIPLGGRNDPINQKGIDHYVKFVDDLIEAGITPFITLFH	120

	pos. 141 ←	
Bglhi	WDLPDALDKRYGGFLNKEEFAADFENYARIMFKAI PKCKHWITFNEPWCSAILGYNTGYF	180
5-7C	WDLPDALDKRYGGFLNKEEFTADFENYARIMFKAI PKCKHWITFNEPWCSAILGYNTGYF	180
	*****:*****	
	pos. 235 ←	
Bglhi	APGHTSDRSKSPVGDSAREPWIVGHNILIAHARAVKAYREDFKPTQGGEIGITLNGDATL	240
5-7C	APGHTSDRSKSPVGDSAREPWIVGHNILIAHARAVKAYREDFKPTQGGEIGITLNGDATL	240
	***** , *****	
Bglhi	PWDPEDPADIEACDRKIEFAISWFADPIYFGKYPSMRKQLGDRLEPFTPEEVALVKGSN	300
5-7C	PWDPEDPADIEACDRKIEFAISWFADPIYFGKYPSMRKQLGDRLEPFTPEEVALVKGSN	300

Bglhi	DFYGMNHYTANYIKHKTGVPPEDDFLGNLETIFYNKYGDCIGPETQSFWLRPHAQGFRDL	360
5-7C	DFYGMNHYTANYIKHKTGVPPEDDFLGNLETIFYNKYGDCIGPETQSFWLRPHAQGFRDL	360

Bglhi	LNWLSKRYGYPKIYVTENGTSKLGENDMPLEQVLEDDFRVKYFNDYVRAMAAVAEDGCN	420
5-7C	LNWLSKRYGYPKIYVTENGTSKLGENDMPLEQVLEDDFRVKYFNDYVRAMAAVAEDGCN	420

Bglhi	VRGYLAWSLLDNFEWAEGYETRFVTVYDYANDQKRYPKSAKSLKPLFDSLIRKE	476
5-7C	VRGYLAWSLLDNFEWAEGYETRFVTVYDYANDQKRYPKSAKSLKPLFDSLIRKE	476

Figura 64 - Alinhamento entre as sequências de aminoácidos da Bglhi e do clone 5-7C

O alinhamento foi realizado com auxílio do programa BioEdit.

A estrutura tridimensional da β -glucosidase do mutante 5-7C fornecida pelo software MODELLER está representada na Figura 65. Podemos observar que a mutação T¹⁴¹ está na região periférica da molécula enquanto a mutação S²³⁵ está muito próxima do sítio da glicona.

Figura 65 - Estrutura tridimensional predita da β -glucosidase do mutante 5-7C

A estrutura tridimensional está representada no formato de fitas. Os resíduos catalíticos (E¹⁶⁶ e E³⁷⁷) estão representados na forma de esferas vermelhas. Os resíduos que formam o sítio da glicona estão representados na forma de esferas verdes e os resíduos que delimitam a entrada do sítio ativo estão representados como esferas rosas. Os resíduos que foram modificados em relação à estrutura nativa da Bglhi (DE GIUSEPPE et al., 2014) estão representados na forma de esferas amarelas e estão devidamente identificados na estrutura. Cada figura na sequência apresenta uma rotação no eixo y de 90° C em relação à anterior. As imagens foram feitas com auxílio do programa PyMOL Viewer.

Para o clone 5-7H houve uma única mutação do tipo transversão apresentada na tabela abaixo.

Tabela 27: Nucleotídeo mutado no clone 5-7H

Posição do gene	Nucleotídeo original	Nucleotídeo inserido
710	A	T

O alinhamento entre os aminoácidos da Bglhi e do clone 5-7H foi realizado (Fig. 66) e mostrou que a mutação na posição 710 acarretou na substituição de Asp²³⁷ por Val²³⁷, a mesma mutação observada no clone 4-12D.

Bglhi	MSLPDFKWFATAAYQIEGSVNEDGRGPSIWDTFCAIPGKIADGSSGAVACDSYKRTKE 60
5-7H	MSLPDFKWFATAAYQIEGSVNEDGRGPSIWDTFCAIPGKIADGSSGAVACDSYKRTKE 60

Bglhi	DIALLKELGANSYRFSISWSRIIPLGGRNDPINQKGIDHYVKFVDDLEAGITPFITLFH 120
5-7H	DIALLKELGANSYRFSISWSRIIPLGGRNDPINQKGIDHYVKFVDDLEAGITPFITLFH 120

Bglhi	WDLPDALDKRYGGFLNKEEFAADFENYARIMFKAI PKCKHWITFNEPWCSAILGYNTGYF 180
5-7H	WDLPDALDKRYGGFLNKEEFAADFENYARIMFKAI PKCKHWITFNEPWCSAILGYNTGYF 180

	pos. 237 ←
Bglhi	APGHTSDRSKSPVGDSAREPWIVGHNILIAHARAVKAYREDFKPTQGGEIGITLNGDATL 240
5-7H	APGHTSDRSKSPVGDSAREPWIVGHNILIAHARAVKAYREDFKPTQGGEIGITLNGVATL 240
	***** ***
Bglhi	PWDPEDPADIEACDRKIEFAISWFADPIYFGKYPSMRKQLGDRLEPFTPEEVALVKGSN 300
5-7H	PWDPEDPADIEACDRKIEFAISWFADPIYFGKYPSMRKQLGDRLEPFTPEEVALVKGSN 300

Bglhi	DFYGMNHYTANYIKHKTGVPPEDDFLGNLETIFYNKYGDCIGPETQSFWRPHAQGFRDL 360
5-7H	DFYGMNHYTANYIKHKTGVPPEDDFLGNLETIFYNKYGDCIGPETQSFWRPHAQGFRDL 360

Bglhi	LNWLSKRYGYPKIYVTENGTSKLGENDMPLEQVLEDDFRVKYFNDYVRAMAAVAEDGCN 420
5-7H	LNWLSKRYGYPKIYVTENGTSKLGENDMPLEQVLEDDFRVKYFNDYVRAMAAVAEDGCN 420

Bglhi	VRGYLAWSLLDNFEWAEGYETRFVTVVDYANDQKRYPKSAKSLKPLFDSLIRKE 476
5-7H	VRGYLAWSLLDNFEWAEGYETRFVTVVDYANDQKRYPKSAKSLKPLFDSLIRKE 476

Figura 66 - Alinhamento entre as sequências de aminoácidos da Bglhi e do clone 5-7H.

O alinhamento foi realizado com auxílio do programa BioEdit.

A modelagem da estrutura tridimensional da β -glucosidase do mutante 5-7H fornecida pelo software MODELLER está representada na Figura 67. Podemos observar que a única mutação V^{237} está localizada muito próxima do sítio da glicona.

Figura 67 - Estrutura tridimensional predita da β -glucosidase do mutante 5-7H

A estrutura tridimensional está representada no formato de fitas. Os resíduos catalíticos (E^{166} e E^{377}) estão representados na forma de esferas vermelhas. Os resíduos que formam o sítio da glicona estão representados na forma de esferas verdes e os resíduos que delimitam a entrada do sítio ativo estão representados como esferas rosas. Os resíduos que foram modificados em relação à estrutura nativa da Bglhi (DE GIUSEPPE et al., 2014) estão representados na forma de esferas amarelas e estão devidamente identificados na estrutura. Cada figura na sequência apresenta uma rotação no eixo y de 90° C em relação à anterior. As imagens foram feitas com auxílio do programa PyMOL Viewer.

Um resumo de todas as mutações e suas respectivas substituições de aminoácidos encontradas em todas as sequências das β -glucosidasas modificadas estão reunidas na Tabela 28.

Tabela 28: Resumo de todas as mutações e suas respectivas substituições de aminoácidos para as β -glucosidases modificadas

Enzima	Mutação	Aminoácido	Substituição
1-9A	228 C $\rightarrow$ T	-	-
	511 G $\rightarrow$ A	171	Ala $\rightarrow$ Thr
	766 A $\rightarrow$ G	256	Lys $\rightarrow$ Glu
	977 T $\rightarrow$ A	326	Leu $\rightarrow$ His
1-7B	37 A $\rightarrow$ G	13	Thr $\rightarrow$ Ala
	99 C $\rightarrow$ T	-	-
	253 C $\rightarrow$ T	-	-
	673 A $\rightarrow$ T	225	Thr $\rightarrow$ Ser
	760 G $\rightarrow$ A	254	Asp $\rightarrow$ Asn
	842 T $\rightarrow$ A	281	Leu $\rightarrow$ Gln
	1029 G $\rightarrow$ C	-	-
1-1C	122 A $\rightarrow$ T	41	Lys $\rightarrow$ Met
	571 T $\rightarrow$ A	191	Ser $\rightarrow$ Thr
	925 A $\rightarrow$ G	309	Thr $\rightarrow$ Ala
	1032 G $\rightarrow$ A	-	-
	1059 C $\rightarrow$ T	-	-
1-1D	133 G $\rightarrow$ A	45	Gly $\rightarrow$ Ser
	239 C $\rightarrow$ T	80	Ser $\rightarrow$ Leu
	288 C $\rightarrow$ A	-	-
	768 G $\rightarrow$ A	-	-
	1068 C $\rightarrow$ T	-	-
	1141 T $\rightarrow$ C	381	Ser $\rightarrow$ Pro
1-6D	704 A $\rightarrow$ G	235	Asn $\rightarrow$ Ser
	717 C $\rightarrow$ T	-	-
2-10A	240 G $\rightarrow$ A	-	-
	437 A $\rightarrow$ G	-	-
	814 A $\rightarrow$ G	272	Lys $\rightarrow$ Glu
	1192 T $\rightarrow$ A	398	Phe $\rightarrow$ Ile
	1230 G $\rightarrow$ A	410	Met $\rightarrow$ Ile

Tabela 28: Resumo de todas as mutações e suas respectivas substituições de aminoácidos para as β -glucosidases modificadas (conclusão)

Enzima	Mutação	Aminoácido	Substituição
4-12D	710 A $\rightarrow$ T	237	Asp $\rightarrow$ Val
	879 C $\rightarrow$ T	-	-
	1166 C $\rightarrow$ A	389	Pro $\rightarrow$ His
	1184 A $\rightarrow$ G	395	Glu $\rightarrow$ Gly
	1424 A $\rightarrow$ G	475	Lys $\rightarrow$ Arg
5-7C	421 G $\rightarrow$ A	141	Ala $\rightarrow$ Thr
	704 A $\rightarrow$ G	235	Asn $\rightarrow$ Ser
5-7H	710 A $\rightarrow$ T	237	Asp $\rightarrow$ Val

4.3.7 Expressão e purificação das β -glucosidases expressas pelos clones 1-9A, 1-7B, 1-1C, 1-1D, 1-6D, 2-10A, 4-12D, 5-7C e 5-7H

Bactérias da linhagem *E. coli* BL21(DE3)pLysS foram transformadas com os plasmídeos dos clones 1-9A, 1-7B, 1-1C, 1-1D, 1-6D, 2-10A, 4-12D, 5-7C e 5-7H.

A purificação das enzimas modificadas expressas pelos mutantes foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel, com rendimentos de aproximadamente 50-70%. A análise por PAGE das enzimas purificadas revelou bandas proteicas únicas para cada um dos clones (Fig. 68, linhas a₁-i₁), coincidentes com as bandas únicas de atividade β -glucosidásica (Fig. 68, linhas a₂-i₂).

Figura 68 – Análise eletroforética por PAGE (A e B) das β -glucosidases modificadas

As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% em condições não desnaturantes (PAGE), conforme descrito em Material e Métodos. (a₁-i₁), Revelação com Coomassie Brilliant Blue R; (a₂-i₂) Atividade β -glucosidásica no gel, revelada com esculina. β -glucosidases expressas pelos mutantes 1-9A (Linhas a₁ e a₂, 15 μ g), 1-7B (Linhas b₁ e b₂, 17 μ g), 1-1C (Linhas c₁ e c₂, 25 μ g), 1-1D (Linhas d₁ e d₂, 20 μ g), 1-6D (Linhas e₁ e e₂, 25 μ g), 2-10A (Linhas f₁ e f₂, 22 μ g), 4-12D (Linhas g₁ e g₂, 25 μ g), 5-7C (Linhas h₁ e h₂, 26 μ g) e 5-7H (Linhas i₁ e i₂, 15 μ g).

A pureza das enzimas modificadas foi confirmada por SDS-PAGE (Fig. 69, linhas B-J) que permitiu também estimar a massa molecular aparente das β -glucosidases modificadas, todas próximas a 59 kDa.

Figura 69 – Análise eletroforética por SDS-PAGE das β -glucosidases modificadas

As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 10 % em condições desnaturantes (SDS-PAGE), conforme descrito em Material e Métodos. (Linha A) Padrão de massa molecular aparente, (Linhas B-J) β -glucosidases expressas pelos mutantes 1-9A (Linha B, 15 μ g), 1-7B (Linha C, 17 μ g), 1-1C (Linha D, 25 μ g), 1-1D (Linha E, 20 μ g), 1-6D (Linha F, 25 μ g), 2-10A (Linha G, 22 μ g), 4-12D (Linha H, 25 μ g), 5-7C (Linha I, 26 μ g) e 5-7H (Linha J, 15 μ g). Todas as bandas foram reveladas com Coomassie Brilliant Blue R.

4.3.8 Caracterização bioquímica e cinética da Bglhi e das β -glucosidases produzidas pelos mutantes 1-9A, 1-7B, 1-1C, 1-1D, 1-6D, 2-10A, 4-12D, 5-7C e 5-7H

4.3.8.1 Efeito da temperatura sobre a atividade pNP-glucosidásica da Bglhi e das enzimas produzidas pelos mutantes 1-9A, 1-7B, 1-1C, 1-1D, 1-6D, 2-10A, 4-12D, 5-7C e 5-7H

O efeito da temperatura sobre a atividade pNP-glucosidásica da Bglhi e das enzimas produzidas pelos mutantes 1-9A, 1-7B, 1-1C, 1-1D, 1-6D, 2-10A, 4-12D, 5-7C e 5-7H é mostrado na Figura 70. Para Bglhi, observa-se um aumento gradual da atividade específica entre 35 e 55 °C, atingindo um máximo em 60 °C. Acima dessa temperatura, a atividade específica cai abruptamente para cerca de 30% da atividade máxima já a 65 °C. Para as enzimas dos mutantes 1-9A, 1-7B, 1-1C, 1-1D, 1-6D e 5-7C os perfis observados de atividade em função da temperatura foram muito parecidos com aquele determinado para Bglhi, embora os máximos de atividade foram observados em 50 °C para 1-9A e 1-1C, 45 °C para 1-7B e 1-1D e 55°C para 1-6D e 5-7C. Por outro lado, alterações mais profundas foram observadas para as enzimas dos mutantes 2-10A, 4-12D e 5-7H que apresentaram platôs de máxima atividade catalítica nas faixas de 45-50 °C, 40-50 °C e 35-50 °C, respectivamente. Além disso, a 55 °C a atividade da β -glucosidase do mutante 4-12D foi praticamente nula enquanto para as enzimas dos mutantes 5-7H e 2-10A a atividade foi cerca de 50% e 40% da máxima, respectivamente.

Figura 70: Efeito da temperatura sobre a atividade *p*NP-glucosidásica de Bglhi e das enzimas produzidas pelos mutantes 1-9A, 1-7B, 1-1C, 1-1D, 1-6D, 2-10A, 4-12D, 5-7C e 5-7H

As atividades foram determinadas em diferentes temperaturas empregando tampão Bis-Tris 50 mmol L⁻¹, pH 6,0, contendo *p*NP-Glc 2 mmol L⁻¹ num volume final de 0,6 mL, como descrito em Material e Métodos. Os experimentos foram repetidos três vezes utilizando três preparações distintas das enzimas puras. Cada ponto representa a média ± desvio padrão dos ensaios realizados em duplicatas.

4.3.8.2 Efeito do pH sobre a atividade *p*NP-glucosidásica da Bglhi e das enzimas produzidas pelos mutantes 1-9A, 1-7B, 1-1C, 1-1D, 1-6D, 2-10A, 4-12D, 5-7C e 5-7H

O efeito do pH sobre a atividade *p*NP-glucosidásica da Bglhi e das enzimas produzidas pelos mutantes 1-9A, 1-7B, 1-1C, 1-1D, 1-6D, 2-10A, 4-12D, 5-7C e 5-7H é mostrado na Figura 71. Para Bglhi, observa-se um aumento abrupto da atividade catalítica entre pH 4,0 a 5,0 atingindo um platô de máxima atividade na faixa de pH de 5,0 – 7,0. Acima de 7,0, a atividade decai atingindo 56% e 16% da máxima atividade em pH 7,5 e 8,0, respectivamente. Um perfil muito similar foi observado para a enzima produzida pelo mutante 2-10A, com um platô de máxima atividade catalítica exatamente na mesma faixa determinada para Bglhi. Por outro lado, perfis mais estreitos de atividade em função do pH foram observados para as demais enzimas e os platôs de máxima atividade foram obtidos nas faixas de pH de 5,0-6,0 para as enzimas dos mutantes 1-1C, 1-6D e 5-7C; 5,0-5,5 para as enzimas dos mutantes 4-12D e 5-7H; 5,0-6,5 para a enzima do mutante 1-9A; 5,5-6,5 para a enzima do mutante 1-7B e 4,5-5,5 para a enzima do mutante 1-1D.

Figura 71: Efeito do pH sobre a atividade pNP-glucosidásica de Bglhi e das enzimas produzidas pelos mutantes 1-9A, 1-7B, 1-1C, 1-1D, 1-6D, 2-10A, 4-12D, 5-7C e 5-7H

As atividades foram determinadas a 45 °C (1-9A, 1-7B, 1-1C, 1-1D, 2-10A, 4-12D, 5-7H) ou 50 °C (Bglhi, 1-6D, 5-7C) em meio reacional constituído de tampão McIlvaine em diferentes valores de pH e pNP-Glc 2 mmol L⁻¹, como descrito em Material e Métodos. Os experimentos foram repetidos três vezes utilizando três preparações distintas das enzimas puras. Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão dos ensaios realizados em duplicatas.

4.3.8.3 Determinação dos parâmetros cinéticos para estimulação da atividade *p*NP-glucosidásica da Bglhi e das enzimas produzidas pelos mutantes 1-9A, 1-7B, 1-1C, 1-1D, 1-6D, 2-10A, 4-12D, 5-7C e 5-7H

Os parâmetros cinéticos determinados para estimulação da atividade *p*NP-glucosidásica da Bglhi e das enzimas produzidas pelos mutantes 1-9A, 1-7B, 1-1C, 1-1D, 1-6D, 2-10A, 4-12D, 5-7C e 5-7H com o aumento das concentrações de *p*NP-Glc estão sumarizadas na Tabela 29. As correspondentes curvas cinéticas são mostradas na Figura 72.

Independentemente da enzima, as estimulações das atividades *p*NP-glucosidásicas seguiram curvas simples de saturação e obedeceram a cinética cooperativa ($n_H > 1$), sugerindo a presença de dois ou mais sítios acessíveis para a ligação do substrato. Os valores de V_{max} determinados para as β -glucosidases dos mutantes 4-12D e 5-7H foram cerca de 1,5 vezes maiores que aquela determinada para Bglhi; já as enzimas dos mutantes 1-1C, 5-7C e 1-6D apresentaram valores de V_{max} muito próximas. Por outro lado, as demais enzimas apresentaram velocidades máximas inferiores. O valor de V_{max} determinado para a enzima do mutante 1-1D foi cerca de 9 vezes menor que aquele determinado para Bglhi.

A maioria das enzimas estudadas apresentaram maiores afinidades aparente para o substrato sintético quando comparada a Bglhi. As exceções foram as enzimas dos mutantes 1-1D, 2-10A e 5-7H que apresentaram constantes de afinidade aparente cerca de 3,8, 1,8 e 1,3 vezes maiores, respectivamente.

Em relação à eficiência de utilização do substrato, avaliada pela razão $k_{cat}/K_{pNP-Glc}$, as β -glucosidases dos mutantes 1-1C, 1-6D, 4-12D e 5-7H foram cerca de 1,4, 2,1, 2,2 e 1,2 vezes mais eficientes, respectivamente, quando comparada à Bglhi. Os efeitos mais negativos foram observados nas eficiências catalíticas para liberação de *p*NP⁻ a partir do *p*NP-Glc determinados para as β -glucosidases dos mutantes 1-1D e 2-10A, cerca de 34 e 3,6 vezes menos eficientes, respectivamente, quando comparada à Bglhi. As demais enzimas dos outros mutantes apresentaram um valor de $k_{cat}/K_{pNP-Glc}$ muito próximo do determinado para Bglhi.

Tabela 29: Parâmetros cinéticos determinados para a estimulação da atividade β -glucosidásica da Bglhi e das enzimas produzidas pelos mutantes 1-9A, 1-7B, 1-1C, 1-1D, 1-6D, 2-10A, 4-12D, 5-7C e 5-7H por pNP-Glc

Enzima	$V_{\max}$ (U mg ⁻¹)	$K_{pNP-Glc}$ (mmol L ⁻¹)	$k_{cat}/K_{pNP-Glc}$ (L mmol ⁻¹ s ⁻¹)	n_H
Bglhi	37,3 ± 1,8	0,22 ± 0,01	158,53	1,2
1-9A	18,7 ± 1,3	0,12 ± 0,01	144,91	1,3
1-7B	22,8 ± 1,2	0,16 ± 0,01	132,52	1,3
1-1C	41,3 ± 2,2	0,17 ± 0,01	225,90	1,3
1-1D	4,2 ± 0,3	0,83 ± 0,02	4,7	1,1
1-6D	35,9 ± 2,9	0,10 ± 0,01	335,67	1,3
2-10A	18,7 ± 0,9	0,40 ± 0,03	43,47	1,1
4-12D	54,7 ± 3,8	0,15 ± 0,01	340,96	1,1
5-7C	27,1 ± 1,3	0,16 ± 0,01	158,37	1,1
5-7H	55,5 ± 3,3	0,28 ± 0,02	185,33	1,2

As atividades foram determinadas a 45 °C (1-9A, 1-7B, 1-1C, 1-1D, 2-10A, 4-12D, 5-7H) ou 50 °C (Bglhi, 1-6D, 5-7C) em meio reacional constituído de tampão Bis-Tris 50 mmol L⁻¹, pH 6,0 (para Bglhi), ou tampão Mcllvaine, pH 5,0 (para 5-7C), 5,5 (para 1-1C, 1-1D, 1-6D, 2-10A) e 6,0 (para 1-9A, 1-7B) ou tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5,0 (para 5-7H) e 5,5 (para 4-12D) e diferentes concentrações de pNP-Glc. As curvas cinéticas foram repetidas três vezes utilizando três preparações distintas das enzimas puras. Cada ensaio enzimático foi realizado em duplicata e os parâmetros cinéticos são apresentados como a média ± desvio padrão calculados para cada repetição (n=3).

Figura 72: Estimulação da atividade β -glucosidásica da Bglhi e das enzimas dos mutantes 1-9A, 1-7B, 1-1C, 1-1D, 1-6D, 2-10A, 4-12D, 5-7C e 5-7H por pNP-Glc

As atividades foram determinadas a 45 °C (1-9A, 1-7B, 1-1C, 1-1D, 2-10A, 4-12D, 5-7H) ou 50 °C (Bglhi, 1-6D, 5-7C) em meio reacional constituído de tampão Bis-Tris 50 mmol L⁻¹, pH 6,0 (para Bglhi), ou tampão Mcllvaine, pH 5,0 (para 5-7C), 5,5 (para 1-1C, 1-1D, 1-6D, 2-10A) e 6,0 (para 1-9A, 1-7B) ou tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5,0 (para 5-7H) e 5,5 (para 4-12D) e diferentes concentrações de pNP-Glc. Os experimentos foram repetidos três vezes utilizando três preparações distintas das enzimas puras. Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão dos ensaios realizados em duplicatas.

4.3.8.4 Efeito de concentrações crescentes de glicose sobre a atividade *p*NP-glucosidásica da Bglhi e das enzimas produzidas pelos mutantes 1-9A, 1-7B, 1-1C, 1-1D, 1-6D, 2-10A, 4-12D, 5-7C e 5-7H

O efeito de concentrações crescentes de glicose na faixa de 0-1000 mmol L⁻¹ sobre as atividades da Bglhi e das β -glucosidases expressas pelos mutantes 1-9A, 1-7B, 1-1C, 1-1D, 1-6D, 2-10A, 4-12D, 5-7C e 5-7H, em presença de *p*NP-Glc saturante para cada enzima, é mostrado na Figura 73. De acordo com o que já havia sido relatado para Bglhi (SOUZA et al., 2014), a estimulação da liberação de *p*NP⁻ por glicose foi máxima (cerca de 1,9 vezes) em concentração 50 mmol L⁻¹. Acima desta concentração, entretanto, ocorreu uma diminuição do efeito estimulatório, e valores abaixo do controle, caracterizando inibição da atividade enzimática, foram observados em concentrações de glicose acima de 400 mmol L⁻¹.

De maneira geral, podemos dizer que todas as enzimas expressas pelos mutantes apresentaram grandes mudanças em resposta a presença de glicose no meio reacional. Devemos salientar que o verdadeiro efeito da glicose sobre a atividade *p*NP-glucosidásica foi concluído apenas nessa etapa do trabalho, onde o efeito foi estudado sobre condições ideais para cada enzima (pH e temperatura ótimos e concentração de substrato saturante) e não sobre condições fixas impostas nas etapas de *screening*. Nestas condições, algumas das enzimas selecionadas mostraram o efeito estimulatório muito parecidos com Bglhi, como é o caso das enzimas dos mutantes 1-9A, 1-7B, 1-1D, 1-1C e 2-10A. A liberação de *p*NP⁻ foi estimulada por glicose cerca de 1,5 e 1,6 vezes para as enzimas 1-7B e 1-1C, respectivamente, em concentração 20 mmol L⁻¹. Já para as enzimas 1-9A, 2-10A e 1-1D a estimulação por glicose foi máxima, cerca de 1,75, 1,8 e 1,7 vezes, em concentrações de 50 mmol L⁻¹, 80 mmol L⁻¹ e 150 mmol L⁻¹, respectivamente. Com exceção da enzima expressa pelo mutante 1-1D que apresentou atividade acima do controle até 1 mol L⁻¹ de glicose, as enzimas dos mutantes 1-9A, 1-7B, 1-1C e 2-10A, mostraram diminuição do efeito estimulatório acima da concentração de glicose que resultou em máxima estimulação da atividade *p*NP-glucosidásica, e valores abaixo do controle, caracterizando inibição da atividade enzimática, foram observados em

concentrações de glicose acima de 300 mmol L⁻¹, 300 mmol L⁻¹, 200 mmol L⁻¹ e 500 mmol L⁻¹, respectivamente. Por apresentarem efeitos estimulatórios muito parecidos com Bglhi, a partir desse ponto do trabalho estas enzimas não foram mais estudadas. Além disso, as mutações presentes do mutante 1-1D foram deletérias para própria atividade catalítica, tornando inviável seguir o estudo com esta enzima.

As demais enzimas mostraram mudanças muito interessantes no efeito estimulatório pela glicose quando comparadas à Bglhi e podemos agrupá-los em dois novos grupos de acordo com a mutação em comum na região do sítio ativo. As enzimas expressas pelos mutantes 1-6D e 5-7C, contendo a mutação N235S, mostraram um comportamento muito parecido entre si. A atividade *p*NP-glucosidásica foi estimulada cerca 1,3 e 1,4 vezes por glicose em concentração de 30 mmol L⁻¹, respectivamente. Além disso, acima desta concentração de máxima estimulação, ocorreu uma diminuição da atividade *p*NP-glucosidásica e valores abaixo do controle foram observados em concentrações de glicose acima de 150 mmol L⁻¹, muito abaixo daquele determinado para Bglhi (400 mmol L⁻¹).

O segundo grupo, composto pelas enzimas dos mutantes 4-12D e 5-7H (contendo a mutação D237V), mostraram respostas diferentes quanto a sensibilidade à glicose. Para a enzima expressa pelo mutante 5-7H, a estimulação da liberação de *p*NP⁻ por glicose foi de apenas 1,3 vezes em concentração 100 mmol L⁻¹. Acima desta concentração, ocorreu uma diminuição do efeito estimulatório, e valores abaixo do controle foram observados em concentrações de glicose acima de 300 mmol L⁻¹. Em grande contraste, a atividade *p*NP-glucosidásica da enzima expressa pelo mutante 4-12D não foi estimulada por glicose, e acima de 50 mmol L⁻¹ as atividades já foram abaixo daquela determinada na ausência deste monossacarídeo, caracterizando inibição da atividade enzimática.

Figura 73: Efeito da concentração de glicose sobre a atividade *pNP*-glucosidásica da Bglhi e das enzimas dos mutantes 1-9A, 1-7B, 1-1C, 1-1D, 1-6D, 2-10A, 4-12D, 5-7C e 5-7H

As atividades foram determinadas nas mesmas condições de temperatura e pH descritos na legenda da Figura 72 e em concentrações saturantes de *pNP*-Glc para cada enzima (2 mmol L⁻¹ para Bglhi e 1-7B; 1,5 mmol L⁻¹ para 1-9A, 1-1C, 4-12D, 5-7C, 1-6D; 3 mmol L⁻¹ para 2-10A e 5-7H e 8 mmol L⁻¹ para 1-1D). Os experimentos foram repetidos três vezes utilizando três preparações distintas das enzimas puras. Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão dos ensaios realizados em duplicatas.

4.3.8.5 Estudo cinético detalhado da estimulação da atividade *pNP*-glucosidásica da Bglhi por glicose e xilose

Antes dar continuidade aos estudos envolvendo as enzimas expressas pelos mutantes 4-12D, 5-7H, 5-7C e 1-6D, fez-se necessário uma análise detalhada da estimulação da atividade *pNP*-glucosidásica da Bglhi por glicose e xilose, para podermos afirmar que o mecanismo descrito para a enzima nativa (SOUZA et al., 2013) poderia ser aplicado à enzima recombinante Bglhi.

O efeito de concentrações crescentes de glicose ou xilose (0-1000 mmol L⁻¹) sobre a atividade da Bglhi, utilizando o substrato *pNP*-Glc em diferentes concentrações fixas, está apresentado nas Figura 74. Concordando com o observado anteriormente na Figura 73, em concentração saturante de substrato, a estimulação da liberação de *pNP*⁻ por glicose foi máxima (cerca de 1,9 vezes) em concentração 50 mmol L⁻¹ (Fig. 74A). Xilose também estimulou cerca de 2,0 vezes a liberação de *pNP*⁻ em concentração de 100 mmol L⁻¹ (Fig. 74B). Acima destas concentrações, ocorreu uma diminuição do efeito estimulatório para ambos os monossacarídeos, e valores abaixo do controle, foram observados em concentrações de glicose e xilose acima de 400 mmol L⁻¹ e 750 mmol L⁻¹, respectivamente. O efeito estimulatório da atividade *pNP*-glucosidásica e as concentrações dos monossacarídeos requeridas para a máxima estimulação e inibição foram dependentes da concentração de substrato. Com 1 mmol L⁻¹ de *pNP*-Glc, por exemplo, a estimulação da liberação de *pNP*⁻ por glicose e xilose foi de aproximadamente 1,5 vezes e ocorreu em menores concentrações dos monossacarídeos (30 mmol L⁻¹ de glicose e 80 mmol L⁻¹ de xilose), quando comparado com os valores obtidos em concentrações saturantes de substrato. Além disso, as concentrações dos monossacarídeos requeridas para inibir a atividade enzimática também foram inferiores e corresponderam a 200 mmol L⁻¹ para glicose e 500 mmol L⁻¹ para xilose.

Figura 74: Efeito de concentrações crescentes de glicose (A) e xilose (B) sobre a atividade da Bglhi em presença de diferentes concentrações fixas de pNP-Glc

A atividade pNP-glucosidásica foi determinada a 50 °C em tampão Bis-Tris 50 mmol L^{-1} , pH 6,0. As concentrações fixas de pNP-Glc foram: (●) 0,5 mmol L^{-1} , (●) 1 mmol L^{-1} e (●) 2 mmol L^{-1} . Os experimentos foram repetidos três vezes utilizando três preparações distintas da enzima pura. Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão dos ensaios realizados em duplicatas.

A estimulação da atividade da Bglhi por *p*NP-Glc na presença de concentrações fixas e estimulatórias de glicose ou xilose estão apresentados na Figura 75. Os parâmetros cinéticos calculados com base nesses dados estão reunidos na Tabela 30. Em concentrações fixas de glicose de 0 a 50 mmol L⁻¹, o aumento nas concentrações de *p*NP-Glc (0,005-4 mmol L⁻¹) estimulou a atividade enzimática seguindo uma curva simples de saturação até atingir um $V_{\max} = 70,4 \pm 2,8 \text{ U mg}^{-1}$, valor cerca de 1,9 vezes maior que o estimado na ausência de glicose (Fig. 75A). Por outro lado, a afinidade aparente da enzima pelo substrato diminuiu com o aumento da concentração de glicose no meio reacional, atingindo um valor de $0,50 \pm 0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ na presença de 50 mmol L⁻¹ de glicose (Tabela 30). Resultados similares foram obtidos para estimulação da atividade *p*NP-glucosidásica na presença de concentrações fixas de xilose. Observou-se um aumento de cerca de 2 vezes no valor de $V_{\max}$ ($74,5 \pm 3,1 \text{ U mg}^{-1}$) quando comparado com o valor obtido na ausência deste monossacarídeo ($36,4 \pm 1,4 \text{ U mg}^{-1}$). Além disso, a diminuição na afinidade da enzima pelo substrato com o aumento da concentração de xilose no meio reacional foi muito parecida com o observado no caso da glicose (Tabela 30). Juntos, os valores obtidos para $K_{p\text{NP-Glc}}$ indicam que ambos os monossacarídeos competem com o substrato pela ligação ao SC mesmo em concentrações estimulatórias. Além disso, independentemente da concentração fixa de glicose ou xilose, a estimulação da atividade *p*NP-glucosidásica ocorreu com cooperatividade positiva ($n_H > 1$) sugerindo a presença de mais de um sítio acessível para a ligação do substrato na molécula de enzima. Apesar das alterações em $V_{\max}$ e $K_{p\text{NP-Glc}}$ na presença de glicose ou xilose, os valores de $k_{\text{cat}}/K_{p\text{NP-Glc}}$ sofreram alterações de no máximo 15% (Tabela 30).

Figura 75: Estimulação da atividade da Bglhi por pNP-Glc em ausência e presença de concentrações fixas de glicose (A) ou xilose (B)

A atividade pNP-glucosidásica foi determinada a 50 °C em tampão Bis-Tris 50 mmol L⁻¹, pH 6,0. As concentrações fixas de glicose foram: (○) ausente, (●) 5 mmol L⁻¹, (●) 10 mmol L⁻¹, (●) 20 mmol L⁻¹, (●) 50 mmol L⁻¹. As concentrações fixas de xilose foram: (○) ausente, (●) 10 mmol L⁻¹, (●) 30 mmol L⁻¹, (●) 50 mmol L⁻¹, (■) 100 mmol L⁻¹. Os experimentos foram repetidos três vezes utilizando três preparações distintas da enzima pura. Cada ponto representa a média ± desvio padrão dos ensaios realizados em duplicatas.

Tabela 30: Parâmetros cinéticos calculados para estimulação da atividade da Bglhi por pNP-Glc na ausência e presença de concentrações fixas de glicose ou xilose

	[Monossacarídeo] (mmol L ⁻¹)	V _{max} (U mg ⁻¹)	K _{pNP-Glc} (mmol L ⁻¹)	k _{cat} /K _{pNP-Glc} (L mmol ⁻¹ s ⁻¹)	n _H
Controle	0	36,4 ± 1,4	0,22 ± 0,01	154,7 ± 16,1	1,2
Glicose	5	46,8 ± 1,9	0,25 ± 0,01	175,0 ± 15,1	1,2
	10	49,4 ± 2,4	0,28 ± 0,02	165,0 ± 21,2	1,4
	20	56,1 ± 1,7	0,36 ± 0,01	145,7 ± 9,1	1,3
	50	70,4 ± 2,8	0,50 ± 0,01	131,7 ± 8,4	1,4
	100	74,5 ± 3,1	0,52 ± 0,01	134,0 ± 8,7	1,4
Xilose	10	47,9 ± 1,5	0,25 ± 0,01	179,1 ± 13,7	1,3
	30	59,3 ± 2,5	0,34 ± 0,02	163,1 ± 17,6	1,5
	50	64,1 ± 1,9	0,39 ± 0,02	153,7 ± 12,0	1,4
	100	74,5 ± 3,1	0,52 ± 0,01	134,0 ± 8,7	1,4

A atividade pNP-glucosidásica foi determinada a 50 °C em tampão Bis-Tris 50 mmol L⁻¹, pH 6,0, contendo glicose ou xilose nas concentrações indicadas. Os experimentos foram repetidos três vezes utilizando três preparações distintas da enzima pura e cada ensaio enzimático foi realizado em duplicata. Os parâmetros cinéticos são apresentados como a média ± desvio padrão dos valores calculados para cada repetição (n =3).

O efeito de concentrações estimulatórias crescentes de glicose (1-100 mmol L⁻¹) ou xilose (1-200 mmol L⁻¹) sobre a atividade da Bglhi, utilizando o substrato pNP-Glc em diferentes concentrações fixas, está apresentado nas Figura 76. Os parâmetros cinéticos calculados com base nesses dados estão reunidos na Tabela 31. Em concentrações fixas de substrato de 0,5 a 2 mmol L⁻¹, o aumento nas concentrações de glicose estimulou a atividade seguindo curvas simples de saturação (Fig. 76A) até atingir um V_{max} = 68,5 ± 1,6 U mg⁻¹, valor cerca de 90% maior que o

estimado na ausência de glicose ($36,4 \pm 1,4 \text{ U mg}^{-1}$). O mesmo foi observado no caso da xilose, com a $V_{\max}$ atingindo $74,1 \pm 3,4 \text{ U mg}^{-1}$, valor cerca de 103% maior que o estimado na ausência deste monossacarídeo (Fig. 76B). As afinidades aparentes para glicose (K_{Glc}) foram maiores que para xilose (K_{Xil}) em todas as concentrações de substrato testadas. Além disso, as afinidades aparentes para glicose e xilose diminuíram cerca de 2,5 vezes à medida que a concentração de substrato aumentou (Tabela 31), indicando que o substrato compete com os monossacarídeos pela ligação dos seus sítios. A cooperatividade positiva observada para estimulação da atividade enzimática por glicose e xilose sugere múltiplos sítios para os monossacarídeos na molécula de enzima.

Tabela 31: Parâmetros cinéticos para estimulação da atividade da Bglhi por glicose e xilose em presença de concentrações fixas de pNP-Glc

Monossacarídeo	[pNP-Glc] (mmol L ⁻¹)	$V_{\max}$ (U mg ⁻¹)	K_{Glc} ou K_{Xil} (mmol L ⁻¹)	n_H
Glicose (1 - 100 mmol L ⁻¹)	0,5	$35,0 \pm 1,2$	$4,6 \pm 0,2$	1,7
	1,0	$56,0 \pm 1,9$	$8,6 \pm 0,4$	1,2
	2,0	$68,5 \pm 1,6$	$11,4 \pm 0,6$	1,3
Xilose (1 - 200 mmol L ⁻¹)	0,5	$36,6 \pm 1,2$	$6,9 \pm 0,2$	1,1
	1,0	$55,0 \pm 2,4$	$9,2 \pm 0,3$	1,2
	2,0	$74,1 \pm 3,4$	$17,5 \pm 0,8$	1,2

A atividade pNP-glucosidásica foi determinada a 50 °C em tampão Bis-Tris 50 mmol L⁻¹, pH 6,0, contendo pNP-Glc nas concentrações indicadas. Os experimentos foram repetidos três vezes utilizando três preparações distintas da enzima pura e cada ensaio enzimático foi realizado em duplicata. Os parâmetros cinéticos são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão dos valores calculados para cada repetição (n = 3).

Figura 76: Estimulação da atividade *p*NP-glucosidásica da Bglhi por glicose (A) ou xilose (B) presença de concentrações fixas de *p*NP-Glc

A atividade *p*NP-glucosidásica foi determinada a 50 °C em tampão Bis-Tris 50 mmol L^{-1} , pH 6,0. As concentrações fixas de *p*NP-Glc foram: (●) 0,5 mmol L^{-1} , (●) 1 mmol L^{-1} e (●) 2 mmol L^{-1} . Os experimentos foram repetidos três vezes utilizando três preparações distintas da enzima pura. Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão dos ensaios realizados em duplicatas.

A Figura 77 mostra o efeito de concentrações crescentes de glicose sobre a atividade da Bglhi na presença de concentrações fixas de xilose (Fig. 77A) e o de concentrações crescentes de xilose sobre a atividade da Bglhi na presença de concentrações fixas de glicose (Fig. 77B), ambas com *p*NP-Glc saturante. Os parâmetros cinéticos calculados para estas curvas estão apresentados na Tabela 32. Observa-se que o aumento da concentração fixa de cada um dos monossacarídeos afeta a velocidade basal, mas não a velocidade máxima. Além disso, observa-se que a constante de afinidade aparente para um monossacarídeo aumenta com o aumento da concentração do outro monossacarídeo. Em ambos os casos, a afinidade aparente da Bglhi por um modulador diminui na presença do outro. Assim, o valor de K_{Glc} aumentou 1,2 vezes com o aumento da concentração fixa de xilose e o valor de K_{Xil} aumentou 1,4 vezes com o aumento da concentração fixa de glicose. Esses resultados indicam que glicose e xilose compete pela ligação dos mesmos sítios na molécula de enzima. Além disso, em todas as condições testadas, a estimulação pelos monossacarídeos foi cooperativa (Tabela 32).

Figura 77: Estimulação da atividade pNP-glucosidásica da BgIhI por glicose na presença de concentrações fixas de xilose e vice-versa

A atividade pNP-glucosidásica foi determinada a 50 °C em tampão Bis-Tris 50 $mmol\ L^{-1}$, pH 6,0. As concentrações fixas de xilose (A) ou glicose (B) foram: (●) ausente, (●) 20 $mmol\ L^{-1}$ e (●) 50 $mmol\ L^{-1}$. Os experimentos foram repetidos três vezes utilizando três preparações distintas da enzima pura. Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão dos ensaios realizados em duplicatas.

Tabela 32: Parâmetros cinéticos calculados para a modulação da atividade da Bglhi por glicose e/ou xilose

[Glicose] (mmol L ⁻¹)	[Xilose] (mmol L ⁻¹)	V _{max} (U mg ⁻¹)	K _{Glc} ou K _{Xil} (mmol L ⁻¹)	n _H
Variável	0	68,5 ± 1,6	11,4 ± 0,6	1,3
Variável	20	65,7 ± 3,3	14,1 ± 0,4	1,5
0	Variável	74,1 ± 2,4	17,5 ± 0,7	1,2
20	Variável	72,0 ± 2,4	24,2 ± 0,7	1,4

A atividade *p*NP-glucosidásica foi determinada a 50 °C em tampão Bis-Tris 50 mmol L⁻¹, pH 6,0, contendo *p*NP-Glc nas concentrações indicadas. Os experimentos foram repetidos três vezes utilizando três preparações distintas da enzima pura e cada ensaio enzimático foi realizado em duplicata. Os parâmetros cinéticos são apresentados como a média ± desvio padrão dos valores calculados para cada repetição (n =3).

4.3.8.6 Estudo cinético da estimulação da atividade *p*NP-glucosidásica das enzimas dos mutantes 4-12D, 5-7H, 5-7C e 1-6D por glicose e xilose

A figura 78 reúne os dados do efeito de concentrações crescentes de glicose (já apresentados na Figura 73) e xilose na faixa de 0-1000 mmol L⁻¹ sobre a atividade *p*NP-glucosidásica das enzimas dos mutantes 4-12D, 5-7H, 5-7C e 1-6D juntamente com os dados da Bglhi, para melhor comparação. Na Tabela 33 estão reunidos os parâmetros cinéticos para estimulação da atividade *p*NP-glucosidásica destas enzimas por glicose e xilose, bem como as concentrações que resultaram em máxima estimulação e tolerância aos monossacarídeos. Vale ressaltar que a estimulação ocorreu com cooperatividade positiva em todos os casos, sugerindo múltiplos sítios de ligação para os monossacarídeos na molécula de enzima. A única exceção foi para a enzima do mutante 4-12D que aparentemente não apresenta sítio estimulatório para glicose.

Figura 78: Efeito de concentrações crescentes de glicose (linhas e pontos vermelhos) ou xilose (linhas e pontos azuis) sobre a atividade *p*NP-glucosidásica da Bglhi e das enzimas dos mutantes 4-12D, 5-7H, 5-7C e 1-6D

As atividades foram determinadas nas mesmas condições de temperatura e pH descritos na legenda da Figura 72 e em concentrações saturantes de *p*NP-Glc para cada enzima (2 mmol L⁻¹ para Bglhi; 1,5 mmol L⁻¹ para 4-12D, 5-7C e 1-6D; 3 mmol L⁻¹ para 5-7H). Os experimentos foram repetidos três vezes utilizando três preparações distintas das enzimas puras. Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão dos ensaios realizados em duplicatas.

Tabela 33: Estimulação da atividade pNP-glucosidásica da Bglhi e seus mutantes por glicose e xilose

Enzima	[pNP-Glc] (mmol L ⁻¹)	Monossacarídeo	K _{Glc} ou K _{Xil} (mmol L ⁻¹)	FS (vezes)	MC _{max} (mmol L ⁻¹)	MT (mmol L ⁻¹)	n _H
Bglhi	2	Glicose	10,9 ± 0,5	1,9	50	~ 400	1,2
		Xilose	17,6 ± 1,1	2,1	100	~ 750	1,2
4-12D	1,5	Glicose	-	-	-	50	-
		Xilose	16,7 ± 0,9	1,4	80	~ 340	1,1
5-7H	3	Glicose	19,7 ± 1,1	1,3	80-100	300	1,9
		Xilose	36,2 ± 2,9	1,6	150-200	~ 500	1,4
5-7C	1,5	Glicose	3,4 ± 0,2	1,4	30	150	1,2
		Xilose	8,7 ± 0,3	1,4	50-80	500	1,3
1-6D	1,5	Glicose	5,8 ± 0,3	1,3	20-30	150	1,2
		Xilose	6,7 ± 0,1	1,5	30-80	500	1,1

FS: fator de estimulação

Cada curva experimental foi repetida três vezes usando três preparações distintas da enzima pura, em condições saturantes de substrato indicados na tabela; cada ensaio enzimático foi realizado em duplicata. Os parâmetros cinéticos (K_{Glc}, K_{Xil} e n_H) foram determinados para o efeito de concentrações crescentes estimulatórias de glicose e xilose (na faixa de 0-MC_{max}) sobre a atividade enzimática. Os valores são apresentados como a média ± desvio padrão para cada repetição (n=3).

Os fatores de estimulação, tanto para glicose como para xilose, de todas as enzimas expressas pelos mutantes foram menores que os determinados para Bglhi (Tabela 33). Curiosamente, a atividade *p*NP-glucosidásica da β -glucosidase expressa pelo mutante 4-12D foi estimulada por xilose embora não tenha sido estimulada por glicose. Outra característica interessante nesses mutantes foi a alta variabilidade nos valores de MC_{max} e MT para glicose e xilose (Tabela 33), indicando que as mutações afetaram não apenas o efeito estimulatório nestas enzimas como também a sua tolerância aos monossacarídeos. Os valores estimados de IC_{50} para glicose foram 400, 580, 400 e 450 mmol L⁻¹ para as enzimas expressas pelos mutantes 4-12D, 5-7H, 5-7C e 1-6D, respectivamente, todos inferiores ao estimado para Bglhi (780 mmol L⁻¹). Já para xilose os valores estimados de IC_{50} corresponderam a 700, 870, 1000 e 920 mmol L⁻¹ para 4-12D, 5-7H, 5-7C e 1-6D, respectivamente. O valor de IC_{50} para xilose de Bglhi foi superior a 1 mol L⁻¹.

As afinidades aparentes de todas as enzimas por glicose (K_{Glc}) foram maiores que para xilose (K_{Xil}), em condições saturantes de *p*NP-Glc, com exceção da enzima do mutante 4-12D. As afinidades aparentes para glicose e xilose da enzima do mutante 5-7H foram cerca de 1,8 e 2,1 vezes menores, respectivamente, que a estimada para Bglhi. Em contraste, as enzimas dos mutantes 5-7C e 1-6D apresentaram afinidades aparentes muito maiores, para ambos os monossacarídeos, quando comparadas com os valores de Bglhi. Já a enzima do mutante 4-12D apresentou valor de K_{Xil} muito próximo do valor estimado para Bglhi.

A Figura 79 mostra o efeito de concentrações crescentes de *p*NP-Glc sobre a atividade de Bglhi e seus mutantes em presença de concentrações fixas de glicose ou xilose correspondentes a MC_{max} (exceto para o 4-12D onde a concentração de glicose utilizada foi igual a MT), juntamente com as curvas obtidas na ausência dos monossacarídeos. Os parâmetros cinéticos calculados a partir dos dados experimentais estão sumarizados na Tabela 34.

Figura 79: Efeito de concentrações crescentes de *pNP*-Glc sobre a atividade *pNP*-glucosidásica da Bglhi e das enzimas dos mutantes 4-12D, 5-7H, 5-7C e 1-6D na ausência (linhas e pontos pretos) ou em presença de concentrações fixas de glicose (linhas e pontos vermelhos) ou xilose (linhas e pontos azuis)

As atividades foram determinadas nas mesmas condições de temperatura e pH descritos na legenda da Figura 72 e diferentes concentrações de *pNP*-Glc. As concentrações fixas de glicose e xilose utilizadas estão indicadas entre parênteses na Tabela 34. Os experimentos foram repetidos três vezes utilizando três preparações distintas das enzimas puras. Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão dos ensaios realizados em duplicatas.

Tabela 34: Parâmetros cinéticos para estimulação da atividade pNP-glucosidásica da Bglhi e seus mutantes por pNP-Glc em ausência ou presença de concentrações fixas de glicose ou xilose

Enzima	[Monossacarídeo] (mmol L ⁻¹)	V _{max} (U mg ⁻¹)	K _{pNP-Glc} (mmol L ⁻¹)	k _{cat} /K _{pNP-Glc} (L mmol ⁻¹ s ⁻¹)	n _H
Bglhi	0	37,3 ± 1,8	0,22 ± 0,01	158,53 ± 15,89	1,2
	Glicose (50)	72,1 ± 2,9	0,50 ± 0,02	134,83 ± 11,57	1,4
	Xilose (100)	77,3 ± 3,9	0,54 ± 0,03	133,84 ± 15,17	1,4
4-12D	0	54,7 ± 3,8	0,15 ± 0,01	340,96 ± 49,64	1,1
	Glicose (50)	58,3 ± 2,9	0,50 ± 0,03	109,02 ± 12,80	1,1
	Xilose (80)	77,7 ± 4,7	0,38 ± 0,02	191,18 ± 23,13	1,2
5-7H	0	55,5 ± 3,3	0,28 ± 0,02	185,33 ± 25,94	1,2
	Glicose (100)	73,0 ± 5,1	0,95 ± 0,07	71,85 ± 11,03	1,4
	Xilose (200)	89,6 ± 6,3	0,52 ± 0,04	161,11 ± 25,37	1,3
5-7C	0	27,1 ± 1,3	0,16 ± 0,01	158,37 ± 18,71	1,1
	Glicose (30)	38,7 ± 2,3	0,31 ± 0,02	116,72 ± 15,47	1,1
	Xilose (80)	37,6 ± 2,2	0,40 ± 0,02	87,89 ± 10,20	1,1
1-6D	0	35,9 ± 2,9	0,10 ± 0,01	335,67 ± 64,90	1,3
	Glicose (30)	47,4 ± 3,8	0,22 ± 0,02	201,45 ± 36,86	1,3
	Xilose (80)	54,9 ± 3,8	0,32 ± 0,02	160,41 ± 22,60	1,1

As concentrações de glicose e xilose presentes no meio reacional (indicadas entre parênteses) são iguais a MC_{max}. Cada curva experimental foi repetida três vezes usando três preparações distintas da enzima pura e cada ensaio enzimático foi realizado em duplicata. Os parâmetros cinéticos são apresentados como a média ± desvio padrão para cada repetição (n=3).

As razões entre os valores de V_{max} determinados para cada uma das enzimas em presença de glicose ou xilose e aqueles obtidos na ausência dos monossacarídeos foram próximos aos valores de FS apresentados anteriormente na Tabela 33. Independentemente do mutante, a estimulação da atividade enzimática por pNP-Glc ocorreu com cooperatividade positiva, sugerindo mais de um sítio de ligação para o substrato na molécula de enzima. Além disso, a presença dos

monossacarídeos no meio reacional resultou em uma diminuição das afinidades aparentes para o substrato (Tabela 34), indicando que os monossacarídeos competem com o *p*NP-Glc pela ligação ao SC, mesmo em concentração na qual seu efeito estimulatório é máximo. Contudo, apesar destes aspectos comuns, os padrões de competição entre o substrato e os monossacarídeos foram diferentes para cada mutante, em consequência das diferentes substituições de aminoácidos.

Para as enzimas dos mutantes 5-7C e 1-6D houve um efeito mais pronunciado da xilose sobre os valores de $K_{pNP-Glc}$ quando comparado aos valores obtidos na presença de glicose: aumentos de 2,5 e 3,2 vezes nos valores de $K_{pNP-Glc}$ foram obtidos na presença de xilose e de 1,9 e 2,2 vezes na presença de glicose, respectivamente. Em contraste, para as enzimas dos mutantes 4-12D e 5-7H, o efeito da glicose sobre os valores de $K_{pNP-Glc}$ foram mais pronunciados quando comparados aos valores obtidos na presença de xilose. Por fim, glicose e xilose tiveram efeito variável, porém negativo, sobre as eficiências catalíticas para liberação de *p*NP⁻ a partir do *p*NP-Glc pelas enzimas estudadas (Tabela 34).

4.3.8.7 Determinação dos parâmetros cinéticos para estimulação da atividade celobiásica da Bglhi e das enzimas dos mutantes 4-12D, 5-7H, 5-7C e 1-6D

Os parâmetros cinéticos determinados para estimulação da atividade celobiásica da Bglhi e das enzimas produzidas pelos mutantes 4-12D, 5-7H, 5-7C e 1-6D com o aumento das concentrações de celobiose estão sumarizadas na Tabela 35. As correspondentes curvas cinéticas são mostradas na Figura 80. A atividade celobiásica de todas as enzimas estudadas foi estimulada por celobiose e apresentou cinética cooperativa, sugerindo a presença de múltiplos sítios de ligação para o substrato na molécula de enzima. Os valores de V_{max} determinados para as enzimas dos mutantes 4-12D, 5-7H, 5-7C e 1-6D foram cerca de 5,7, 2,5, 3,4 e 2,9 vezes menores que o determinado para Bglhi. Com relação às afinidades aparentes das

enzimas pelo substrato natural, os valores determinados para as enzimas dos mutantes 5-7C e 1-6D foram muito próximas e cerca de 1,6 vezes menores que o determinado para Bglhi. Por outro lado, as enzimas dos mutantes 4-12D e 5-7H apresentaram valores de $K_{\text{celobiose}}$ cerca de 4,2 e 5,7 vezes maiores, respectivamente.

Tabela 35: Parâmetros cinéticos para estimulação da atividade celobiásica da Bglhi e seus mutantes por celobiose

Enzima	V_{max} (U mg ⁻¹)	$K_{\text{celobiose}}$ (mmol L ⁻¹)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{celobiose}}$ (L mmol ⁻¹ s ⁻¹)	n_H
Bglhi	213,3 ± 6,4	0,53 ± 0,02	376,29 ± 19,67	1,4
4-12D	37,1 ± 3,3	2,23 ± 0,21	15,77 ± 3,05	1,2
5-7H	85,8 ± 4,3	3,01 ± 0,15	26,74 ± 2,85	1,1
5-7C	63,1 ± 3,8	0,34 ± 0,02	173,53 ± 22,09	1,6
1-6D	72,5 ± 3,3	0,32 ± 0,01	225,96 ± 17,39	2,0

As atividades foram determinadas a 45 °C (4-12D e 5-7H) ou 50 °C (Bglhi, 1-6D, 5-7C) em meio reacional constituído de tampão Bis-Tris 50 mmol L⁻¹, pH 6,0 (para Bglhi), ou tampão Mcllvaine, pH 5,0 (para 5-7C) ou 5,5 (1-6D) ou tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, pH 5,0 (para 5-7H) ou 5,5 (para 4-12D) e diferentes concentrações de celobiose. Cada curva experimental foi repetida três vezes usando três preparações distintas da enzima pura e cada ensaio enzimático foi realizado em duplicata. Os parâmetros cinéticos são apresentados como a média ± desvio padrão para cada repetição (n=3).

Figura 80: Estimulação da atividade β -glucosidásica da Bglhi e das enzimas dos mutantes 4-12D, 5-7H, 5-7C e 1-6D por celobiose

As atividades foram determinadas a 45 °C (4-12D e 5-7H) ou 50 °C (Bglhi, 1-6D, 5-7C) em meio reacional constituído de tampão Bis-Tris 50 mmol L^{-1} , pH 6,0 (para Bglhi), ou tampão Mcllvaine, pH 5,0 (para 5-7C) ou 5,5 (1-6D) ou tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1} , pH 5,0 (para 5-7H) ou 5,5 (para 4-12D) e diferentes concentrações de celobiose. Os experimentos foram repetidos três vezes utilizando três preparações distintas das enzimas puras. Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão dos ensaios realizados em duplicatas.

4.3.8.8 Estudo cinético da estimulação da atividade celobiásica da Bglhi e das enzimas dos mutantes 4-12D, 5-7H, 5-7C e 1-6D por xilose

O efeito de concentrações crescentes de xilose na faixa de 0-1000 mmol L⁻¹ sobre as atividades da Bglhi e seus mutantes, em presença de concentrações saturantes de celobiose para cada enzima, é mostrado na Figura 81. Para Bglhi, a xilose estimulou em 230% a liberação de glicose livre a partir da celobiose e o valor de MC_{max} correspondeu a 100 mmol L⁻¹. Acima desta concentração, entretanto, ocorreu uma diminuição do efeito estimulatório. Mesmo assim, cerca de 78% da atividade controle foi mantida em 1 mol L⁻¹ de xilose.

Por outro lado, um grande contraste foi observado para as enzimas dos mutantes em estudo. Os níveis de liberação de glicose livre não foram aumentados em presença de xilose, como observado para Bglhi. Apenas uma tolerância a esse monossacarídeo foi observada: as atividades das enzimas dos mutantes 4-12D, 5-7H, 5-7C e 1-6D se mantiveram praticamente inalterada até concentrações de xilose de 30, 300, 50 e 30 mmol L⁻¹, respectivamente (MT, indicadas por um asterisco vermelho na Figura 81). Acima desta concentração, entretanto, as atividades das enzimas dos mutantes 4-12D, 5-7C e 1-6D diminuíram rapidamente. Os valores de IC₅₀ foram estimados em 200, 270 e 170 mmol L⁻¹ de xilose, respectivamente, muito abaixo daqueles determinados utilizando-se pNP-Glc como substrato. Em contraste, a enzima do mutante 5-7H manteve 70% da atividade controle em presença de 1 mol L⁻¹ de xilose, não sendo possível determinar o valor de IC₅₀ para esta enzima.

A estimulação da atividade celobiásica de Bglhi com o aumento de concentrações de xilose na faixa estimulatória (0-MC_{max}) e em presença de concentração estimulatória de celobiose ocorreu com cooperatividade positiva ($n_H = 1,5$). Esse valor sugere a existência de múltiplos sítios de ligação para o monossacarídeo na molécula de enzima. O valor de K_{Xil} determinado para Bglhi foi de $19,3 \pm 0,87$ mmol L⁻¹, muito próximo daquele determinado utilizando-se o substrato sintético ($17,6 \pm 1,1$ mmol L⁻¹).

Figura 81: Efeito de concentrações crescentes de xilose sobre a atividade celobiásica da Bglhi e das enzimas dos mutantes 4-12D, 5-7H, 5-7C e 1-6D

As atividades foram determinadas nas mesmas condições de temperatura e pH descritos na legenda da Figura 80 e em concentrações saturantes de celobiose para cada enzima (5 mmol L⁻¹ para Bglhi; 70 mmol L⁻¹ para 5-7H; 10 mmol L⁻¹ para 4-12D; 2 mmol L⁻¹ para 5-7C e 1 mmol L⁻¹ para 1-6D). Os asteriscos vermelhos indicam os valores de MT. Os experimentos foram repetidos três vezes utilizando três preparações distintas das enzimas puras. Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão dos ensaios realizados em duplicatas.

O efeito do aumento de concentrações de celobiose sobre a atividade celobiásica da Bglhi e seus mutantes na presença de concentrações fixas de xilose correspondendo a MC_{max} (Bglhi) ou MT (4-12D, 5-7H, 5-7C e 1-6D) é mostrado na Figura 82. Os parâmetros cinéticos calculados com base nesses dados estão reunidos na Tabela 36. Independente da enzima, a estimulação da atividade enzimática por celobiose ocorreu com cooperatividade positiva, suportando a existência de dois ou mais sítios para ligação do substrato. Para Bglhi, o valor de V_{max} para liberação de glicose livre a partir da celobiose em presença de xilose aumentou cerca de 2,3 vezes quando comparado com aquele estimado na ausência deste monossacarídeo. Em contraste, os valores de V_{max} determinados para as enzimas dos mutantes em presença e ausência de xilose foram essencialmente inalterados. No entanto, independentemente das alterações em V_{max} , as afinidades aparentes de todas as enzimas para celobiose foram consideravelmente reduzidas na presença de xilose (Tabela 36), tal como observado para o *pNP-Glc*, sugerindo que a xilose compete com o substrato natural para ligação ao SC. Além disso, a presença de xilose drasticamente reduziu a eficiência catalítica para utilização da celobiose por todas as enzimas. As menores reduções (cerca de 40%) no valor $k_{cat}/K_{celobiose}$ foram observadas para Bglhi e 1-6D, enquanto que a maior foi observada para 5-7H (cerca de 70%).

Figura 82: Efeito de concentrações crescentes de celobiose sobre a atividade celobiásica da Bglhi e das enzimas dos mutantes 4-12D, 5-7H, 5-7C e 1-6D na ausência (linhas e pontos pretos) ou em presença de concentrações fixas de xilose (linhas e pontos azuis)

As atividades foram determinadas nas mesmas condições de temperatura e pH descritos na legenda da Figura 80 e diferentes concentrações de celobiose. As concentrações fixas de xilose utilizadas estão indicadas na Tabela 36. Os experimentos foram repetidos três vezes utilizando três preparações distintas das enzimas puras. Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão dos ensaios realizados em duplicatas.

Tabela 36: Parâmetros cinéticos para estimulação da atividade celobiásica da Bglhi e seus mutantes por celobiose em presença ou ausência de concentrações fixas de xilose

Enzima	[Xilose] (mmol L ⁻¹)	V _{max} (U mg ⁻¹)	K _{celobiose} (mmol L ⁻¹)	k _{cat} / K _{celobiose} (L mmol ⁻¹ s ⁻¹)	n _H
Bglhi	0	213,3 ± 6,4	0,53 ± 0,02	376,29 ± 19,67	1,4
	100	499,5 ± 15,1	1,76 ± 0,05	265,36 ± 16,64	1,5
4-12D	0	37,1 ± 3,3	2,23 ± 0,21	15,77 ± 3,05	1,2
	30	37,1 ± 3,4	5,44 ± 0,49	6,42 ± 1,24	1,1
5-7H	0	85,8 ± 4,3	3,01 ± 0,15	26,74 ± 2,85	1,1
	300	87,2 ± 4,4	10,12 ± 0,51	8,07 ± 0,87	1,1
5-7C	0	63,1 ± 3,8	0,34 ± 0,02	173,53 ± 22,09	1,6
	50	65,4 ± 4,6	0,85 ± 0,06	71,94 ± 10,84	1,6
1-6D	0	72,5 ± 3,3	0,32 ± 0,01	225,96 ± 17,39	2,0
	30	72,9 ± 2,9	0,52 ± 0,03	131,08 ± 13,66	1,5

As atividades foram determinadas nas mesmas condições de temperatura e pH descritos na legenda da Figura 80 e diferentes concentrações de celobiose. As concentrações de xilose presentes no meio reacional corresponderam a MC_{max} (Bglhi) ou MT (4-12D, 5-7H, 5-7C e 1-6D). Cada curva experimental foi repetida três vezes usando três preparações distintas da enzima pura e cada ensaio enzimático foi realizado em duplicata. Os parâmetros cinéticos são apresentados como a média ± desvio padrão para cada repetição (n=3).

4.3.8.9 Investigação da atividade de transglicosilação da Bglhi e das enzimas produzidas pelos mutantes 4-12D, 5-7H, 5-7C e 1-6D

4.3.8.9.1 Utilizando pNP-Glc como substrato

Os números de mols de pNP⁻ e de glicose liberados após 5 min de reação e as frações da Bglhi e seus mutantes que seguiram as rotas de hidrólise (%H) e

transglicosilação (%T) em condições saturantes de *p*NP-Glc e em ausência ou presença de xilose em concentrações MC_{max} estão apresentados na Tabela 37.

Na ausência de xilose, Bglhi e as enzimas dos mutantes 4-12D e 5-7H predominantemente seguiram a rota de hidrólise, como pode ser visto a partir das taxas similares de liberação de *p*NP⁻ e glicose. Além disso, os valores de %T corresponderam a apenas 14,5%, 0,5% e 2,0%, respectivamente. Na presença de xilose, esses valores aumentaram para 67,6%, 31,2% e 57,2%, respectivamente, indicando que a presença deste monossacarídeo aumentou significativamente as frações de intermediários glicosil-enzima que seguiram a rota de transglicosilação, resultando em maiores taxas de liberação de *p*NP⁻ comparadas as taxas de liberação de glicose. Em contraste, maiores valores de %T foram determinados para as enzimas dos mutantes 5-7C e 1-6D mesmo na ausência de xilose (65,3% e 51,2%, respectivamente), sugerindo que as mutações presentes nestas enzimas aumentaram a atividade de transglicosilação quando comparadas a Bglhi. Na presença de xilose observou-se um ligeiro aumento nas %T destas enzimas.

Tabela 37: Taxas de liberação de pNP^- e glicose e frações da Bglhi e seus mutantes que seguiram as rotas de hidrólise (%H) e transglicosilação (%T) em condições saturantes de pNP -Glc e em ausência ou presença de xilose em concentrações MC_{max}

Enzima	Ausência de xilose				Presença de xilose em concentração MC_{max}			
	pNP^- (nmol)	Glicose (nmol)	%H	%T	pNP^- (nmol)	Glicose (nmol)	%H	%T
Bglhi	12,9 ± 1,1	11,1 ± 1,2	85,5 ± 7,1	14,5 ± 7,1	24,9 ± 2,1	8,1 ± 0,7	32,4 ± 2,5	67,6 ± 2,5
4-12D	11,0 ± 0,9	10,9 ± 0,8	99,5 ± 8,5	0,5 ± 8,5	15,9 ± 1,1	10,9 ± 1,0	68,8 ± 5,4	31,2 ± 5,4
5-7H	8,6 ± 0,6	8,4 ± 0,4	98,0 ± 8,9	2,0 ± 8,9	12,9 ± 1,0	5,5 ± 0,2	42,8 ± 3,7	57,2 ± 3,7
5-7C	8,4 ± 0,5	2,9 ± 0,1	34,7 ± 2,2	65,3 ± 2,2	11,1 ± 0,9	1,8 ± 0,1	16,1 ± 1,1	83,9 ± 1,1
1-6D	10,2 ± 0,9	5,0 ± 0,1	48,8 ± 3,5	51,2 ± 3,5	14,5 ± 1,1	4,5 ± 0,2	31,0 ± 2,1	69,0 ± 2,1

Os ensaios enzimáticos foram repetidos seis vezes.

pNP^- e glicose são expressos como o total de nmols liberados após 5 min de reação.

As %H e %T são dados como a média ± desvio padrão dos valores calculados para cada ensaio (n= 6).

4.3.8.9.2 Utilizando celobiose como substrato

Os produtos formados pela ação da Bglhi e seus mutantes sobre a celobiose em ausência ou presença de xilose ou glicose na concentração MC_{max} (Bglhi) ou MT (4-12D, 5-7H, 5-7C e 1-6D) foram analisados por CCD (Figs. 83, 86 e 87).

Para Bglhi (Fig. 83), na ausência dos monossacarídeos, observou-se predominância de formação de glicose livre embora algumas manchas pouco intensas correspondendo a celotriose também possam ser vistas (Fig. 83, controle). Em contraste, quando a reação foi realizada na presença de 100 mmol L⁻¹ de xilose (Fig. 83, + X₁ e ampliação), os produtos de transglicosilação foram claramente observados. Além disso, esses produtos foram presumivelmente dissacarídeos (um deles correspondendo a soforose), ao invés da celotriose observada na ausência de xilose. Porém, após longos tempos de reação, a glicose foi o principal produto tanto na ausência (Fig. 83, controle, linha t₃) quanto na presença de xilose (Fig. 83, + X₁, linha t₃). Logo, Bglhi hidrolisa todos os produtos de transglicosilação por ela formados. Na presença de 100 mmol L⁻¹ de glicose no meio reacional, foram observados alguns produtos de transglicosilação (Fig. 83, + G₁). Porém, a alta viscosidade da amostra e a intensidade das manchas de glicose impediram a separação e visualização dos produtos.

Os produtos formados pela ação de Bglhi sobre celobiose na presença de xilose (Fig. 83, + X₁, linha t₃) também foram identificados por espectrometria de massas, empregando o método de inserção direta (Fig. 84). Os principais sinais esperados foram aqueles com m/z de 168 e 173, correspondendo a $[X_1 + NH_4]^+$ e $[X_1 + Na]^+$, respectivamente; 198 e 203, correspondendo a $[G_1 + NH_4]^+$ e $[G_1 + Na]^+$, respectivamente, e 365 correspondendo a $[G_2 + Na]^+$. Dois sinais despertaram atenção nesse espectro, os sinais com m/z 330 e 335, possivelmente sugerindo adutos formados por uma molécula de glicose e xilose, ou seja, $[GX + NH_4]^+$ e $[GX + Na]^+$, respectivamente. Para confirmar essa composição foram realizadas análises de MS/MS desses picos. A análise do pico de m/z 335 está mostrado no cromatograma da Figura 85 juntamente com a fragmentação proposta.

Figura 83: Análise temporal dos produtos de reação formados pela ação de Bglhi utilizando celobiose como substrato

As reações foram realizadas em concentrações saturantes de celobiose (5 mmol L⁻¹) em ausência (indicado como "controle") ou presença de 100 mmol L⁻¹ de glicose (indicado como "+ G₁") ou xilose (indicado como "+ X₁"). Os tempos de reação foram: 0 (linhas t₀), 5 min (linhas t₁), 10 min (linhas t₂) e 24 h (linhas t₃). Padrões: G₁, glicose; G₂, celobiose; G₃, celotriose; G₄, celotetraose; Ge, gentibiose; X₁, xilose; X₂, xilobiose; SG₂, mistura equimolar de sofrorose (S) e celobiose. Os volumes de cada alíquota aplicada nas placas de CCD foram ajustadas objetivando uma melhor visualização dos produtos.

Figura 84: Espectro ID-MS obtido da análise dos produtos formados pela ação de Bglhi sobre celobiose na presença de xilose

Figura 85: Espectro MS/MS obtido da fragmentação do pico com m/z 335 $[\text{GX} + \text{Na}]^+$ e proposta de fragmentação

De fato, o íon de m/z 335 correspondeu a um aduto de glicopiranosil-xilose (GX), porém não foi possível determinar a posição e o tipo de ligação entre os resíduos de glicose e xilose. Baseado nesses resultados e no padrão de migração dos padrões utilizados nas análises de CCD, nós assumimos a mancha na CCD para o composto GX (ver ampliação na Figura 83). Além disso, a análise por ID-MS permitiu assumir que não houve formação de trissacarídeos e tetrassacarídeos contendo unidades de xilose.

A análise por CCD dos produtos formados pela ação das β -glucosidases dos mutantes 4-12D e 5-7H utilizando celobiose como substrato são mostrados na Figura 86. Em ausência de glicose ou xilose (Fig. 86, controle), as enzimas destes mutantes predominantemente seguiram a rota de hidrólise, com baixos níveis de formação de G_3 . Além disso, a glicose foi claramente o principal produto de reação quando as reações foram realizadas na presença de xilose (Fig. 86, + X_1), embora algumas manchas correspondendo aos produtos de transglicosilação (dissacarídeos e G_3) foram observadas para ambos os mutantes. Para estes mutantes, em todas as condições analisadas, a glicose foi o único produto observado após longos tempo de reações (Fig. 86, linhas t_3).

As enzimas dos mutantes 5-7C e 1-6D também seguiram preferencialmente a rota de hidrólise na ausência de glicose e xilose e a glicose foi o único produto de reação observado (Fig. 87, controle). Na presença de xilose (Fig. 87, + X_1) observamos algumas manchas bem pouco intensas correspondendo aos produtos de transglicosilação (dissacarídeos). Igualmente ao descrito para Bglhi e para as enzimas dos mutantes 4-12D e 5-7H, após longos tempos de reações, a glicose foi essencialmente o único produto observado.

Figura 86: Análise temporal dos produtos de reação formados pela ação das β -glucosidases dos mutantes 4-12D e 5-7H utilizando celobiose como substrato

As reações foram realizadas em concentrações saturantes de celobiose (70 mmol L^{-1} para 5-7H e 10 mmol L^{-1} para 4-12D) em ausência (indicado como “controle”) ou presença de 30 mmol L^{-1} (para 4-12D) ou 300 mmol L^{-1} (para 5-7H) de glicose (indicado como “+ G₁”) ou xilose (indicado como “+ X₁”). Os tempos de reação foram: 0 (linhas t₀), 5 min (linhas t₁), 10 min (linhas t₂) e 24 h (linhas t₃). Padrões: G₁, glicose; G₂, celobiose; G₃, celotriose; G₄, celotetraose; Ge, gentibiose; X₁, xilose; X₂, xilobiose; SG₂, mistura equimolar de sofrorse (S) e celobiose. Os volumes de cada alíquota aplicada nas placas de CCD foram ajustadas objetivando uma melhor visualização dos produtos.

Figura 87: Análise temporal dos produtos de reação formados pela ação das β -glucosidases dos mutantes 5-7C e 1-6D utilizando celobiose como substrato

As reações foram realizadas em concentrações saturantes de celobiose (2 mmol L^{-1} para 5-7C e 1 mmol L^{-1} para 1-6D) em ausência (indicado como “controle”) ou presença de 50 mmol L^{-1} (para 5-7C) ou 30 mmol L^{-1} (para 1-6D) de glicose (indicado como “+ G₁”) ou xilose (indicado como “+ X₁”). Os tempos de reação foram: 0 (linhas t₀), 5 min (linhas t₁), 10 min (linhas t₂) e 24 h (linhas t₃). Padrões: G₁, glicose; G₂, celobiose; G₃, celotriose; G₄, celotetraose; Ge, gentibiose; X₁, xilose; X₂, xilobiose; SG₂, mistura equimolar de sofrorose (S) e celobiose. Os volumes de cada alíquota aplicada nas placas de CCD foram ajustadas objetivando uma melhor visualização dos produtos.

4.4 Discussão

A metodologia escolhida inicialmente nesse projeto de doutorado para o estudo dos determinantes estruturais da estimulação da β -glucosidase de *H. insolens* foi o embaralhamento de DNA (“DNA shuffling”), que envolveria o embaralhamento entre o gene que codifica para Bglhi (*bglhi*) e um gene com alta identidade com *bglhi*, mas que codificasse para uma β -glucosidase inibida por glicose. A seleção dos mutantes que expressassem enzimas estimuladas por glicose e/ou xilose e o sequenciamento dos respectivos genes permitiria identificar as sequências de bases que codificam para regiões envolvidas na estimulação da Bglhi pelos monossacarídeos. A fim de padronizar esta metodologia foi escolhido o gene *gh1-1* de *N. crassa*, um fungo disponível na coleção do laboratório e que tem o genoma completamente sequenciado (GALAGAN et al., 2003). O gene *gh1-1*, disponível em banco de genes do NCBI (GI= 85078541), apresenta 86% de identidade com *bglhi* e codifica para uma β -glucosidase da família GH1 que já havia sido incluída em vários estudos recentes de biologia de sistemas e engenharia metabólica (LIU, J. J. et al., 2016; BAE et al., 2014; KIM et al., 2014; LEE et al., 2013; ZHA et al., 2013; HA et al., 2011a,b; Li et al., 2010). Apesar disso, as características cinéticas desta enzima (GH1-1) não haviam sido estudadas até aquele momento, sendo suposto que, como a maioria das β -glucosidases conhecidas, seria inibida por glicose.

Após a clonagem e expressão de *gh1-1* em *E. coli*, GH1-1 foi expressa em forma solúvel e ativa e submetida a uma caracterização bioquímica preliminar à padronização das condições para o embaralhamento de DNA. Surpreendentemente, a atividade *p*NP-glucosidásica da GH1-1 mostrou-se altamente estimulada por glicose e xilose, o que impossibilitou o uso do gene *gh1-1* para a metodologia proposta. Entretanto, este resultado foi muito interessante, pois representou a primeira evidência de uma β -glucosidase estimulada por glicose em um fungo mesófilo. Além disso, este trabalho foi também a primeira evidência de que uma das β -glucosidases de *N. crassa*, um microrganismo modelo amplamente empregado para o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na degradação da parede celular vegetal (ZNAMEROSKI; GLASS, 2013; ZNAMEROSKI et al., 2012; TIAN et al., 2009), é estimulada por glicose.

Em função disso, foi realizada uma caracterização detalhada das suas propriedades bioquímicas e cinéticas, e os resultados foram publicados recentemente (MELEIRO et al., 2015, APÊNDICE B).

Como a estimulação da GH1-1 por glicose inviabilizou o uso do gene *gh1-1* para os experimentos de “DNA *shuffling*”, esta metodologia foi substituída pela técnica de epPCR, cujo os dados são apresentados nessa tese. Trata-se do primeiro estudo de mutagênese aleatória realizado com uma β -glucosidase estimulada por glicose pertencente à família 1 das GHs.

Segundo Wilson e Keefe (2001), após a escolha da região do DNA que será submetida à mutagênese aleatória, deve-se decidir o nível desejado de mutações mais adequado, conforme os objetivos pretendidos. Quando se visa à perda de uma função ou alterações da estabilidade térmica de uma enzima, aconselha-se uma baixa taxa de mutação (de 1 a 2 mutações por molde). Como nosso objetivo foi a busca por modificações que resultassem na perda da estimulação por glicose e xilose da Bglhi, optamos por padronizar as condições do epPCR a fim de se obter 1 ou 2 mutações por sequência.

O protocolo testado inicialmente, proposto por Cadwell e Joyce (1992), não funcionou. Aparentemente, alguma das alterações feitas no protocolo padrão de PCR, inibiu a reação. Segundo Wilson e Keefe (2001), quando nenhum produto é obtido na reação de epPCR, faz-se necessário otimizar as condições da reação: tempos maiores de extensão nos ciclos de PCR, reagentes utilizados, etc. A condição testada que resultou em uma média de mutações por molde de apenas duas foi a condição padrão de PCR com alterações na concentração de íons Mg^{2+} (7 mmol L^{-1}) e adição de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de íons Mn^{2+} . Outros autores também relataram anteriormente o uso de excesso de íons Mg^{2+} e Mn^{2+} para alterar a fidelidade da Taq polimerase (VASHISHTHA; KONIGSBERG; WANG, 2016; LING et al., 1991; ECKERT; KUNKEL, 1990; BECKMAN; MILDVAN; LOEB, 1985).

A condição de epPCR padronizada foi revalidada após a troca do plasmídeo de trabalho (substituição do pT7_*bglhi* para o pET28_*bglhi*). Além disso, as etapas de *screening* tanto em meio líquido como em meio sólido também foram padronizadas. Vale ressaltar que, geralmente, as proteínas produzidas em *E. coli* utilizando o sistema

pET-28a(+) com a expressão induzida por IPTG ficam retidas no citoplasma das células e estas precisam ser rompidas para que as proteínas solúveis sejam liberadas. Porém, no nosso caso, não foi necessária a ruptura celular, possivelmente devido ao longo período de crescimento e indução, propiciando que parte da enzima expressa fosse liberada para o meio de cultura como resultado da morte celular.

A biblioteca de diversidade gênica foi gerada e submetida a duas etapas de pressão seletiva. Na primeira delas, apenas as colônias que expressaram β -glucosidases com atividade catalítica detectável em meio sólido foram selecionadas. Nessa etapa, cerca de 90% das colônias foram descartadas. As 418 colônias restantes foram submetidas à segunda etapa da pressão seletiva que envolveu a seleção de enzimas com padrões de estimulação por glicose diferentes da enzima controle, Bglhi. Nessa etapa, 3 grupos distintos foram separados de acordo com o fator de estimulação por glicose. No primeiro grupo foram reunidos os clones que apresentaram fatores de estimulação menores que 1,3. No segundo, aqueles que apresentaram estimulação entre 1,3 - 2,0 e no terceiro aqueles com fatores maiores que 2,1. Nesta tese, são apresentados os dados sobre o primeiro grupo.

Um total de 9 mutantes pertencentes ao grupo 1 foram estudados e após caracterização preliminar (pH e temperatura ótimos, determinação da concentração saturante de substrato para cada enzima e efeito da glicose sobre a atividade *pNP*-glucosidásica) esse número foi reduzido para 4 (nomeados como 4-12D, 1-6D, 5-7C e 5-7H).

Os mecanismos moleculares da estimulação da atividade *pNP*-glucosidásica da β -glucosidase nativa de *H. insolens* por glicose e xilose já haviam sido investigados por muitos estudos biofísicos e cinéticos. Foi sugerido que a modulação da atividade da enzima pelos monossacarídeos resultaria de interações alostéricas entre os SC e SM (SOUZA et al., 2013). Bglhi, a forma recombinante da enzima expressa em *E. coli*, manteve a propriedade de estimulação por glicose e xilose (SOUZA et al., 2014), mas os mecanismos moleculares desta estimulação não haviam sido estudados até o momento. A análise cinética fina da estimulação, empregando o substrato *pNP*-Glc, foi realizada (item 4.3.8.5). Os dados sugeriram que o mecanismo de estimulação foi muito similar ao descrito para enzima nativa. A ligação da glicose ou xilose ao SM

estimula a atividade catalítica em aproximadamente 2 vezes (ver Figura 75), mas os monossacarídeos também se ligam ao SC, mesmo em concentrações estimulatórias, resultando em um aumento nos valores de $K_{pNP-Glc}$ em resposta ao aumento das concentrações fixas de glicose e xilose no meio reacional (ver Tabela 30). Igualmente, o substrato também se liga ao SM além de se ligar ao SC, como indicado pelo aumento nos valores de K_{Glc} e K_{Xil} na presença de concentrações fixas crescentes de $pNP-Glc$ (ver Tabela 31). Bglhi apresenta maior afinidade aparente para glicose do que para xilose em ambos os sítios (SC e SM) uma vez que a glicose desloca o substrato do SC em menores concentrações (ver Figura 74 e Tabela 30). Além disso, o efeito estimulatório da glicose e xilose não é sinérgico (ver as linhas retas em concentrações de 50 mmol L^{-1} de glicose ou xilose na Figura 77): os monossacarídeos competem pela ligação aos mesmos sítios na molécula de enzima, como indicado pelo aumento nos valores de K_{Glc} com o aumento de concentrações fixas de xilose e o aumento nos valores de K_{Xil} com o aumento de concentrações fixas de glicose (ver Tabela 32). À medida que a concentração de glicose ou xilose ultrapassa a concentração estimulatória máxima (saturação do SM) e entra na faixa estimulatória-inibitória, a diminuição da atividade específica pode ser atribuída a um aumento na competição dos monossacarídeos com o substrato pela ligação ao SC. A diminuição mais abrupta da atividade enzimática com o aumento da concentração de glicose quando comparada com a diminuição observada com o aumento da concentração de xilose pode ser explicada pela maior afinidade da enzima por glicose (Figura 74)

A análise estrutural da Bglhi (código PDB: 4MDO, DE GIUSEPPE et al., 2014) mostrou características típicas da família GH1, como a presença de três subsítios para monossacarídeos e/ou substratos glicosídicos (ver Figura 88 a seguir). A região de ligação da glicona (subsítio -1) e os resíduos catalíticos estão localizados no fundo de uma fenda profunda na molécula da enzima e são compostos pelos resíduos Q17, H120, W121, N165, E166 (resíduo catalítico ácido/base), Y308, E377 (nucleófilo), E434, W435 e F443. Todos estes resíduos são estruturalmente conservados entre as β -glucosidases bacterianas e fúngicas da família GH1, incluindo as β -glucosidases estimuladas por glicose descritas na literatura (ver alinhamento das sequências na Figura 89). Os resíduos do subsítio -1 definem a topologia do sítio de modo a otimizar as ligações de hidrogênio específicas entre as cadeias laterais polares e carregadas

dos resíduos de aminoácidos e os grupos hidroxila equatoriais dos monossacarídeos (e/ou substratos glicosídicos), além das interações hidrofóbicas de empilhamento entre o anel de piranose. Adjacentes ao subsítio -1 localizam-se os subsítios de ligação da aglicona (+1 e +2), menos conservados, que se caracterizam por um alargamento da fenda, originando uma antecâmara que se abre para a superfície da proteína. Os estudos anteriores de difração de raios-X indicaram a presença de uma molécula de glicose ligada nesta região (Fig. 88, DE GIUSEPPE et al., 2014).

Figura 88: Representação estrutural da BglI

(a) A estrutura está representada na forma de fitas e os *loops* ao redor do sítio ativo estão em azul. Uma molécula de glicerol ocupa o subsítio -1 e está representada na forma de esferas (verde: carbono; vermelho: oxigênio). (b) Entrada do sítio ativo destacando o portão de entrada (os átomos de carbono estão em azul claro), rede de água (esferas vermelhas) na antecâmara lateral e uma molécula de glicose (GLC, átomos de carbono em verde) ligada no sítio de ligação da aglicona. (c) Resíduos que formam o sítio da ligação da glicona (subsítio -1) onde uma molécula de glicerol (GOL) está ligada e os sítios de ligação da aglicona (subsítios +1 e +2) onde uma molécula de glicose é aprisionada por interações hidrofóbicas com W168, L173 e F348. A figura foi adaptada de De Giuseppe et al. (2014).

Figura 89: Alinhamento múltiplo entre as sequências da Bglhi e de outras β -glucosidases estimuladas por glicose

O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado com auxílio do Clustal Ômega (SIEVERS et al., 2011) e a figura gerada no ESPrpt 3.0 (ROBERT; GOUET, 2014). As caixas azuis indicam resíduos altamente conservados, as caixas vermelhas indicam resíduos idênticos e as setas vermelhas indicam os resíduos catalíticos. Número de acesso das sequências utilizadas: Bglhi (AII80277.1, SOUZA et al., 2014); GH1-1 (XP_011393758.1, MELEIRO et al., 2015); G1NkBG (BAB91145.1, UCHIMA et al., 2011); Ks5A7 (HV348683.1, UCHIYAMA et al., 2015); AS-Esc10 (AHG23303.1, BIVER et al., 2014); Bgl1A (ADD96762.1, FANG et al., 2010); MeBglD2 (BAV69317.1, MATSUZAWA; YAO, 2016a); r-BglNH (AFO59750.1, MAI et al., 2013); Unbgl1A (AFU63315.1, LU et al., 2013); Td2F2 (3WH5, UCHIYAMA et al., 2013); Bgl6 (AKH41028.1, CAO, L. C. et al., 2015b); BglA (ADA66698.1, AKRAM et al., 2016); TpBgl1 (ABQ46970.1, COTA et al., 2015); EaBgl1A (AFS69459.1, CRESPIR et al., 2016); BGL (AKP45355.1, YANG, F. et al., 2015).

Figura 89: Alinhamento múltiplo entre as sequências da Bglhi e de outras β -glucosidases estimuladas por glicose (continuação)

O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado com auxílio do Clustal Ômega (SIEVERS et al., 2011) e a figura gerada no ESPrpt 3.0 (ROBERT; GOUET, 2014). As caixas azuis indicam resíduos altamente conservados, as caixas vermelhas indicam resíduos idênticos e as setas vermelhas indicam os resíduos catalíticos. Número de acesso das sequências utilizadas: BgIhi (AII80277.1, SOUZA et al., 2014); GH1-1 (XP_011393758.1, MELEIRO et al., 2015); G1NkBG (BAB91145.1, UCHIMA et al., 2011); Ks5A7 (HV348683.1, UCHIYAMA et al., 2015); AS-Esc10 (AHG23303.1, BIVER et al., 2014); Bgl1A (ADD96762.1, FANG et al., 2010); MeBglID2 (BAV69317.1, MATSUZAWA; YAO, 2016a); r-BglINH (AFO59750.1, MAI et al., 2013); Unbgl1A (AFU63315.1, LU et al., 2013); Td2F2 (3WH5, UCHIYAMA et al., 2013); Bgl6 (AKH41028.1, CAO, L. C. et al., 2015b); *Bgl*A (ADA66698.1, AKRAM et al., 2016); TpBgl1 (ABQ46970.1, COTA et al., 2015); EaBgl1A (AFS69459.1, CRESPIM et al., 2016); BGL (AKP45355.1, YANG, F. et al., 2015).

Figura 89: Alinhamento múltiplo entre as sequências da Bglhi e de outras β -glucosidases estimuladas por glicose (conclusão)

O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado com auxílio do Clustal Ômega (SIEVERS et al., 2011) e a figura gerada no ESPrpt 3.0 (ROBERT; GOUET, 2014). As caixas azuis indicam resíduos altamente conservados, as caixas vermelhas indicam resíduos idênticos e as setas vermelhas indicam os resíduos catalíticos. Número de acesso das sequências utilizadas: Bglhi (AII80277.1, SOUZA et al., 2014); GH1-1 (XP_011393758.1, MELEIRO et al., 2015); G1NkB (BAB91145.1, UCHIMA et al., 2011); Ks5A7 (HV348683.1, UCHIYAMA et al., 2015); AS-Esc10 (AHG23303.1, BIVER et al., 2014); Bgl1A (ADD96762.1, FANG et al., 2010); MeBglD2 (BAV69317.1, MATSUZAWA; YAO, 2016a); r-BglNH (AFO59750.1, MAI et al., 2013); Unbgl1A (AFU63315.1, LU et al., 2013); Td2F2 (3WH5, UCHIYAMA et al., 2013); Bgl6 (AKH41028.1, CAO, L. C. et al., 2015b); BglA (ADA66698.1, AKRAM et al., 2016); TpBgl1 (ABQ46970.1, COTA et al., 2015); EaBgl1A (AFS69459.1, CRESPI et al., 2016); BGL (AKP45355.1, YANG, F. et al., 2015).

A caracterização cinética da Bglhi e das enzimas dos mutantes que apresentaram respostas alteradas em relação à estimulação por glicose e xilose, juntamente com os primeiros estudos de transglicosilação envolvendo esta enzima, utilizando tanto o substrato sintético como o substrato natural, ajudaram a contribuir ainda mais para elucidar os mecanismos moleculares da estimulação. A combinação da análise cinética e dos dados de transglicosilação com o conhecimento atual sobre a estrutura da Bglhi permitiu melhorar a compreensão sobre o fenômeno de estimulação e tolerância da enzima pelos monossacarídeos. Vale ressaltar que este foi o primeiro estudo sobre o mecanismo de estimulação da atividade celobiásica por glicose e xilose de uma β -glucosidase da família GH1.

Em boa concordância com os dados estruturais, a caracterização cinética da atividade celobiásica da Bglhi indicou a presença de múltiplos sítios de ligação para celobiose e xilose na molécula da enzima, sugerindo que a modulação da atividade enzimática poderia envolver interações alostéricas entre os sítios moduladores (sítios da aglicona) e o sítios de ligação do substrato (constituído pelo subsítios -1 e +1). Além disso, os dados indicaram uma clara evidência de competição entre a celobiose e a xilose pelos múltiplos sítios de ligação na molécula de enzima. Dessa forma, os mecanismos de modulação da atividade celobiásica da Bglhi por xilose parecem ser muito similares àqueles propostos utilizando *p*NP-Glc como substrato.

Uma visão ampliada dos mecanismos de estimulação das atividades *p*NP-glucosidásica e celobiásica da Bglhi derivaram dos estudos de transglicosilação utilizando xilose. Com *p*NP-Glc como substrato, em ausência de xilose, Bglhi preferencialmente seguiu a rota de hidrólise como mostrado pelas taxas similares de liberação de *p*NP⁻ (Fig. 6, etapa ①) e glicose (Fig. 6, etapa ②) (Tabela 37). Por outro lado, em presença de xilose em concentração MC_{max} , a rota de transglicosilação foi favorecida. No entanto, a estimulação da liberação de *p*NP⁻ não foi acompanhada de um aumento proporcional na taxa de liberação de glicose livre, inclusive essa liberação foi cerca de 30% menor comparada à liberação na ausência de xilose. Em concentrações altas de xilose, este monossacarídeo age no subsítio +1 como um aceptor da glicose covalentemente ligada no subsítio -1, favorecendo a reação de transglicosilação (Fig. 6, etapa ③) e aumentando a taxa de formação do intermediário

glicosil-enzima (Fig. 6, etapa ①) em resposta ao aumento do consumo deste intermediário na etapa de transglicosilação. Entretanto, não podemos descartar a possibilidade de modulações alostéricas das taxas dos passos ① e ② provenientes da ligação da xilose a outro subsítio da aglicona. É importante destacar ainda que, uma vez que a %T foi de 15% na ausência de xilose, o próprio substrato e/ou a glicose livre liberada do *p*NP-Glc também se ligam aos subsítios +1 (e +2, no caso do substrato) agindo como aceptores nas reações de transglicosilação.

Sendo assim, para Bglhi, sabemos que o *p*NP-Glc além de se ligar aos subsítios -1(glicona) e +1 (aglicona), também se liga aos subsítios +1/+2 da aglicona. A xilose (ou glicose) em concentrações até MC_{max} estimulou a liberação de *p*NP⁻ agindo como acceptor de glicose no subsítio +1 e/ou modulador alostérico nos outros subsítios da aglicona. Simultaneamente, o aumento nos valores de $K_{pNP-Glc}$ determinados na presença de glicose ou xilose em concentração MC_{max} confirmou que os monossacarídeos competem com o *p*NP-Glc pela ligação aos subsítios -1 da glicona e +1/+2 da aglicona (Tabela 34). Acima de MC_{max} , a diminuição gradual da atividade *p*NP-glucosidásica com o aumento das concentrações de glicose ou xilose foi consequência do aumento da competição dos monossacarídeos com o substrato pela ligação aos subsítios -1/+1. Em concentração MT, o efeito estimulatório da atividade *p*NP-glucosidásica por xilose ou glicose foi exatamente contrabalanceado pela redução da ligação do substrato à molécula de enzima. O menor valor de K_{Glc} determinado para Bglhi comparado com o valor de K_{Xil} , indicou ainda que a glicose se liga aos subsítios -1 da glicona e +1/+2 da aglicona com maior afinidade aparente que a xilose. Isto é consistente com o menor valor de MC_{max} determinado para a glicose comparado ao valor determinado para a xilose. Logo, a modulação fina da atividade *p*NP-glucosidásica da Bglhi por glicose e/ou xilose pode ser atribuída à competição do substrato e dos moduladores pela ligação aos subsítios -1 da glicona e +1/+2 da aglicona. Esta competição é regulada pelas afinidades aparentes destes subsítios pelas porções glicose e *p*-nitrofenol do substrato e pelos monossacarídeos livres.

Ainda para Bglhi, quando o substrato foi a celobiose, o principal produto de reação na ausência de xilose também foi a glicose livre (liberada das etapas ① e ②, Fig. 6), com baixos níveis de G_3 resultantes das reações de transglicosilação (Fig. 6,

etapa ③) na qual a celobiose agiu como aceptor de glicose (Fig. 83). Por outro lado, os produtos de transglicosilação (principalmente dissacarídeos) foram abundantes na presença de xilose em concentração MC_{max} , indicando estimulação da rota de transglicosilação. Esta estimulação da rota de transglicosilação, por sua vez, resultou num aumento das taxas das etapas anteriores (Fig. 6, etapa ①) e eventualmente da etapa de hidrólise (Fig. 6, etapa ②), resultando num aumento líquido da taxa de liberação de glicose livre (Fig. 81). Logo, quando o substrato foi celobiose, a xilose agiu tanto como aceptor de glicose (para formação dos produtos de transglicosilação) quanto como efetor alostérico, estimulando a etapa ① (e eventualmente a etapa ②) e contribuindo para o aumento líquido na taxa de glicose livre. A formação de GX como produto de transglicosilação claramente indicou que a xilose estimulou a atividade de transglicosilação por ligação ao subsítio +1 da aglicona. Este é o primeiro relato de formação de GX por β -glucosidases, embora outros autores tenham produzido este dissacarídeo utilizando fosforilases (CHOMVONG et al., 2014; PUTMAN; LITT; HASSID, 1955; KITAOKA; TANIGUCHI; SASAKI, 1990). Podemos supor ainda, com base nos dados anteriores do nosso grupo de pesquisa sobre a especificidade de substratos da Bglhi (SOUZA et al., 2014), que GX apresenta uma ligação glicosídica do tipo β , uma vez que ao final da reação só foi possível observar manchas com padrão de migração similar a glicose e xilose, dando indícios de que esse produto da reação foi utilizado com substrato para enzima (Fig. 83). A formação de soforose como produto de transglicosilação já havia sido proposta por De Giuseppe e colaboradores (2014), mas só agora foi confirmada. Segundo os autores, a análise da estrutura cristalina contendo glicose no subsítio +2 da aglicona, sugere que ao entrar no canal que conduz ao sítio ativo os grupos hidroxila da glicose nas posições 2 e 3 estão orientados de forma a permitir esse tipo de ligação por meio de uma reação de transglicosilação. Os produtos esperados seriam a soforose (contendo a ligação glicosídica do tipo β -1,2) ou laminaribiose (contendo a ligação glicosídica do tipo β -1,3). A possibilidade de formação de laminaribiose não foi avaliada neste trabalho devido à dificuldade de obtenção do padrão. A formação de soforose e laminaribiose por reações de transglicosilação também foi relatada para as β -glucosidases Td2f2 (UCHIYAMA et al., 2013) e MeBglD2 (MATSUZAWA; YAI, 2016a) estimuladas por glicose, obtidas de bibliotecas metagenômicas.

Sendo assim, conforme proposto para o *p*NP-Glc, sabemos que a celobiose se liga aos subsítios -1/+1 mas também aos subsítios +1/+2 da Bglhi. A xilose até concentração MC_{max} estimulou as taxas de liberação de glicose agindo como acceptor no subsítio +1 da aglicona e como modulador alostérico nos outros subsítios da aglicona. Simultaneamente, o aumento nos valores de $K_{celobiose}$ determinados na presença de xilose em concentração MC_{max} confirmou que a xilose compete com a celobiose pela ligação aos subsítios -1 da glicona e +1/+2 da aglicona (Tabela 36). A diminuição gradual da atividade celobiásica acima da concentração MC_{max} pode ser atribuída a um aumento na competição da xilose com o substrato pelo subsítio -1/+1. Em concentração MT, o efeito estimulatório da atividade celobiásica por xilose foi compensado pela ligação menos efetiva do substrato à enzima. Assim, novamente como proposto para o *p*NP-Glc, a modulação fina da atividade celobiásica da Bglhi por xilose é derivada da competição entre celobiose e xilose pela ligação aos subsítios -1 (glicona) e +1/+2 (aglicona) que depende das afinidades relativas destes subsítios pelos monossacarídeos livres e celobiose.

Com este estudo pudemos observar que vários mecanismos atuam simultaneamente na estimulação da atividade da Bglhi por glicose e xilose, incluindo interações alostéricas, competição entre substrato e monossacarídeos pela ligação a diferentes sítios na molécula de enzima e estimulação da atividade de transglicosilação. Embora estes mecanismos modulatórios tenham sido propostos separadamente (MATSUZAWA et al., 2016b; UCHIYAMA et al., 2015; SOUZA et al., 2013; UCHIYAMA et al., 2013) ou juntos (YANG, Y. et al., 2015) para explicar a estimulação da atividade *p*NP-glucosidásica de diferentes β -glucosidases da família GH1, este é o primeiro estudo dos mecanismos de estimulação da atividade celobiásica.

Além da estimulação, a alta tolerância da Bglhi por glicose e xilose é uma propriedade altamente interessante, tanto do ponto de vista acadêmico quanto do ponto de vista aplicado. Em nível estrutural, a elevada tolerância à glicose/xilose da Bglhi foi atribuída ao acesso restrito destes monossacarídeos aos subsítios -1 (glicona) e +1(aglicona) devido a um estreitamento do subsítio +2 da aglicona provocado pelas cadeias laterais dos resíduos W168 e L173, como pode ser

observado na Figura 88 (SANTOS, C. A. et al., 2016; DE GIUSEPPE et al., 2014). Para compreender melhor este aspecto, comparamos a topologia dos subsítios +1/+2 da aglicona da Bglhi com outras β -glucosidases da família GH1 de *Paenibacillus polymyxa* (BglB, PDB 2O9P, ISORNA et al., 2007), *T. reesei* (TrBgl2, PDB 3AHY, JENG et al., 2011), *Trichoderma harzianum* (ThBgl, PDB 5BWF, SANTOS, C. A. et al., 2016), de uma amostra metagenômica (Td2F2, PDB 3WH5, MATSUZAWA et al., 2016b) e de *N. koshunensis* (Nkbgl, PDB 3VIJ, JENG et al., 2012). Os resíduos W168 e L173 da Bglhi são conservados na Td2F2, tolerante à glicose (ver alinhamento na Figura 90), e a comparação da topologia da superfície da proteína nesta região revela que também se observa o estreitamento do subsítio + 2 da aglicona. Em contraste, as estruturas BglB, Nkbgl, TrBgl2 e ThBgl apresentam uma fenda mais larga nesta região, e todas as quatro enzimas são inibidas por baixas concentrações de glicose. Os resíduos L167 e P172 da TrBgl2 são estruturalmente análogos a W168 e L173 da Bglhi e o mutante duplo L167W / P172L foi construído por mutação sítio-dirigida de TrBgl2. Esta construção resultou em uma enzima tolerante e estimulada por glicose (GUO; AMANO; NOZAKI, 2016). Em vez de uma simples oclusão, isto pode indicar que a afinidade da glicose pelos subsítios + 1/+ 2 da aglicona pode ser importante e está de acordo com uma proposta recente de tolerância à glicose das β -glucosidases da família GH1 (YANG, Y. et al., 2015).

substrato sintético (AKRAM et al., 2016; GUO; AMANO; NOZAKI, 2016; MATSUZAWA; YAO, 2016a,b; CAO, L. C. et al., 2015b; COTA et al., 2015; UCHIYAMA et al., 2015; YANG, F. et al., 2015; LI et al., 2014; RAJASREE et al., 2013; ZHAO et al., 2013; UCHIMA et al., 2011; FANG et al., 2010).

As duas mutações simples (D237V e N235S) identificadas nos mutantes de Bglhi que apresentaram padrões de estimulação por glicose e/ou xilose alterados estão localizados a uma distância de cerca de 7 angstroms um do outro e na região do sítio ativo que define a antecâmara contendo os subsítios +1 e +2 da aglicona. Evidentemente, essas mutações exerceram os efeitos mais pronunciados no comportamento cinético das enzimas expressas por esses mutantes, já que as enzimas expressas pelos mutantes que continham mutações periféricas adicionais (4-12D e 5-7C) apresentaram propriedades cinéticas semelhantes às enzimas dos mutantes contendo a mutação única (5-7H e 1-6D, respectivamente). De maneira bastante interessante, essas mutações afetaram diretamente o equilíbrio entre as taxas das reações de transglicosilação e hidrólise, para ambos os substratos (*p*NP-Glc e celobiose), indicando que a topologia e as propriedades da superfície da região da antecâmara que constitui os sítios de ligação da aglicona (+1 e +2) são muito importantes para determinar as frações das enzimas que seguem cada rota de reação. Entretanto, para todas as enzimas expressas pelos mutantes e independentemente da mutação, efeitos alostéricos, competição entre substrato e monossacarídeos pela ligação aos diferentes subsítios na molécula de enzima e estimulação da atividade de transglicosilação parecem estar envolvidos na modulação das atividades *p*NP-glucosidásica e celobiásica por glicose e xilose.

Com relação à mutação na posição 237, observamos que o grupo carboxila do resíduo D237 da Bglhi é exposto na superfície da antecâmara e a cadeia lateral deste resíduo forma ligações de hidrogênio com 3 moléculas de água localizadas no lúmen da antecâmara. Nas enzimas dos mutantes 5-7H e 4-12D, que apresentam a mutação D237V, as capacidades de formação das ligações de hidrogênio da cadeia lateral foram perdidas e a hidrofobicidade das superfícies das antecâmaras aumentadas devido à presença de dois grupos metila (Fig. 91). Além disso, a cadeia lateral menor presente no resíduo de valina é bem posicionada para fazer contatos hidrofóbicos com

o grupo metila da cadeia lateral do resíduo T309 e a cadeia lateral indol presente no resíduo W349. A hidrofobicidade alterada desta região pode resultar em reorientação e distanciamento do sacarídeo que se liga ao subsítio +1 resultando em um aumento do acesso da água e potencialmente favorecendo as reações de hidrólise em detrimento às reações de transglicosilação. De fato, quando o substrato foi *p*NP-Glc, as enzimas dos mutantes 5-7H e 4-12D seguiram exclusivamente a rota de hidrólise na ausência de xilose (Tabela 37).

Figura 91: Representação estrutural dos aminoácidos aspartato e valina

As cadeias laterais estão sombreadas na cor rosa.

O fato dos valores de $V_{\max}$ determinados para as enzimas dos mutantes 5-7H e 4-12D serem maiores que aquele determinado para Bglhi (Tabela 34) é consistente com o acesso melhorado da água no sítio ativo dessas enzimas, mas também pode refletir uma estabilização do estado de transição do primeiro passo do mecanismo de reação (Fig. 6, etapa ①) devido à uma interação mais forte da porção *p*NP⁻ no subsítio +1 da aglicona. A presença de xilose na concentração $MC_{\max}$ substancialmente aumentou os valores de %T para essas enzimas e a estimulação da transglicosilação aparentemente ocorreu por meio de mecanismos similares àqueles propostos para Bglhi, resultando em aumento das atividades *p*NP-glucosidásicas para ambos os mutantes.

Os maiores valores de K_{Xil} , K_{Glc} e MC_{max} determinados para a enzima do mutante 5-7H (Tabela 33), comparados aos valores determinados para Bglhi, são consistentes com a redução da afinidade de ligação da xilose ou glicose no subsítio +1 da aglicona. Por outro lado, os menores valores de MT determinados para ambos os monossacarídeos refletem uma maior afinidade aparente no subsítio -1 da glicona. Além disso, a maior afinidade aparente da enzima para glicose comparado à xilose e os maiores valores de $K_{pNP-Glc}$ determinados na presença de glicose em concentração MC_{max} refletem também a maior afinidade aparente da enzima por glicose no subsítio -1 da glicona, comparada a afinidade por xilose. Juntos, estes dados sugerem que a mutação D237V da enzima do mutante 5-7H teve um efeito mais prejudicial na afinidade do subsítio +1 da aglicona por glicose do que por xilose. Este efeito foi ainda mais evidente na enzima do mutante 4-12D, uma vez que a atividade *pNP*-glucosidásica desta enzima não foi estimulada por glicose mas aumentou 1,4 vezes com xilose. No entanto, a glicose competiu eficientemente com o substrato pela ligação ao subsítio -1 da glicona, como mostrado pelo aumento no valor de $K_{pNP-Glc}$ (determinado na presença de glicose) e a forte inibição da atividade enzimática em concentrações de glicose acima de 50 mmol L⁻¹.

Em conjunto, os dados obtidos para as enzimas dos mutantes 4-12D e 5-7H corroboram com a hipótese de que as afinidades das β -glucosidases da família GH1 por xilose (ou glicose) e pelos substratos nos subsítios de ligação da glicona e aglicona são importantes determinantes da tolerância aos monossacarídeos.

Quando o substrato foi celobiose, em ausência de xilose, as reações de hidrólise também foram favorecidas para as enzimas dos mutantes 4-12D e 5-7H, como observado para as reações utilizando *pNP*-Glc como substrato (na ausência de xilose). A possível explicação está novamente no aumento do acesso da água ao sítio ativo e a diminuição da afinidade do subsítio +1 da aglicona pelo resíduo de glicose não-redutor da celobiose. Em grande contraste com os dados obtidos utilizando-se o substrato sintético, os valores de V_{max} determinados para atividade celobiásica de ambos os mutantes foram muito menores que aqueles determinados para Bglhi. Possivelmente, houve um aumento na energia de ativação do passo ① do mecanismo de reação (Fig. 6) associado a uma menor complementaridade da molécula de glicose

no subsítio +1 hidrofóbico da aglicona no estado de transição. Ambos os mutantes também mostraram afinidades aparentes para celobiose significativamente mais baixas que aquela determinada para Bglhi (Tabela 36), possivelmente refletindo a redução das afinidades para celobiose no subsítio +1 da aglicona destas enzimas.

A atividade celobiásica da enzima do mutante 4-12D não foi estimulada por xilose e os produtos de transglicosilação foram formados em baixos níveis, provavelmente como resultado da baixa afinidade pela xilose no subsítio +1 hidrofóbico deste mutante e a maior afinidade aparente por este monossacarídeo no subsítio -1, concordando com o baixo valor de MT. Em contraste, embora a atividade celobiásica da enzima do mutante 5-7H não tenha sido estimulada por xilose, alguns produtos de transglicosilação (principalmente dissacarídeos) foram formados em baixos níveis na presença de xilose em concentração MT. Conforme observado para a enzima do mutante 4-12D, a xilose compete fortemente com o substrato pela ligação aos subsítios -1/+1, como pode ser observado pelos maiores valores de $K_{celobiose}$ determinados na presença de xilose em concentração MT. Entretanto, na enzima do mutante 5-7H o monossacarídeo aparentemente se liga ao subsítio +1 da aglicona com afinidade consideravelmente maior comparada a enzima do mutante 4-12D e com menor afinidade ao subsítio -1 da glicona, como pode ser visto pelo valor de MT cerca de 10 vezes maior.

As enzimas dos mutantes 1-6D e 5-7C apresentam a mutação N235S em comum. Em Bglhi, o átomo de nitrogênio da cadeia lateral do resíduo N235 é localizado na superfície da antecâmara. Na estrutura tridimensional da BglB de *P. polymyxa* (BglB, PDB 2Z1S, ISORNA et al., 2007) complexada com celotetraose, o resíduo N223 é estruturalmente análogo ao N235 da Bglhi. O átomo de nitrogênio da cadeia lateral do N223 da BglB é ligado por ligações de hidrogênio ao oxigênio do carbono 6 do grupo glicosídico ligado ao subsítio +1 da aglicona (Fig. 92).

Figura 92: Interações entre a celotetraose e os aminoácidos do sítio ativo de BglB de *P. polymyxa*

Somente os resíduos envolvidos em ligações de hidrogênio com o ligante são mostrados. A figura foi adaptada de Isorna et al., 2007.

Logo, a mutação N235S (Fig. 93) pode resultar tanto na perda do potencial de ligação de hidrogênio com grupos glicosídicos no subsítio +1 da aglicona como numa redução do volume da cadeia lateral, facilitando assim o acesso ao subsítio -1 da glicona.

Figura 93: Representação estrutural dos aminoácidos asparagina e serina

As cadeias laterais estão sombreadas na cor rosa.

A cadeia lateral do resíduo N235 da Bglhi também forma contatos com o resíduo E166 que atua como resíduo ácido/base durante o ciclo catalítico. A ruptura desta ligação decorrente da mutação N235S pode então contribuir para a mudança observada no perfil de pH ótimo das enzimas dos mutantes 1-6D e 5-7C (Fig. 71).

Com *p*NP-Glc como substrato e na ausência de xilose, cerca de 50-65% das enzimas dos mutantes 1-6D e 5-7C seguiram a rota de transglicosilação indicando que a mutação N235S reduziu a preferência para rota de hidrólise observada para Bglhi. Embora a redução nos valores de $K_{pNP-Glc}$ observado para estas enzimas (Tabela 34) possa refletir numa maior afinidade para o substrato no subsítio -1 da aglicona, o aumento nas %T podem indicar maior afinidade nos subsítios +1/+2 da aglicona. Os valores similares de V_{max} determinados para atividade *p*NP-glucosidásica das enzimas dos mutantes 1-6D e 5-7C e para Bglhi indicam ainda que a taxa de liberação de *p*NP⁻ não foi alterada, em contraste com o aumento da taxa de transglicosilação e diminuição da taxa de liberação de glicose. Em presença de xilose, as %T determinadas para ambos os mutantes foram ligeiramente aumentadas e a liberação de *p*NP⁻ foi aparentemente estimulada através de um mecanismo semelhante ao proposto para Bglhi. Os valores menores de K_{Xil} , K_{Glc} , MC_{max} e MT determinados para estas enzimas (Tabela 33), em comparação com Bglhi, são consistentes com a ligação dos monossacáridos nos subsítios -1 da glicona e + 1/+2 da aglicona com afinidades mais elevadas, como confirmado pelo aumento nos valores de $K_{pNP-Glc}$ determinados na presença de xilose ou glicose na concentração MC_{max} .

Em contraste, quando o substrato foi celobiose, os produtos de transglicosilação não foram formados em níveis apreciáveis pelas enzimas dos mutantes 1-6D e 5-7C em ausência de xilose (Fig. 87). Esses dados sugerem que a mutação N234S não alterou as afinidades das enzimas pela ligação do substrato natural nos subsítios +1/+2 da aglicona. Os valores menores de $K_{celobiose}$ determinados para ambos os mutantes, comparados ao valor determinado para Bglhi, são consistentes com afinidades maiores das enzimas pelo substrato nos subsítios -1 da glicona e +1 da aglicona, como sugerido pela análise estrutural.

A atividade celobiásica das enzimas dos mutantes 1-6D e 5-7C também não foi estimulada por xilose e baixos níveis de produtos de transglicosilação foram formados na presença de xilose em concentração MT, sugerindo a baixa afinidade dos monossacarídeos pelo subsítio +1 da aglicona nessas enzimas. Os valores menores de MT determinados para estas enzimas, comparados ao valor determinado para Bglhi, refletem a maior afinidade aparente da xilose no subsítio -1 da glicona.

Em conjunto, os dados cinéticos obtidos para as enzimas 1-6D e 5-7C sugerem que a mutação N235S afetou tanto o subsítio -1 da aglicona como o subsítio +2 da aglicona, mas outros estudos dedicados à compreensão dos mecanismos de modulação das atividades destas enzimas por glicose e xilose são necessários.

Estudos futuros de simulação molecular da Bglhi e das enzimas dos mutantes na presença dos substratos e dos monossacarídeos poderiam contribuir ainda mais para o entendimento da modulação das atividades *p*NP-glucosidásica e celobiásica destas enzimas por glicose e xilose. Além disso, estudos sobre a cinética de transglicosilação bem como a quantificação e identificação de todos os produtos formados poderiam enriquecer ainda mais este tipo de trabalho.

4.5 Conclusões

- ✓ A biblioteca de diversidade gênica foi gerada empregando a técnica de epPCR e padronizada para obtenção de 2 a 3 mutações por sequência.
- ✓ Duas técnicas de screening, uma em meio-sólido e outra em meio líquido, foram padronizadas com sucesso.
- ✓ O rastreamento de 4435 clones permitiu a seleção de mutantes que expressaram β -glucosidases com percentuais de estimulação da atividade *p*NP-glucosidásica por glicose diferente do controle (Bglhi).
- ✓ Os mutantes classificados no grupo 1 (com fator de estimulação menores que 1,3) foram submetidos a uma caracterização mais criteriosa (pH e temperatura ótimos, determinação da concentração saturante de substrato e efeito da glicose sobre a atividade). Após caracterização, 4 mutantes foram selecionados para continuação do trabalho (4-12D, 5-7H, 5-7C e 1-6D).
- ✓ A análise cinética fina da Bglhi permitiu concluir que o mecanismo de estimulação da atividade *p*NP-glucosidásica da enzima pelos monossacarídeos foi muito similar ao descrito para enzima nativa.
- ✓ A combinação dos dados cinéticos, estruturais e de transglicosilação da Bglhi ampliaram o entendimento sobre os mecanismos de estimulação das atividades celobiásica e *p*NP-glucosidásica por glicose e/ou xilose. Vários mecanismos atuam simultaneamente na estimulação da atividade da Bglhi por glicose e xilose, incluindo interações alostéricas, competição entre substrato e monossacarídeos pela ligação a diferentes sítios na molécula de enzima e estimulação da atividade de transglicosilação.
- ✓ As afinidades da Bglhi por glicose e xilose nos subsítios +1 e +2 da aglicona, e não uma simples oclusão do sítio ativo, parecem estar relacionados com a tolerância da enzima pelos monossacarídeos.

- ✓ Os resultados obtidos com os as enzimas dos mutantes 4-12D, 5-7H, 1-6D e 5-7C permitiram concluir que a estimulação da atividade *p*NP-glucosidásica por glicose e/ou xilose nem sempre está relacionada com a estimulação da atividade celobiásica por esses monossacarídeos.
- ✓ As mutações presentes na região do sítio ativo da Bglhi que define a antecâmara contendo os subsítios +1 e +2 da aglicona afetaram o equilíbrio entre as taxas das reações de transglicosilação e hidrólise, para ambos os substratos analisados (*p*NP-Glc e celobiose).

REFERÊNCIAS

AKCAPINAR, G. B.; BENTURINI, A.; MARTELLI, P. L.; CASADIO, R.; SEZERMAN, U. O. Modulating the thermostability of endoglucanase I from *Trichoderma reesei* using computational approaches. **Protein Eng. Des. Sel.**, 28, 127-135, 2015.

AKRAM, F.; HAQ, I.; KHAN, M. A.; HUSSAIN, Z.; MUKHTAR, H.; IQBAL, K. Cloning with kinetic and thermodynamic insight of a novel hyperthermostable β -glucosidase from *Thermotoga naphthophila* RKU-10T with excellent glucose tolerance. **J. Mol. Catal. B-Enzym.**, 124, 92–104, 2016.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, 25, 3389–3402, 1997.

ARNOLD, F. H.; GEORGIU, G. **Directed Evolution Library Creation: Methods and Protocols**. 1st Ed., Humana Press, 2003, Totowa, New Jersey.

ARNOLD, F. H. Design by directed evolution. **Accounts Chem. Res.**, 31, 125-131, 1998.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiol. Rev.**, 29, 719-739, 2005.

ARRIZUBIETA, M. J.; POLAINA, J. Increased thermal resistance and modification of the catalytic properties of a beta-glucosidase by random mutagenesis and in vitro recombination. **J. Biol. Chem.**, 275, 28843-28848, 2000.

BAE, Y. H.; KANG, K. H.; JIN, Y. S.; SEO, J. H. Molecular cloning and expression of fungal cellobiose transporters and β -glucosidases conferring efficient cellobiose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biotechnol.**, 169, 34–41, 2014.

BAFFI, M. A.; MARTIN, N.; TOBAL, T. M.; FERRAREZI, A. L.; LAGO, J. H. G.; BOSCOLO, M.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Purification and characterization of an ethanol-tolerant β -glucosidase from *Sporidiobolus pararoseus* and its potential for hydrolysis of wine aroma precursors. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 171, 1681–1691, 2013.

BALBAS, P. Understanding the art of producing protein and nonprotein molecules in *Escherichia coli*. **Mol. Biotechnol.**, 19, 251-267, 2001.

BANERJEE, G.; CAR, S.; SCOTT-CRAIG, J. S.; BORRUSCH, M. S.; WALTON, J. D. Rapid optimization of enzyme mixtures for deconstruction of diverse pretreatment/biomass feedstock combinations. **Biotechnol. Biofuels**, 3, 22, 2010.

BATRA, J.; MISHRA, S. Organic solvent tolerance and thermostability of a beta-glucosidase co-engineered by random mutagenesis. **J. Mol. Catal. B-Enzym.**, 96, 61-66, 2013.

BCC Research (2014) In Report BIO030H - Global Markets for Enzymes in Industrial Applications. Disponível em: < <http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-bio030h.html>>. Acesso em: 10/12/2015.

BCC Research (2015) In Report EGY099B - Global Markets and Technologies for Biofuel Enzymes. Disponível em: < <http://www.bccresearch.com/market-research/energy-and-resources/biofuels-enzymes-global-markets-technologies-report-egy099b.html>>. Acesso em: 01/12/2016.

BECKMAN, R. A.; MILDVAN, A. S.; LOEB, L. A. On the fidelity of DNA replication: manganese mutagenesis in vitro. **Biochemistry**, 24, 5810-5817, 1985.

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

BELANCIC, A.; GUNATA, Z.; VALLIER, M. J.; AGOSIN, E. Beta-glucosidase from the grape native yeast *Debaryomyces vanriijiae*: purification, characterization, and its effect on monoterpene content of a Muscat grape juice. **J. Agric. Food Chem.**, 51, 1453-1459, 2003.

BENOLIEL, B.; POCAS-FONSECA, M. J.; TORRES, F. A.; DE MORAES, L. M. Expression of a glucose-tolerant beta-glucosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 160, 2036-2044, 2010.

BERGMEYER, H. U.; BERNT, E. In: **Methods of enzymatic analysis** (Bergmeyer, H.U. ed.), Verlag/Academic Press. New York, 3, 1205-1215, 1974.

BERRIN, J. G.; WILLIAMSON, G.; PUIGSERVER, A.; CHAIX, J. C.; MCLAUCHLAN, W. R.; JUGE, N. High-level production of recombinant fungal endo-beta-1,4-xylanase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Protein. Expr. Purif.**, 19, 179-187, 2000.

BEY, M.; ZHOU, S.; POIDEVIN, L.; HENRISSAT, B.; COUTINHO, P. M.; BERRIN, J. G.; SIGOILLOT, J. C. Cello-oligosaccharide oxidation reveals differences

between two lytic polysaccharide monooxygenases (family gh61) from *Podospira anserina*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 79, 488–496, 2013.

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

BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial beta-glucosidases: cloning, properties, and applications. Microbial beta-glucosidases: cloning, properties, and applications. **Crit. Rev. Biotechnol.**, 22, 375-407, 2002.

BIVER, S.; STROOBANTS, A.; PORTETELLE, D.; VANDENBOL, M. Two promising alkaline β -glucosidases isolated by functional metagenomics from agricultural soil, including one showing high tolerance towards harsh detergents, oxidants and glucose. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, 41, 479–488, 2014.

BOTTCHER, D.; BORNSCHEUER, U.T. Protein engineering of microbial enzymes. **Curr. Opin. Microbiol.**, 13, 274-282, 2010.

BROADWAY, N. Recombinant protein expression: Vector-host systems. **Matter Methods**, 2, 123, 2012.

BROWN, R. J.; MILLER, G. C.; GRIFFON, N.; LONG, C. J.; RADER, D. J. Glycosylation of endothelial lipase at asparagine-116 reduces activity and the hydrolysis of native lipoproteins in vitro and in vivo. **J. Lipid Res.**, 48, 1132-1139, 2007.

BUBNER, P.; PLANCK, H.; NIDETZKY, B. Visualizing cellulase activity. **Biotechnol. Bioeng.**, 110, 1529-1549, 2013.

BUSTAMANTE FILHO, I. C. **Clonagem, expressão e purificação de proteínas do plasma seminal bovino relacionadas à alta congelabilidade do sêmen**. 2010. 114 f. Tese (Doutorado em Zootecnia – Produção Animal) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

CADWELL, R. C.; JOYCE, G. F. Randomization of genes by PCR mutagenesis. **PCR Methods Appl.**, 2, 28-33, 1992.

CAIRNS, J. R. K.; ESEN, A. β -glucosidases. **Cell. Mol. Life Sci.**, 67, 3389-3405, 2010.

CAMERON, R. G.; MANTHEY, J. A.; BAKER, R. A.; GROHMANN, K. Purification and characterization of a beta-glucosidase from *Citrus sinensis* var. *valencia* fruit tissue. **J. Agric. Food Chem.**, 49, 4457-4462, 2001.

CANTAREL, B. L.; COUTINHO, P. M.; RANCUREL, C.; BERNARD, T.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. **Nucleic Acids Res.**, 37, D233–D238, 2009

CAO, L. C.; CHEN, R.; XIE, W.; LIU, Y. H. Enhancing the thermostability of feruloyl esterase estf27 by directed evolution and the underlying structural basis. **J. Agric. Food Chem.**, 63, 8225–8233, 2015a.

CAO, L. C.; WANG, Z. J.; REN, G. H.; KONG, W.; LI, L.; XIE, W.; LIU, Y. H. Engineering a novel glucose-tolerant β -glucosidase as supplementation to enhance the hydrolysis of sugarcane bagasse at high glucose concentration. **Biotechnol. Biofuels.**, 8, 202, 2015b.

CAO, Y.; QIAO, J.; LI, Y.; LU, W. De novo synthesis, constitutive expression of *Aspergillus sulphureus* beta-xylanase gene in *Pichia pastoris* and partial enzymic characterization. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 76, 579-585, 2007.

CARDONA, C. A.; SÁNCHEZ, Ó. J. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. **Bioresour. Technol.**, 98, 2415-2457, 2007.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiol. Rev.**, 24, 45-66, 2000.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. **Curr. Opin. Biotechnol.**, 10, 422-427, 1999.

CERQUEIRA, N.; BRÁS, N.; RAMOS, M. J.; FERNANDES, P. A. Glycosidases – A Mechanistic Overview, Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology, Prof. Chuan-Fa Chang (Ed.), ISBN: 978-953-51-0864-1, InTech, 2012. Disponível em <<http://www.intechopen.com/books/carbohydrates-comprehensive-studies-on-glycobiology-and-glycotechnology/glycosidases-a-mechanistic-overview>>. Acesso em 05/06/2016.

CHAMOLI, S.; KUMAR, P.; NAVANI, N. K.; VERMA, A. K. Secretory expression, characterization and docking study of glucose-tolerant β -glucosidase from *B. subtilis*. **Int. J. Biol. Macromol.**, 85, 425–433, 2016.

CHANDRA, M.; KALRA, A.; SANGWAN, N. S.; GAURAV, S. S.; DAROKAR, M. P.; SANGWAN, R. S. Development of a mutant of *Trichoderma citrinoviride* for enhanced production of cellulases. **Bioresour. Technol.**, 100, 1659-1662, 2009.

CHEN, L.; LI, N.; ZONG, M. H. A glucose-tolerant β -glucosidase from *Prunus domestica* seeds: Purification and characterization. **Process Biochem.**, 47, 127–132, 2012.

CHEN, P.; FU, X.; NG, T. B.; YE, X. Y. Expression of a secretory beta-glucosidase from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris* and its characterization. **Biotechnol. Lett.**, 33, 2475-2479, 2011.

CHENG, Q.; GAO, H.; HU, N. A trehalase from *Zunongwangia* sp.: characterization and improving catalytic efficiency by directed evolution. **BMC Biotechnol.**, 16, 9, 2016.

CHENG, Y. S.; CHEN, C. C.; HUANG, J. W.; KO, T. P.; HUANG, Z.; GUO, R. T. Improving the catalytic performance of a GH11 xylanase by rational protein engineering. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 99, 9503-9510, 2015.

CHOMVONG, K.; KORDIC, V.; LI, X.; BAUER, S.; GILLESPIE, A. E.; Ha, S. J.; Oh, E. J.; Galazka, J. M.; Jin, Y. S.; Cate, J. H. D. Overcoming inefficient cellobiose fermentation by cellobiose phosphorylase in the presence of xylose. **Biotechnol. Biofuels**, 7, 85, 2014.

CHOKHAWALA, H. A.; ROCHE, C. M.; KIM, T. W.; ATREYA, M. E.; VEGESNA, N.; DANA, C. M.; BLANCH, H. W.; CLARK, D. S. Mutagenesis of *Trichoderma reesei* endoglucanase I: impact of expression host on activity and stability at elevated temperatures. **BMC Biotechnol.**, 15, 11, 2015.

CHU, Q.; LI, X.; MA, B.; XU, Y.; OUYANG, J.; ZHU, J.; YU, S.; YONG, Q. Bioethanol production: an integrated process of low substrate loading hydrolysis-high sugars liquid fermentation and solid state fermentation of enzymatic hydrolysis residue. **Bioresour. Technol.**, 123, 699-702, 2012.

CLARE, J. J.; RAYMENT, F. B.; BALLANTINE, S. P.; SREEKRISHNA, K.; ROMANOS, M. A. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. **Biotechnology**, 9, 455-460, 1991.

COLABARDINI, A. C.; RIES, L. N. A.; BROWN, N. A.; REIS, T. F.; SAVOLDI, M.; GOLDMAN, M. H. S.; MENINO, J. F.; RODRIGUES, F.; GOLDMAN, G. H. Functional characterization of a xylose transporter in *Aspergillus nidulans*. **Biotechnol. Biofuels**, 7, 46, 2014.

COONEY, D. G.; EMERSON, R. Thermophilic Fungi. **WH Freeman Publ.**, San Francisco USA, p.188, 1964.

CORRÊA, T. L.; SANTOS, L. V.; PEREIRA, G. A. G. AA9 and AA10: from enigmatic to essential enzymes. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 100, 9–16 2016.

COTA, J.; CORRÊA, T. L.; DAMÁSIO, A. R.; DIOGO, J. A.; HOFFMAM, Z. B.; GARCIA, W.; OLIVEIRA, L. C.; PRADE, R. A.; SQUINA, F. M. Comparative analysis

of three hyperthermophilic GH1 and GH3 family members with industrial potential. **N Biotechnol.**, 32, 13-20, 2015.

CRAMERI, A.; RAILLARD, S. A.; BERMUDEZ, E.; STEMMER, W. P. DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. **Nature**, 391, 288-291, 1998.

CREGG, J. M.; MADDEN, K. R.; BARRINGER, K. J.; THILL, G. P.; STILLMAN, C. A. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. **Mol. Cell. Biol.**, 9, 1316-1323, 1989.

CRESPIM, E.; ZANPHORLIN, L. M.; DE SOUZA F. H.; DIOGO, J. A.; GAZOLLA, A. C.; MACHADO, C. B.; FIGUEIREDO, F.; SOUSA, A. S.; NÓBREGA, F.; PELLIZARI, V. H.; MURAKAMI, M. T.; RULLER, R. A novel cold-adapted and glucose-tolerant GH1 β -glucosidase from *Exiguobacterium antarcticum* B7. **Int. J. Biol. Macromol.**, 82, 375–380, 2016.

DALY, R.; HEARN, M. T. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **J. Mol. Recognit.**, 18, 119-138, 2005.

DAS, A.; PAUL, T.; GHOSH, P.; HALDER, S. K.; MOHAPATRA, P. K. D.; PATI, B. R.; MONDAL, K. C. Kinetic Study of a Glucose Tolerant β -Glucosidase from *Aspergillus fumigatus* ABK9 Entrapped into Alginate Beads. **Waste Biomass Valor.**, 6, 53–61, 2015.

DAVIES, G.; HENRISSAT, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure**, 3, 853–859, 1995.

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

DE GIUSEPPE, P. O.; SOUZA, T. A.; SOUZA, F. H.; ZANPHORLIN, L. M.; MACHADO, C. B.; WARD, R. J.; JORGE, J. A.; FURRIEL, R. P.; MURAKAMI, M. T. Structural basis for glucose tolerance in GH1 β -glucosidases. **Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.**, 70, 1631-1639, 2014.

DECKER, C. H.; VISSER, J.; SCHREIER, P. β -Glucosidase multiplicity from *Aspergillus tubingensis* CBS 643.92: purification and characterization of four β -glucosidases and their differentiation with respect to substrate specificity, glucose inhibition and acid tolerance. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 55, 157-163, 2001.

DELANO, W. L. **The PyMOL Molecular Graphics System**, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC, 2002.

DELL, A.; GALADARI, A.; SASTRE, F.; HITCHEN, P. Similarities and differences in the glycosylation mechanisms in prokaryotes and eukaryotes. **Int. J. Microbiol.**, 2010, 148178-148192, 2010.

DENG, P.; LI, D.; CAO, Y.; LU, W.; WANG, C. Cloning of a gene encoding an acidophilic endo- β -1,4-xylanase obtained from *Aspergillus niger* CGMCC1067 and constitutive expression in *Pichia pastoris*. **Enzyme Microb. Technol.**, 39, 1096-1102, 2006.

DIMAROGONA, M.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. Cellulose degradation by oxidative enzymes. **Comput. Struct. Biotechnol. J.**, 2, 1-8, 2012.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, 28, 350–6, 1956.

ECKERT, K. A.; KUNKEL, T. A. High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Nucleic Acids Res.**, 18, 3739-3744, 1990.

EGLI, T.; DIJKEN, J. P.; VEENHUIS, M.; HARDER, W.; FIECHTER, A. Methanol metabolism in yeasts: Regulation of the synthesis of catabolic enzymes. **Arch. Microbiol.**, 124, 115-121, 1980.

ESWAR, N.; WEBB, B.; MARTI-RENO, M. A.; MADHUSUDHAN, M.; ERAMIAN, D.; SHEN, M.-Y.; PIEPER, U.; SALI, A. Comparative protein structure modeling using MODELLER. **Curr. Protoc. Protein. Sci.**, 50:2.9:2.9.1–2.9.31, 2007.

FANG, Z.; FANG, W.; LIU, J.; HONG, Y.; PENG, H.; ZHANG, X.; SUN, B.; XIAO, Y. Cloning and characterization of a beta-glucosidase from marine microbial metagenome with excellent glucose tolerance. **J. Microbiol. Biotechnol.**, 20, 1351-1358, 2010.

FARRELL, A. E.; PLEVIN, R. J.; TURNER, B. T.; JONES, A. D.; O'HARE, M.; KAMMEN, D. M. Ethanol can contribute to energy and environmental goals. **Science**, 311, 506-508, 2006.

FERNANDEZ-FUEYO, E.; RUIZ-DUEÑAS, F.; MIKI, Y.; MARTÍNEZ, M.; HAMMEL, K.; MARTÍNEZ, A. Lignin-degrading peroxidases from the genome of the selective ligninolytic fungus *Ceriporiopsis subvermispota*. **J. Biol. Chem.**, 287, 16903–16916, 2012.

FONTANA, J. D.; GEBARA, M.; BLUMEL, M.; SCHNEIDER, H.; MACKENZIE, C. R.; JOHNSON, K. G. α -4-O-methyl-D-glucuronidase component of xylanolytic complexes. **Methods Enzymol.**, 160, 560-571, 1988.

FRANDSEN, K. E.; SIMMONS, T. J.; DUPREE, P.; POULSEN, J. C.; HEMSWORTH, G. R.; CIANO, L.; JOHNSTON, E. M.; TOVBORG, M.; JOHANSEN, K. S.; VON FREIESLEBEN, P.; MARMUSE, L.; FORT, S.; COTTAZ, S.; DRIGUEZ, H.; HENRISSAT, B.; LENFANT, N.; TUNA, F.; BALDANSUREN, A.; DAVIES, G. J.; LO LEGGIO, L.; WALTON, P. H. The molecular basis of polysaccharide cleavage by lytic polysaccharide monooxygenases. **Nat. Chem. Biol.**, 12, 298–303, 2016.

FRUTUOSO, M. A.; MARANA, S. R. A single amino acid residue determines the ratio of hydrolysis to transglycosylation catalyzed by β -glucosidases. **Protein Pept. Lett.**, 20, 102-106, 2013.

GALAGAN, J. E.; CALVO, S. E.; BORKOVICH, K. A.; SELKER, E. U.; READ, N. D.; JAFFE, D.; FITZHUGH, W.; MA, L. J.; SMIRNOV, S.; PURCELL, S.; REHMAN, B.; ELKINS, T.; ENGELS, R.; WANG, S.; NIELSEN, C. B.; BUTLER, J.; ENDRIZZI, M.; QUI, D.; IANIEKIEV, P.; BEEL-PEDERSEN, D.; NELSON, M. A.; WERNER-WASHBURNE, M.; SELITRENNIKOFF, C. P.; KINSEY, J. A.; BRAUN, E. L.; ZELTER, A.; SCHULTE, U.; KOTHE, G. O.; JEDD, G.; MEWES, W.; STABEN, C.; MARCOTTE, E.; GREENBERG, D.; ROY, A.; FOLEY, K.; NAYLOR, J.; STANGE-THOMANN, N.; BARRETT, R.; GNERRE, S.; KAMAL, M.; KAMVYSSELIS, M.; MAUCELI, E.; BIELKE, C.; RUDD, S.; FRISHMAN, D.; KRYSTOFOVA, S.; RASMUSSEN, C.; METZENBERG, R. L.; PERKINS, D. D.; KROKEN, S.; COGONI, C.; MACINO, G.; CATCHESIDE, D.; LI, W.; PRATT, R. J.; OSMANI, S. A.; DESOUSA, C. P.; GLASS, L.; ORBACH, M. J.; BERGLUND, J. A.; VOELKER, R.; YARDEN, O.; PLAMANN, M.; SEILER, S.; DUNLAP, J.; RADFORD, A.; ARAMAYO, R.; NATVIG, D. O.; ALEX, L. A.; MANNHAUPT, G.; EBBOLE, D. J.; FREITAG, M.; PAULSEN, I.; SACHS, M. S.; LANDER, E. S.; NUSBAUM, C.; BIRREN, B. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Nature**, 422, 859-868, 2003.

GAO, G.; WANG, A.; GONG, B. L.; LI, Q. Q.; LIU, Y. H.; HE, Z. M.; LI, G. A novel metagenome-derived gene cluster from termite hindgut: Encoding phosphotransferase system components and high glucose tolerant glucosidase. **Enzyme Microb. Technol.**, 84, 24–31, 2016.

GAO, D.; UPPUGUNDLA, N.; CHUNDAWAT, S.; YU, X.; HERMANSON, S.; GOWDA, K.; BRUMM, P.; MEAD, D.; BALAN, V.; DALE, B. Hemicellulases and auxiliary enzymes for improved conversion of lignocellulosic biomass to monosaccharides. **Biotechnol. Biofuels**, 4, 5, 2011.

GELLISSEN, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 54, 741-750, 2000.

GERARDI, C.; BLANDO, F.; SANTINO, A.; ZACHEO, G. Purification and characterisation of a beta-glucosidase abundantly expressed in ripe sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit. **Plant Sci.**, 160, 795-805, 2001.

GIESE, E. C.; PIEROZZI, M.; DUSSÁN, K. J.; CHANDEL, A. K.; DA SILVA, S. S. Enzymatic saccharification of acid-alkali pretreated sugarcane bagasse using commercial enzyme preparations. **J. Chem. Technol. Biot.**, 88, 1266-1272, 2013.

GONZALEZ-BLASCO, G.; SANZ-APARICIO, J.; GONZALEZ, B.; HERMOSO, J. A.; POLAINA, J. Directed evolution of beta-glucosidase A from *Paenibacillus polymyxa* to thermal resistance. **J. Biol. Chem.**, 275, 13708-13712, 2000.

GUEGUEN, Y.; CHEMARDIN, P.; ARNAUD, A.; GALZY, P. Purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from *Botrytis cinerea*. **Enzyme Microbial Technol.**, 17, 900-906, 1995.

GÜNATTA, Z.; VALLIER, M. J. Production of a highly glucose-tolerant extracellular β -glucosidase by three *Aspergillus* strains. **Biotechnol. Lett.**, 21, 219–223, 1999.

GUO, B.; AMANO, Y.; NOZAKI, K. Improvements in glucose sensitivity and stability of trichoderma reesei β glucosidase using sitedirected mutagenesis. **PLoS ONE**, 11, e0147301, 2016.

GUPTA, V. K.; KUBICEK, C. P.; BERRIN, J. G.; WILSON, D. W.; COUTURIER, M.; BERLIN, A.; FILHO, E. X.; EZEJI, T. Fungal enzymes for bio-products from sustainable and waste biomass. **Trends Biochem. Sci.**, 41, 633-645, 2016.

GUSAKOV, A.V.; SALANOVICH, T.N.; ANTONOV, A.I.; USTINOV, B.B.; OKUNEV, O.N.; BURLINGAME, R.; EMALFARB, M.; BAEZ, M.; SINITSYN, A.P. Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnol. Bioeng.**, 97, 1028-1038, 2007.

HA S. J.; GALAZKA, J. M.; KIM, S. R.; CHOI, J. H.; YANG, X.; SEO, J. H.; GLASS, N. L.; CATE, J. H. D.; JIN, Y. S. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 108, 504–509, 2011a.

HA S. J.; WEI, Q.; KIM, S. R.; GALAZKA, J. M.; CATE, J. H. D.; JIN, Y. S. Cofermentation of cellobiose and galactose by an engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Appl. Environ. Microbiol.**, 77, 5822–5825, 2011b.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.**, 41, 95-98, 1999.

HARDIMAN, E.; GIBBS, M.; REEVES, R.; BERGQUIST, P. Directed evolution of a thermophilic beta-glucosidase for cellulosic bioethanol production. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 161, 301-312, 2010.

HARNPICHARNCHAI, P.; CHAMPREDA, V.; SORNLAKE, W.; EURWILAICHITR, L. A thermotolerant beta-glucosidase isolated from an endophytic fungi, *Periconia* sp., with a possible use for biomass conversion to sugars. **Protein Expr. Purif.**, 67, 61-69, 2009.

HARRIS, D.; DEBOLT, S. Synthesis, regulation and utilization of lignocellulosic biomass. **Plant Biotechnol. J.**, 8, 244-262, 2010.

HAYASHI, K.; YING, L.; SINGH, S.; KANEKO, S.; NIRASAWA, S.; SHIMONISHI, T.; KAWATA, Y.; IMOTO, T.; KITAOKA, M. Improving enzyme characteristics by gene shuffling; application to β -glucosidase. **J. Mol. Catal. B-Enzym.**, 11, 811-816, 2001.

HAYS, W. S.; VANDERJAGT, D. J.; BOSE, B.; SERIANNI, A. S.; GLEW, R. H. Catalytic mechanism and specificity for hydrolysis and transglycosylation reactions of cytosolic beta-glucosidase from guinea pig liver. **J. Biol. Chem.**, 273, 34941-34948, 1998.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. **Biochem. J.**, 316, 695-696, 1996.

HODGSON, J. The changing bulk biocatalyst market. **Biotechnology**, 12, 789-790, 1994.

HOH, Y.; YEOH, H.-H.; TAN, T. Properties of β -glucosidase purified from *Aspergillus niger* mutants USDB 0827 and USDB 0828. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 37, 590-593, 1992.

HONG, J.; TAMAKI, H.; KUMAGAI, H. Cloning and functional expression of thermostable β -glucosidase gene from *Thermoascus aurantiacus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 73, 1331-1339, 2007.

HORN, S. J.; VAAJE-KOLSTAD, G.; WESTERENG, B.; EIJSINK, V. G. H. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnol. Biofuels**, 5, 45, 2012.

HUANG, Y.; BUSK, P. K.; GRELL, M. N.; ZHAO, H.; LANGE, L. Identification of a β -glucosidase from the *Mucor circinelloides* genome by peptide pattern recognition. **Enzyme Microb. Technol.**, 67, 47-52, 2014.

IQBAL, H. M. N.; KYAZZE, G.; KESHAVARZ, T. Advances in the valorization of lignocellulosic materials by Biotechnology: An Overview. **Bioresources**, 8, 3157-3176, 2013.

ISHIHARA, H.; AIMI, T.; TAKAHASHI, K.; KITAMOTO, Y. Heterologous expression and characterization of the endocellulase encoding gene cel3A from the basidiomycete *Polyporus arcularius*. **Mycoscience**, 46, 154–161, 2005.

ISORNA, P.; POLAINA, J.; LATORRE-GARCÍA, L.; CAÑADA, F. J.; GONZÁLEZ, B.; SANZ-APARICIO, J. Crystal structures of *Paenibacillus polymyxa* β -glucosidase B complexes reveal the molecular basis of substrate specificity and give new insights in to the catalytic machinery of family 1 glycosidases. **J. Mol. Biol.**, 371,1204–1218, 2007.

ITAKURA, K.; HIROSE, T.; CREA, R.; RIGGS, A. D.; HEYNEKER, H. L.; BOLIVAR, F.; BOYER, H. W. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. **Science**, 198, 1056-1063, 1977.

JABBOUR, D.; KLIPPEL, B.; ANTRANIKIAN, G. A novel thermostable and glucose-tolerant β -glucosidase from *Fervidobacterium islandicum*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 93, 1947-1956, 2012.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Directed evolution of enantioselective enzymes for organic chemistry. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, 4, 68-73, 2000.

JÄGER, S.; BRUMBAUER, A.; FEHÉR, E.; RÉCZEY, K.; KISS, L. Production and characterization of β -glucosidases from different *Aspergillus* strains. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 17, 455-461, 2001.

JANA, S.; DEB, J. K. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 67, 289-298, 2005.

JENG, W. Y.; WANG, N. C.; LIN, C. T.; CHANG, W. J.; LIU, C. I.; WANG, A. H. J. High-resolution structures of *Neotermes koshunensis* beta-glucosidase mutants provide insights into the catalytic mechanism and the synthesis of glucoconjugates. **Acta Crystallogr. D**, 68,829–838, 2012.

JENG, W. Y.; WANG, N. C.; LIN, M. H.; LIN, C. T.; LIAW, Y. C.; CHANG, W. J.; LIU, C. I.; LIANG, P. H.; WANG, A. H. Structural and functional analysis of three beta-glucosidases from bacterium *Clostridium cellulovorans*, fungus *Trichoderma reesei* and termite *Neotermes koshunensis*. **J. Struct. Biol.**, 173, 46-56, 2011.

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

JEON, T.; MICHENER, W.; HIMMEL, M. E.; DECKER, S. R.; ADNEY, W. S. Implications of cellobiohydrolase glycosylation for use in biomass conversion. **Biotechnol. Biofuels.**, 1, 10, 2008.

JI, H. W.; CHA, C. J. Identification and functional analysis of a gene encoding beta-glucosidase from the brown-rot basidiomycete *Fomitopsis palustris*. **J. Microbiol.**, 48, 808-813, 2010.

JIANG H.; ZHANG S.; GAO H.; HU N. Characterization of a cold-active esterase from *Serratia* sp and improvement of thermostability by directed evolution. **BMC Biotechnol.**, 16, 7, 2016.

JOHANNES, T. W.; ZHAO, H. Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways. **Curr. Opin. Microbiol.**, 9, 261-267, 2006.

JUNG, E.; WILLIAMS, K. L. The production of recombinant glycoproteins with special reference to simple eukaryotes including *Dictyostelium discoideum*. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, 25, 3-8, 1997.

KARA, H. E.; TURAN, Y.; ER, A.; ACAR, M.; TÜMAY, S.; SINAN, S. Purification and characterization of β -glucosidase from greater wax moth *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, 86, 209-219, 2014.

KARBOUNE, S.; GERAERT, P. A.; KERMASHA, S. Characterization of selected cellulolytic activities of multi-enzymatic complex system from *Penicillium funiculosum*. **J. Agric. Food Chem.**, 56, 903-909, 2008.

KATAYEVA, I. A.; GOLOVCHENKO, N. P.; CHUVILSKAYA, N. A.; AKIMENKO, V. K. *Clostridium thermocellum* β -glucosidases A and B: Purification, properties, localization, and regulation of biosynthesis. **Enzyme Microb. Technol.**, 14, 407-412, 1992.

KAWAI, R.; YOSHIDA, M.; TANI, T.; IGARASHI, K.; OHIRA, T.; NAGASAWA, H.; SAMEJIMA, M. Production and characterization of recombinant *Phanerochaete chrysosporium* beta-glucosidase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 67, 1-7, 2003.

KENNES, D.; ABUBACKAR, H. N.; DIAZ, M.; VEIGA, M. C.; KENNES, C. Bioethanol production from biomass: carbohydrate vs syngas fermentation. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, 91, 304-317, 2016.

KIM, H.; LEE, W. H.; GALAZKA, J. M.; CATE, J. H. D.; JIN, Y. S. Analysis of cellobiose transporters from *Neurospora crassa* in *Saccharomyces cerevisiae* for cellobiose fermentation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 98, 1087-1094, 2014.

KIM, J. S.; RAINES, R. T. Bovine seminal ribonuclease produced from a synthetic gene. **J. Biol. Chem.**, 268, 17392-17396, 1993.

KITAOKA, M.; TANIGUCHI, H.; SASAKI, T. Production of glucosyl-xylose using *Cellvibrio gilvus* cells and its properties. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 34, 178-182, 1990.

KORI, L. D.; HOFMANN, A.; PATEL, B. K. Expression, purification and preliminary crystallographic analysis of the recombinant beta-glucosidase (BglA) from the halothermophile *Halothermothrix orenii*. **Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.**, 67, 111-113, 2011.

KOSHLAND, D. E. Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. **Biol. Rev.**, 28, 416-436, 1953.

KROGH, K. B.; HARRIS, P. V.; OLSEN, C. L.; JOHANSEN, K. S.; HOJER-PEDERSEN, J.; BORJESSON, J.; OLSSON, L. Characterization and kinetic analysis of a thermostable GH3 beta-glucosidase from *Penicillium brasilianum*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 86, 143-154, 2010.

KUCHNER, O.; ARNOLD, F. H. Directed evolution of enzyme catalysts. **Trends Biotechnol.**, 15, 523-530, 1997.

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

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.

LARUE, K.; MELGAR, M.; MARTIN, V. J. J. Directed evolution of a fungal beta-glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Biofuels**, 9, 52, 2016.

LE, Y.; CHEN, H.; ZAGURSKY, R.; WU, J. H.; SHAO, W. Thermostable DNA ligase-mediated PCR production of circular plasmid (PPCP) and its application in directed evolution via in situ error-prone PCR. **DNA Res.**, 20, 375-382, 2013.

LEE W. H.; NAN H.; KIM H. J.; JIN Y. S. Simultaneous saccharification and fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae* without supplementing extracellular β -glucosidase. **J. Biotechnol.**, 167, 316-322, 2013.

LEE, C. C.; WONG, D. W.; ROBERTSON, G. H. Cloning and characterization of the xyn11A gene from *Lentinula edodes*. **Protein J.**, 24, 21-26, 2005.

LEFEBVRE, J.; BOILEAU, G.; MANJUNATH, P. Recombinant expression and affinity purification of a novel epididymal human sperm-binding protein, BSPH1. **Mol. Hum. Reprod.**, 15, 105-114, 2009.

LEITE, R. S. R.; ALVES-PRADO, H. F.; CABRAL, H.; PAGNOCCA, F. C.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* and *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme Microb. Technol.**, 43, 391-395, 2008.

LEONE, F. A.; BARANAUSKAS, J. A.; FURRIEL, R. P. M.; BORIN, I. A. SigrafW: an easy-to-use program for fitting enzyme kinetic data. **Biochem. Mol. Biol. Educ.**, 33, 399-403, 2005.

LEUNG, D. W.; CHEN, E.; CACHIANES, G.; GOEDDEL, D. V. Nucleotide sequence of the partition function of *Escherichia coli* plasmid ColE1. **Dna**, 4, 351-355, 1985.

LI, G.; JIANG, Y.; FAN, X. J.; LIU, Y. H. Molecular cloning and characterization of a novel β -glucosidase with high hydrolyzing ability for soybean isoflavone glycosides and glucose-tolerance from soil metagenomic library. **Bioresour. Technol.**, 123, 15-22, 2012.

LI, S.; DU, J.; SUN, J.; GALAZKA, J. M.; GLASS, N. L.; CATE, J. H. D.; YANG, X.; ZHAO, H. Overcoming glucose repression in mixed sugar fermentation by co-expressing a cellobiose transporter and a β -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Biosyst.**, 6, 2129-2132, 2010.

LI, Y.; LIU, N.; YANG, H.; ZHAO, F.; YU, Y.; TIAN, Y.; LU, X. Cloning and characterization of a new β -Glucosidase from a metagenomic library of Rumen of cattle feeding with *Miscanthus sinensis*. **BMC Biotechnol.**, 14, 85, 2014.

LIAO, Y.; ZENG, M.; WU, Z. F.; CHEN, H.; WANG, H. N.; WU, Q.; SHAN, Z.; HAN, X. Y. Improving phytase enzyme activity in a recombinant phyA mutant phytase from *Aspergillus niger* N25 by error-prone PCR. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 166, 549-562, 2012.

LIN, L.; MENG, X.; LIU, P.; HONG, Y.; WU, G.; HUANG, X.; LI, C.; DONG, J.; XIAO, L.; LIU, Z. Improved catalytic efficiency of endo- β -1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* BME-15 by directed evolution. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 82, 671-679, 2009.

LING, L. L.; KEOHAVONG, P.; DIAS, C.; THILLY, W. G. Optimization of the polymerase chain reaction with regard to fidelity: modified T7, Taq, and vent DNA polymerases. **PCR Methods Appl.**, 1, 63-69, 1991.

LINSKENS, M. H.; GROOTENHUIS, P. D.; BLAAUW, M.; HUISMAN-DE WINKEL, B.; VAN RAVESTEIN, A.; VAN HAASTERT, P. J.; HEIKOOP, J. C. Random mutagenesis and screening of complex glycoproteins: expression of human gonadotropins in *Dictyostelium discoideum*. **Faseb j.**, 13, 639-645, 1999.

Liu, J. J.; Zhang, G. C.; Oh, E. J.; Pathanibul, P.; Turner, T. L.; Jin, Y. S. Lactose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of fermenting cellobiose. **J. Biotechnol.**, 234, 99-104, 2016.

LIU, L.; YANG, H.; SHIN, H. D.; CHEN, R. R.; LI, J.; DU, G.; CHEN, J. How to achieve high-level expression of microbial enzymes: strategies and perspectives. **Bioengineered.**, 4, 212-223, 2013.

LIU, D.; ZHANG, R.; YANG, X.; ZHANG, Z.; SONG, S.; MIAO, Y.; SHEN, Q. Characterization of a thermostable beta-glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X33. **Microb. Cell Fact.**, 11, 25, 2012.

LIU, H.; NAISMITH, J. H. An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. **BMC Biotechnol.**, 8, 91, 2008.

LU, J.; DU, L.; WEI, Y.; HU, Y.; HUANG, R. Expression and characterization of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from a soil metagenome. **Acta Biochim. Biophys. Sin.**, 45, 664-673, 2013.

LUSIS, A. J.; BECKER, R. R. The β -glucosidase system of the thermophilic fungus *Chaetomium thermophile* var. *coprophile* n. var. **Biochim. Biophys. Acta**, 329, 5-16, 1973.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiol Mol Biol Rev.**, 66, 506-577, 2002.

MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M. L.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, 22, 249-270, 2005.

MACKENZIE, L. F.; SULZENBACHER, G.; DIVNE, C.; JONES, T. A.; WÖLDIKE, H. F.; SCHÜLEIN, M.; WITHERS, S. G.; DAVIES, G. J. Crystal structure of the family 7 endoglucanase I (Cel7B) from *Humicola insolens* at 2.2 Å resolution and identification of the catalytic nucleophile by trapping of the covalent glycosyl-enzyme intermediate. **Biochem. J.**, 335, 409-416, 1998.

MAI, Z.; YANG, J.; TIAN, X.; LI, J.; ZHANG, S. Gene cloning and characterization of a novel salt-tolerant and glucose-enhanced β -glucosidase from a marine *Streptomyces*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 169, 1512–1522, 2013.

MAI, L. T.; THANH, V. N. Cloning of a β -Glucosidase Gene (BGL1) from Traditional Starter Yeast *Saccharomycopsis fibuligera* BMQ 908 and Expression in *Pichia pastoris*. **Int. J. Biol. Sci.**, 4, 1008-1012, 2010.

MAKRIDES, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **Microbiol. Rev.**, 60, 512-538, 1996.

MALDONADO, R.F. **Glicosilação sítio específica modula a termoestabilidade de uma endo-xilanase do Grupo GH11 de *Bacillus subtilis***. 2013. 212 f. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

MARANA, S. R.; TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Midgut β -D-glucosidases from *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae). Physical properties, substrate specificities and function. **Insect Biochem. Molec. Biol.**, 25, 835-843, 1995.

MATSUZAWA, T.; YAO, K. Screening, identification, and characterization of a novel saccharide-stimulated β -glycosidase from a soil metagenomic library. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** DOI: 10.1007/s00253-016-7803-2, 2016a.

MATSUZAWA, T.; JO, T.; UCHIYAMA, T.; MANNINEN, J. A.; ARAKAWA, T.; MIYAZAKI, K.; FUSHINOBU, S.; YAO, K. Crystal structure and identification of a key amino acid for glucose tolerance, substrate specificity, and transglycosylation activity of metagenomic β -glucosidase Td2F2. **FEBS J.**, 283,2340–2353, 2016b.

MCCULLUM, E. O.; WILLIAMS, B. A.; ZHANG, J.; CHAPUT, J. C. Random mutagenesis by error-prone PCR. **Methods Mol. Biol.**, 634,103-109, 2010.

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

MELEIRO, L. P.; SALGADO, J. C. S.; MALDONADO, R. F.; ALPONTI, J. S.; ZIMBARDI, A. L. R. L.; JORGE, J. A.; WARD, R. J.; FURRIEL, R. P. M. A *Neurospora crassa* β -glucosidase with potential for lignocellulose hydrolysis shows strong glucose tolerance and stimulation by glucose and xylose. **J. Mol. Catal. B- Enzym.**, 122, 131–140, 2015.

MELEIRO, L. P.; ZIMBARDI, A. L. R. L.; SOUZA, F. H. M.; MASUI, D. C.; SILVA, T. M.; JORGE, J. A.; FURRIEL, R. P. M. A novel β -glucosidase from *Humicola insolens*

with high potential for untreated waste paper conversion to sugars. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 173, 391–408, 2014.

MENÉNDEZ, C.; HERNÁNDEZ, L.; BANGUELA, A; PAÍS, J. Functional production and secretion of the *Gluconacetobacter diazotrophicus* fructose-releasing exo-levanase (LsdB) in *Pichia pastoris*. **Enzyme Microb Tech.**, 34, 446-452, 2004.

MEYER, H. P.; CANEVASCINI, G. Separation and Some Properties of Two Intracellular beta-Glucosidases of *Sporotrichum (Chrysosporium)* thermophile. **Appl. Environ. Microbiol.**, 41, 924-931, 1981.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Anal. Chem.**, 31, 426-428, 1959.

MOORE, R.; CLARCK, W. D.; VODOPICK, D. S. **Botany**, 2nd ed. New York: WCB/McGraw-Hil, 1998.

NAKAZAWA, H.; OKADA, K.; ONODERA, T.; OGASAWARA, W.; OKADA, H.; MORIKAWA, Y. Directed evolution of endoglucanase III (Cel12A) from *Trichoderma reesei*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 83, 649-657, 2009.

NASCIMENTO, C. V.; SOUZA, F. H.; MASUI, D. C.; LEONE, F. A.; PERALTA, R. M.; JORGE, J. A.; FURRIEL, R. P. Purification and biochemical properties of a glucose-stimulated beta-D-glucosidase produced by *Humicola grisea* var. *thermoidea* grown on *sugarcane bagasse*. **J. Microbiol.**, 48, 53-62, 2010.

NICOLINI, C.; BRUZZESE, D.; CAMBRIA, M. T.; BRAGAZZI, N. L.; PECHKOVA, E. Recombinant laccase: I. Enzyme cloning and characterization. **J. Cell. Biochem.**, 114, 599–605, 2013.

OGELE, Z. B.; YARANGUMELI, K.; DU, H.; IFRIJ, I. Submerged cultivation of *Scytalidium thermophilum* on complex lignocellulosic biomass for endoglucanase production. **Enzyme Microb. Technol.**, 28, 689-695, 2001.

OSAWA, T.; TSUJI, T. Fractionation and structural assessment of oligosaccharides and glycopeptides by use of immobilized lectins. **Annu. Rev. Biochem.**, 56, 21-42, 1987.

PAAVILAINEN, S.; HELLMAN, J.; KORPELA, T. Purification, characterization, gene cloning, and sequencing of a new beta-glucosidase from *Bacillus circulans* subsp. *alkalophilus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 59, 927-932, 1993.

PACKER, M. S.; LIU, D. R. Methods for the directed evolution of proteins. **Nat. Rev. Genet.**, 16, 379-394, 2015.

PATTEN, P. A.; HOWARD, R. J.; STEMMER, W. P. Applications of DNA shuffling to pharmaceuticals and vaccines. **Curr. Opin. Biotechnol.**, 8, 724-733, 1997.

PEI, J.; PANG, Q.; ZHAO, L.; FAN, S.; SHI, H. *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* beta-glucosidase: a glucose-tolerant enzyme with high specific activity for cellobiose. **Biotechnol. Biofuels**, 5, 31, 2012.

PEI, X. Q.; YI, Z. L.; TANG, C. G.; WU, Z. L. Three amino acid changes contribute markedly to the thermostability of beta-glucosidase BglC from *Thermobifida fusca*. **Bioresour. Technol.**, 102, 3337-3342, 2011.

PEREZ, J.; MUNOZ-DORADO, J.; DE LA RUBIA, T.; MARTINEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **Int. Microbiol.**, 5, 53-63, 2002.

PÉREZ-PONS, J. A.; REBORDOSA, X.; QUEROL, E. Properties of a novel glucose-enhanced beta-glucosidase purified from *Streptomyces* sp. (ATCC 11238). **Biochim. Biophys. Acta**, 1251, 145-153, 1995.

PERUGINO, G.; TRINCONE, A.; ROSSI, M.; MORACCI, M. Oligosaccharide synthesis by glycosynthases. **TRENDS Biotechnol.**, 22, 31-37, 2004.

PONTOH, J.; LOW, N. H. Purification and characterization of beta-glucosidase from honey bees (*Apis mellifera*). **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 32, 679-690, 2002.

PORTER, J. L.; RUSLI, R. A.; OLLIS, D. L. Directed evolution of enzymes for industrial biocatalysis. **ChemBioChem.**, 17, 197 – 203, 2016.

PUTMAN, E. W.; LITT, C. F.; HASSID, W. Z. The Structure of D-Glucosyl-D-xylose Synthesized by Maltose Phosphorylase. **J. Am. Chem. Soc.**, 77, 4351-4353, 1955.

QING, Q.; YANG, B.; WYMAN, C. E. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. **Bioresour. Technol.**, 101, 9624-9630, 2010.

RAJASREE, K. P.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A.; SUKUMARAN, R. K. Highly glucose tolerant β -glucosidase from *Aspergillus unguis*: NII 08123 for enhanced hydrolysis of biomass. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, 40, 967-975, 2013.

RAMANI, G.; MEERA, B.; VANITHA, C.; RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. Molecular cloning and expression of thermostable glucose-tolerant β -glucosidase of *Penicillium funiculosum* NCL1 in *Pichia pastoris* and its characterization. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, 42, 553–565, 2015.

RANI, V.; DASH, S.; NAIN, L.; ARORA, A. Expression of novel glucose tolerant β -glucosidase on cell surface by *Rhodotorula glutinis* isolate. **Biocatal. Agric. Biotechnol.**, 4, 380–387, 2015.

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.

REDDY, N.; YANG, Y. Properties and potential applications of natural cellulose fibers from cornhusks. **Green Chem.**, 7, 190-195, 2005.

RIBEIRO, L. F.; RIBEIRO, L. F. C. Improving fungal enzyme properties through protein engineering. **Fungal Enzymes**, 341, 2013.

RICCIO, P.; ROSSANO, R.; VINELLA, M.; DOMIZIO, P.; ZITO, F.; SANSEVRINO, F.; D'ELIA, A.; ROSI, I. Extraction and immobilization in one step of two β -glucosidases released from a yeast strain of *Debaryomyces hansenii*. **Enzyme Microb. Technol.**, 24, 123-129, 1999.

RIOU, C.; SALMON, J. M.; VALLIER, M. J.; GUNATA, Z.; BARRE, P. Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant beta-glucosidase from *Aspergillus oryzae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 64, 3607-3614, 1998.

ROBERT, X.; GOUET, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. **Nucl. Acids Res.**, 42(W1), W320-W324, 2014.

ROTH, J.; TAATJES, D. J.; LUCOCQ, J. M.; CHAREST, P. M. Light and electron microscopical detection of sugar residues in tissue sections by gold labeled lectins and glycoproteins. II. Applications in the study of the topology of Golgi apparatus glycosylation steps and the regional distribution of lectin binding sites in the plasma membrane. **Acta Histochem. Suppl.**, 36, 125-140, 1988.

RULLER, R.; ROSA, J. C.; FAÇA, V. M.; GREENE, L. J.; WARD, R. J. Efficient constitutive expression of *Bacillus subtilis* xylanase A in *Escherichia coli* DH5 α under the control of the *Bacillus* BsXA promoter. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, 43, 9-15, 2006.

RYU, D. D. Y.; MANDELS, M. Cellulases: Biosynthesis and applications. **Enzyme Microb. Technol.**, 2, 91-102, 1980.

SAHA, B. C.; BOTHAST, R. J. Production, purification, and characterization of a highly glucose-tolerant novel beta-glucosidase from *Candida peltata*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 62, 3165-3170, 1996.

SAHA, B. C.; COTTA, M. A. Lime pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to ethanol. **Biomass Bioenerg.**, 32, 971-977, 2008.

SAHDEV, S.; KHATTAR, S. K.; SAINI, K. S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. **Mol. Cell. Biochem.**, 307, 249-264, 2008.

SALGADO, J. C. S. **Caracterização bioquímica de β -glicosidases variantes de *Humicola insolens*: evidências de transglicosilação no fenômeno de estimulação da enzima pelo produto da reação.** 2016. 172 f. Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração em Bioquímica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **J. Mol. Biol.**, 234, 779-815, 1993.

SALOHEIMO, M.; KUJA-PANULA, J.; YLOSMAKI, E.; WARD, M.; PENTTILA, M. Enzymatic properties and intracellular localization of the novel *Trichoderma reesei* beta-glucosidase BGLII (cel1A). **Appl. Environ. Microbiol.**, 68, 4546-4553, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual.** 2. ed., 3. vol., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 253p., 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 74, 5463-5467, 1977.

SANTOS, C. A.; ZANPHORLIN, L. M.; CRUCELLO, A.; TONOLI, C. C.; RULLER, R.; HORTA, M. A. C.; MURAKAMI, M. T.; SOUZA, A. P. Crystal structure and biochemical characterization of the recombinant ThBgl, a GH1 β -glucosidase overexpressed in *Trichoderma harzianum* under biomass degradation conditions. **Biotechnol. Biofuels**, 9,71, 2016.

SANTOS, F. A.; QUEIROZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Quím. Nova**, 35, 1004-1010, 2012.

Schliemann, W. (1983) Beta-D-glucosidases (EC 3.2.1.21) of microorganisms. A tabular review. *Pharmazie*, **38**, 287-307.

SESTELO, A. B. F.; POZA, M.; VILLA, T. G. β -Glucosidase Activity in a *Lactobacillus Plantarum* Wine Strain. **World J. Microb. Biot.**, 20, 633-637, 2004.

SHARON, N.; LIS, H. Glycoproteins: research booming on long-ignored ubiquitous compounds. **Mol. Cell Biochem.**, 42, 167-187, 1982.

SHI, H.; WANG, L.; LI, X.; WANG, L.; ZHANG, Y.; LI, X.; WANG, F. Directed evolution of a hyperthermophilic endoglucanase Cel12B from *Thermotoga maritima*. **Bioresources**, 9, 3526–3535, 2014.

SHIVANGE, A. V.; ROCCATANO, D.; SCHWANEBERG, U. Iterative key-residues interrogation of a phytase with thermostability increasing substitutions identified in directed evolution. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 100, 227-242, 2016.

SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D. G.; GIBSON, T. J.; KARPLUS, K.; LI, W.; LOPEZ, R.; MCWILLIAM, H.; REMMERT, M.; SÖDING, J.; THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Mol. Syst. Biol.**, 7, 539, 2011.

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

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.

SKROPETA, D. The effect of individual N-glycans on enzyme activity. **Bioorg. Med. Chem.**, 17, 2645-2653, 2009.

SONIA, K. G.; CHADHA, B. S.; BADHAN, A. K.; SAINI, H. S.; BHAT, M. K. Identification of glucose tolerant acid active β -glucosidases from thermophilic and thermotolerant fungi. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 24, 599–604, 2008.

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

SOUZA, F. H. M.; MELEIRO, L. P.; MACHADO, C. B.; MALDONADO, R. F.; SOUZA, T. A. C. B.; MASUI, D. C.; MURAKAMI, M. T.; JORGE, J. A.; WARD, R. J.; FURRIEL, R. P. M. Gene cloning, expression and biochemical characterization of a glucose- and xylose-stimulated β -glucosidase from *Humicola insolens* RP86. **J. Mol. Catal. B-Enzym.**, 106, 1-10, 2014.

SOUZA, F. H. M.; INOCENTES, R. F.; WARD, R. J.; JORGE, J. A.; FURRIEL, R. P. M. Glucose and xylose stimulation of a β -glucosidase from the thermophilic fungus *Humicola insolens*: A kinetic and biophysical study. **J. Mol. Catal. B-Enzym.**, 94, 119-128, 2013.

SOUZA, F. H. M.; 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 b-glucosidase from the thermophilic fungus *Humicola insolens*. **Process Biochem.**, 45, 272–278, 2010.

SOUZA, F. H. M. **Caracterização da atividade β -glucosidásica de *Humicola insolens***. 2009. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, área de concentração em Química) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

STEMMER, W.P. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. **Nature**, 370, 389-391, 1994.

STOYANOV A., ZHUKOV M. YU., RIGHETTI P. G. The proteome revisited: Theory and practice of all relevant electrophoretic steps. **J. Chromatogr.**, 63, 1–462, 2001.

SUE, M.; ISHIHARA, A.; IWAMURA, H. Purification and characterization of a beta-glucosidase from rye (*Secale cereale* L.) seedlings. **Plant Sci.**, 155, 67-74, 2000.

SWARTZ, J. R. Advances in Escherichia coli production of therapeutic proteins. **Curr. Opin. Biotechnol.**, 12, 195-201, 2001.

SZCZODRAK, J.; FIEDUREK, J. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Biomass Bioenerg.**, 10, 367-375, 1996.

TAKASHIMA, S.; NAKAMURA, A.; HIDAKA, M.; MASAKI, H.; UOZUMI, T. Molecular cloning and expression of the novel fungal beta-glucosidase genes from *Humicola grisea* and *Trichoderma reesei*. **J Biochem.**, 125, 728-736, 1999.

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

TIAN, C.; BEESON, W. T.; IAVARONE, A. T.; SUN, J.; MARLETTA, M. A.; CATE, J. H.; Glass, N. L. Systems analysis of plant cell wall degradation by the model filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 106, 22157–22162, 2009.

TROLLOPE, K. M.; GOERGENS, J. F.; VOLSCHENK, H. Semirational Directed Evolution of Loop Regions in *Aspergillus japonicus* beta-Fructofuranosidase for Improved Fructooligosaccharide Production. **Appl. Environ. Microbiol.**, 81, 7319-7329, 2015.

TSAI, C. T.; HUANG, C. T. Overexpression of the Neocallimastix frontalis xylanase gene in the methylotrophic yeasts *Pichia pastoris* and *Pichia methanolica*. **Enzyme Microb. Technol.**, 42, 459-465, 2008.

TSUKADA, T.; IGARASHI, K.; YOSHIDA, M.; SAMEJIMA, M. Molecular cloning and characterization of two intracellular beta-glucosidases belonging to glycoside hydrolase family 1 from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 73, 807-814, 2006.

UCHIMA C. A.; TOKUDA, G.; WATANABE, H.; KITAMOTO, K.; ARIOKA, M. A novel glucose-tolerant β -glucosidase from the salivary gland of the termite *Nasutitermes takasagoensis*. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, 59, 141-145, 2013.

UCHIMA C. A.; TOKUDA, G.; WATANABE, H.; KITAMOTO, K.; ARIOKA, M. Heterologous expression in *Pichia pastoris* and characterization of an endogenous thermostable and high-glucose-tolerant β -glucosidase from the termite *Nasutitermes takasagoensis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 78, 4288 – 4293, 2012.

UCHIMA, C. A.; TOKUDA, G.; WATANABE, H.; KITAMOTO, K.; ARIOKA, M. Heterologous expression and characterization of a glucose-stimulated beta-glucosidase from the termite *Neotermes koshunensis* in *Aspergillus oryzae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 89, 1761-1771, 2011.

UCHIYAMA, T.; YAOI, K.; MIYAZAKI, K. Glucose-tolerant β -glucosidase retrieved from a *Kusaya* gravity metagenome. **Front. Microbiol.**, 6, 548, 2015.

UCHIYAMA, T.; MIYAZAKI, K.; YAOI, K. Characterization of a novel beta-glucosidase from a compost microbial metagenome with strong transglycosylation activity. **J. Biol. Chem.**, 288, 18325-18334, 2013.

UJU; ABE, K.; UEMURA, N.; OSHIMA, T.; GOTO, M.; KAMIYA, N. Peracetic acid-ionic liquid pretreatment to enhance enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. **Bioresour. Technol.**, 138, 87-94, 2013.

UNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar. <<http://www.unica.com.br>>. Acesso em 10 de outubro de 2016.

VAN OUYEN, A. J.; DEKKER, P.; HUANG, M.; OLSTHOORN, M. M.; JACOBS, D. I.; COLUSSI, P. A.; TARON, C. H. Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. **FEMS Yeast Res.**, 6, 381-392, 2006.

VASHISHTHA, A.; KONIGSBERG, W.; WANG, J. Different divalent cations alter the kinetics and fidelity of DNA polymerases. **J. Biol. Chem.**, 291, 20869–20875, 2016.

WANG, B.; XIA, L. High efficient expression of cellobiase gene from *Aspergillus niger* in the cells of *Trichoderma reesei*. **Bioresour. Technol.**, 102, 4568-4572, 2011.

WANG, H.; JONES, R. W. Properties of the *Macrophomina phaseolina* endoglucanase (EGL 1) gene product in bacterial and yeast expression systems. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 81, 153-160, 1999.

WANG, X. J.; PENG, Y. J.; ZHANG, L. Q.; LI, A. N.; LI, D. C. Directed evolution and structural prediction of cellobiohydrolase II from the thermophilic fungus *Chaetomium thermophilum*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 95, 1469-1478, 2012.

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

WESTERENG, B.; AGGER, J. W.; HORN, S. J.; VAAJE-KOLSTAD, G.; AACHMANN, F. L.; STENSTRØM, Y. H.; EIJSINK, V. G. H. Efficient separation of oxidized cello-oligosaccharides generated by cellulose degrading lytic polysaccharide monooxygenases. **J. Chromatogr. A**, 1271, 144– 152, 2013.

WHITE, A.; ROSE, D. R. Mechanism of catalysis by retaining α -glycosyl hydrolases. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, 7, 645-651, 1997.

WILSON, D. B. Processive and nonprocessive cellulases for biofuel production-lessons from bacterial genomes and structural analysis. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 93, 497–502, 2012.

WILSON, D. S.; KEEFE, A. D. Random mutagenesis by PCR. **Curr. Protoc. Mol. Biol.**, 51, 8.3.1-8.3.9, 2001.

WITHERS, S. G.; WARREN, R. A. J.; STREET, I. P.; RUPITZ, K.; KEMPTON, J. B.; AEBERSOLD, R. Unequivocal demonstration of the involvement of a glutamate residue as a nucleophile in the mechanism of a retaining glycosidase. **J. Am. Chem. Soc.**, 112, 5887–5889, 1990.

WITHERS, S. G.; STREET, I. P.; BIRD, P.; DOLPHIN, D. H. 2-Deoxy-2-fluoroglucosides: a novel class of mechanism-based glucosidase inhibitors. **J. Am. Chem. Soc.**, 109, 7530–7531, 1987.

WONG, T. S.; ZHURINA, D.; SCHWANEBERG, U. The diversity challenge in directed protein evolution. **Comb. Chem. High. Throughput Screen.**, 9, 271-288, 2006.

WRIGHT, R. M.; YABLONSKY, M. D.; SHALITA, Z. P.; GOYAL, A. K.; EVELEIGH, D. E. Cloning, characterization, and nucleotide sequence of a gene encoding *Microbispora bispora* BglB, a thermostable β -glucosidase expressed in *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 58, 3455-65, 1992.

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

XU, X.; LI, J.; SHI, P.; JI, W.; LIU, B.; ZHANG, Y.; YAO, B.; FAN, Y.; ZHANG, W. The use of T-DNA insertional mutagenesis to improve cellulase production by the thermophilic fungus *Humicola insolens* Y1. **Sci. Rep.**, 6, 31108, 2016.

XU, H.; XIONG, A. S.; ZHAO, W.; TIAN, Y. S.; PENG, R. H.; CHEN, J. M.; YAO, Q. H. Characterization of a glucose-, xylose-, sucrose-, and D-galactose-stimulated beta-glucosidase from the alkalophilic bacterium *Bacillus halodurans* C-125. **Curr. Microbiol.**, 62, 833-839, 2011.

YAN, T. R.; LIN, C. L. Purification and characterization of a glucose-tolerant beta-glucosidase from *Aspergillus niger* CCRC 31494. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 61, 965-970, 1997.

YANG, F.; YANG, X.; LI, Z.; DU, C.; WANG, J.; LI, S. Overexpression and characterization of a glucose-tolerant β -glucosidase from *T. aotearoense* with high specific activity for cellobiose. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 99, 8903–8915, 2015.

YANG, S.; HUA, C.; YAN, Q.; LI, Y.; JIANG, Z. Biochemical properties of a novel glycoside hydrolase family 1 beta-glucosidase (PtBglu1) from *Paecilomyces thermophila* expressed in *Pichia pastoris*. **Carbohydr Polym.**, 92, 784-791, 2013.

YANG, Y.; ZHANG, X.; YIN, Q.; FANG, W.; FANG, Z.; WANG, X.; XIAO, Y. A mechanism of glucose tolerance and stimulation of GH1 β -glucosidases. **Sci. Rep.**, 5, 17296, 2015.

YIN, J.; LI, G.; REN, X.; HERRLER, G. Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. **J. Biotechnol.**, 127, 335-347, 2007.

YUN, S. I.; JEONG, C. S.; CHUNG, D. K.; CHOI, H. S. Purification and some properties of a beta-glucosidase from *Trichoderma harzianum* type C-4. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 65, 2028-2032, 2001.

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

ZARAFETA, D.; KISSAS, D.; SAYER, C.; GUDBERGSDOTTIR, S. R.; LADOUKAKIS, E.; ISUPOV, M. N.; CHATZIOANNOU, A.; PENG, X.; LITTLECHILD, J. A.; SKRETAS, G.; KOLISIS, F. N. Discovery and characterization of a thermostable

and highly halotolerant GH5 cellulase from an icelandic hot spring isolate. **PLoS ONE**, 11,e0146454, 2016.

ZECHER, D. L.; WHITERS, S. G. Glycosidase Mechanisms: Anatomy of a finely tuned catalyst. **Acc. Chem. Res.**, 33, 11-18, 2000.

ZELENA K.; EISELE N.; BERGER R.G. *Escherichia coli* as a production host for novel enzymes from basidiomycota. **Biotechnol. Adv.**, 32, 1382–1395, 2014.

ZHA, J.; LI, B. Z.; SHEN, M. H.; HU, M. L.; SONG, H.; YUAN, Y.J. Optimization of CDT-1 and XYL1 expression for balanced co-production of ethanol and xylitol from cellobiose and xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS One**, 8, e68317, 2013.

ZHANG, J.; SHI, H.; XU, L.; ZHU, X.; LI, X. Correction: Site-directed mutagenesis of a hyperthermophilic endoglucanase Cel12B from *Thermotoga maritima* based on rational design. **PLoS ONE**, 10, e0141937, 2015.

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

ZHAO, J.; GUO, C.; TIAN, C.; MA, Y. Heterologous expression and characterization of a gh3 β -glucosidase from thermophilic fungi *Myceliophthora thermophila* in *Pichia pastoris*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 177, 511–527, 2015.

ZHAO, L.; XIE, J.; ZHANG, X.; CAO, F.; PEI, J. Overexpression and characterization of a glucose-tolerant β -glucosidase from *Thermotoga thermarum* DSM 5069T with high catalytic efficiency of ginsenoside Rb1 to Rd. **J. Mol. Catal. B-Enzym.**, 95, 62-69, 2013.

ZHOU, C.; XUE, Y.; MA, Y. Evaluation and directed evolution for thermostability improvement of a GH 13 thermostable alpha-glucosidase from *Thermus thermophilus* TC11. **BMC Biotechnol.**, 15, 97, 2015.

ZIMBARDI, A. L. R. L.; SEHN, C.; MELEIRO, L. P.; SOUZA, F. H. M.; MASUI, D. C.; NOZAWA, M. S. F.; GUIMARÃES, L. H. S.; JORGE, J. A.; FURRIEL, R. P. M. Optimization of β -glucosidase, β -xylosidase and xylanase production by *Colletotrichum graminicola* under solid-state fermentation and application in raw sugarcane trash saccharification. **Int. J. Mol. Sci.**, 14, 2875-2902, 2013.

ZNAMEROSKI, E. A.; GLASS, N. L. Using a model filamentous fungus to unravel mechanisms of lignocellulose deconstruction. **Biotechnol. Biofuels**, 6, 6, 2013.

ZNAMEROSKI, E. A.; CORADETTI, S. T.; ROCHE, C. M.; TSAI, J. C.; IAVARONE, A. T.; CATE, J. H. D.; GLASS, N. L. Induction of lignocellulose-degrading enzymes in *Neurospora crassa* by cellodextrins. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 109, 6012-6017, 2012.

Luana Parras Meleiro
Curriculum Vitae

Dezembro/2016

Luana Parras Meleiro

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Luana Parras Meleiro
Filiação Eduardo Parras Meleiro e Lucia Maria Rodrigues Parras
Nascimento 13/10/1988 - Barra Bonita/SP - Brasil

Formação acadêmica/titulação

2012 - Atual Doutorado em Ciências (em andamento).
Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP, FFCLRP, Brasil
Título: Relação estrutura-função de uma β -glucosidase estimulada por glicose e xilose do fungo termófilo *Humicola insolens*: estudos de evolução dirigida
Orientadora: Rosa dos Prazeres Melo Furriel
Bolsista da): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

2008 - 2012 Graduação em Química com Atribuições Biotecnológicas.
Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP, FFCLRP, Brasil

Formação complementar

2015 - 2015 Curso de curta duração em Planejamento Experimental e Otimização de Bioprocessos. (Carga horária: 8h).
Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP, FFCLRP, Brasil

Atuação profissional

1. Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP - FFCLRP

Vínculo institucional

2013 - 2013 Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 6, Regime: Parcial
Outras informações: Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à disciplina Bioquímica Experimental, ministrada a alunos de graduação da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

2012 - Atual Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Aluno de Pós-Graduação - Doutorado Direto, Regime: Dedicação exclusiva
Outras informações: Bolsista pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP Proc: 2011/22966-9

Revisor de periódico

1. Arabian Journal of Chemistry

2. African Journal of Biotechnology
3. Brazilian Journal of Microbiology (Impresso)
4. Cellulose Chemistry and Technology
5. African Journal of Microbiology Research

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. ZIMBARDI, ANA; CAMARGO, PRISCILA; CARLI, SIBELI; AQUINO NETO, SIDNEY; **MELEIRO, LUANA PARRAS**; ROSA, JOSE; DE ANDRADE, ADALGISA; JORGE, JOÃO; FURRIEL, ROSA
A High Redox Potential Laccase from *Pycnoporus sanguineus* RP15: Potential Application for Dye Decolorization. International Journal of Molecular Sciences, v.17, p.672, 2016.
2. **MELEIRO, LUANA PARRAS**; SALGADO, JOSÉ CARLOS SANTOS; MALDONADO, RAQUEL FONSECA; ALPONTI, JULIANA SANCHEZ; ZIMBARDI, ANA LUCIA RIBEIRO LATORRE; JORGE, JOÃO ATÍLIO; WARD, RICHARD JOHN; FURRIEL, ROSA PRAZERES MELO
A *Neurospora crassa* β -glucosidase with potential for lignocellulose hydrolysis shows strong glucose tolerance and stimulation by glucose and xylose. Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic, v.122, p.131 - 140, 2015.
3. **MELEIRO, LUANA PARRAS**; ZIMBARDI, ANA LUCIA RIBEIRO LATORRE; SOUZA, FLAVIO HENRIQUE MOREIRA; MASUI, DOUGLAS CHODI; SILVA, TONY MARCIO; JORGE, JOÃO ATÍLIO; FURRIEL, ROSA PRAZERES MELO
A Novel β -Glucosidase from *Humicola insolens* with High Potential for Untreated Waste Paper Conversion to Sugars. Applied Biochemistry and Biotechnology. v.173, p.391 - 408, 2014.
4. SOUZA, FLAVIO HENRIQUE MOREIRA; **MELEIRO, LUANA PARRAS**; MACHADO, CARLA BOTELHO; ZIMBARDI, ANA LUCIA RIBEIRO LATORRE; MALDONADO, RAQUEL FONSECA; SOUZA, TATIANA ARRUDA CAMPOS BRASIL; MASUI, DOUGLAS CHODI; MURAKAMI, MARIO TYAGO; JORGE, JOÃO ATÍLIO; WARD, RICHARD JOHN; FURRIEL, ROSA PRAZERES MELO
Gene cloning, expression and biochemical characterization of a glucose- and xylose-stimulated β -glucosidase from *Humicola insolens* RP86. Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic, v.106, p.1 - 10, 2014.
5. FONSECA-MALDONADO, RAQUEL; RIBEIRO, LUCAS F.; FURTADO, GILVAN P.; ARRUDA, LETÍCIA M.; **MELEIRO, LUANA P.**; ALPONTI, JULIANA S.; BOTELHO-MACHADO, CARLA; VIEIRA, DAVI S.; BONNEIL, ERIC; FURRIEL, ROSA DOS PRAZERES MELO; THIBAUT, PIERRE; WARD, RICHARD J.
Synergistic action of co-expressed xylanase/laccase mixtures against milled sugar cane bagasse. Process Biochemistry, v.49, p.1152 - 1161, 2014.
6. ZIMBARDI, ANA; SEHN, CESAR; **MELEIRO, LUANA**; SOUZA, FLAVIO; MASUI, DOUGLAS; NOZAWA, MONICA; GUIMARÃES, LUIS; JORGE, JOÃO; FURRIEL, ROSA
Optimization of β -Glucosidase, β -Xylosidase and Xylanase Production by *Colletotrichum graminicola* under Solid-State Fermentation and Application in Raw Sugarcane Trash Saccharification. International Journal of Molecular Sciences, v.14, p.2875 - 2902, 2013.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **MELEIRO, L. P.**; CARLI, S.; JORGE, J. A.; WARD, R. J.; FURRIEL, R. P. M. GH1-1 from *Neurospora crassa*: strong glucose tolerance/stimulation by glucose and xylose. Workshop

on Second Generation Bioethanol, 2016, Campinas, Brasil.

2. SALGADO, J. C. S.; **MELEIRO, L. P.**; Ward, R.J.; Furriel, R.P.M.; JORGE, J. A. A MUTATED β -GLUCOSIDASE FROM *HUMICOLA INSOLENS* WITH HIGHER LEVELS OF GLUCOSE AND XYLOSE STIMULATION AND TOLERANCE. 23rd International Congress of the IUBMB and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2015, Foz do Iguaçu, Parana, Brasil.

3. CARLI, S.; Zimbardi, A.L.R.L.; **MELEIRO, L. P.**; JORGE, J. A.; Furriel, R.P.M. PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF A THERMOSTABLE ENDOXYLANASE FROM *COLLETOTRICHUM GRAMINICOLA*. 23rd International Congress of the IUBMB and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2015, Foz do Iguaçu, Parana, Brasil.

4. CARVALHO, D. R.; Zimbardi, A.L.R.L.; **MELEIRO, L. P.**; JORGE, J. A.; Furriel, R.P.M. PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF A THERMOSTABLE β -XYLOSIDASE FROM *COLLETOTRICHUM GRAMINICOLA*. 23rd International Congress of the IUBMB and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2015, Foz do Iguaçu, Parana, Brasil.

5. Zimbardi, A.L.R.L.; AQUINO NETO, S.; **MELEIRO, L. P.**; JORGE, J. A.; ANDRADE, A. R.; FURRIEL, R. P. M. PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A HIGH REDOX POTENTIAL LACCASE FROM *PYCNOPORUS SANGUINEUS* WITH POTENTIAL BIOTECHNOLOGICAL APPLICATION. 23rd International Congress of the IUBMB and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2015, Foz do Iguaçu, Parana, Brasil.

6. **MELEIRO, LUANA P.**; Zimbardi, A.L.R.L.; Furriel, R.P.M. Uma nova metodologia para identificação de determinantes estruturais de uma beta glucosidase de *Humicola insolens* por glicose. 1º Encontro de Química Biotecnológica e Agroindustrial, 2015, Ribeirão Preto.

7. **MELEIRO, L. P.**; Zimbardi, A.L.R.L.; JORGE, J. A.; Ward, R.J.; Furriel, R.P.M. GLUCOSE- AND XYLOSE-STIMULATED β -GLUCOSIDASE FROM *HUMICOLA INSOLENS* RP86: EXPRESSION IN *PICHA PASTORIS*, PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION. XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología y 4 Congreso Colombiano de Microbiología, 2014, Cartagena, Colombia.

8. Zimbardi, A.L.R.L.; **MELEIRO, L. P.**; MASUI, D. C.; JORGE, J. A.; Furriel, R.P.M. LACCASES WITH POTENTIAL APPLICATION IN THE DECOLORIZATION OF INDUSTRIAL DYES: PRODUCTION OPTIMIZATION BY *PYCNOPORUS SANGUINEUS* UNDER SOLID-STATE FERMENTATION. XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología y 4 Congreso Colombiano de Microbiología, 2014, Cartagena, Colombia.

9. ZIMBARDI, A. L. R. L.; CAMARGO, P. F.; **MELEIRO, L. P.**; Maldonado, R.F.; GENTIL, S. L.; MASUI, D. C.; JORGE, J. A.; FURRIEL, R. P. M. A LOW-COST, HIGHLY EFFICIENT COCKTAIL FOR THE SACCHARIFICATION OF LIGNOCELLULOSIC BIOMASS. 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013, Natal, RN.

10. **MELEIRO, LUANA**; SOUZA, F. H. M.; Inocentes, R.F.; Zimbardi, A.L.R.L.; Maldonado, R.F.; MASUI, D. C.; Ward, R.J.; JORGE, J. A.; FURRIEL, R. P. M. KINETIC MODELS FOR THE STIMULATION OF A β -GLUCOSIDASE FROM *HUMICOLA INSOLENS* BY GLUCOSE AND XYLOSE. 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013, Natal, RN.

11. ZIMBARDI, A. L. R. L.; **MELEIRO, L. P.**; MASUI, D. C.; JORGE, J. A.; FURRIEL, R. P. M. High glucose yields from raw sugarcane trash and waste papers treated with mixtures of *Trichoderma reesei* cellulases and *Humicola insolens* or *Colletotrichum graminicola* crude extracts. XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia - ALAM, 2012, Santos.

12. GENTIL, S. L.; **MELEIRO, L. P.**; ZIMBARDI, A. L. R. L.; MASUI, D. C.; JORGE, J. A.; FURRIEL, R.

P. M. PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF A BETA - GLUCOSIDASE FROM THE EXO-1 MUTANT OF *NEUROSPORA CRASSA*. XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM), 2012, Santos - SP.

13. SOUZA, F. H. M.; **MELEIRO, L. P.**; MASUI, D. C.; JORGE, J. A.; FURRIEL, R. P. M. Biochemical Characterization of Five beta-glucosidases from the Thermophilic Fungus *Humicola insolens*. XL Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2011, Foz do Iguaçu.

14. **MELEIRO, L. P.**; CASTRO, R. L.; SOUZA, F. H. M.; MASUI, D. C.; JORGE, J. A.; Furriel, R.P.M. Purification and Biochemical Characterization of a Beta-glucosidase from the Thermophilic Fungus *Humicola insolens* cultivated in wheat bran. XL Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2011, Foz do Iguaçu.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. CARVALHO, D. R.; **MELEIRO, LUANA P.**; Zimbardi, A.L.R.L.; Furriel, R.P.M. Estudo do Potencial de Produção de Enzimas Lignocelulolíticas por Fungos Isolados do Solo Brasileiro. 22º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP - SIICUSP, 2014, Ribeirão Preto.

2. CAMARGO, P. F.; **MELEIRO, LUANA P.**; Zimbardi, A.L.R.L.; Furriel, R.P.M. Purificação e caracterização bioquímica de uma beta-glucosidase produzida pelo fungo termófilo *Humicola Insolens* em meio sólido. 20º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP - SIICUSP, 2012, Ribeirão Preto.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **MELEIRO, LUANA P.** Etanol lignocelulósico: os desafios da hidrólise enzimática da celulose, 2015. (Seminário apresentado no Ciclo de Estudos Avançados em Química, do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP)

Eventos

Participação em eventos

1. 1º Simpósio de Biotecnologia, 2016.
2. Workshop on Second Generation Bioethanol, 2016.
3. 1º Encontro de Química Biotecnológica e Agroindustrial, 2015.
4. 23rd International Congress of the IUBMB and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2015.
5. 22º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP - SIICUSP, 2014.
6. XXII Congresso Latinoamericano de Microbiología y 4 Congreso Colombiano de Microbiología, 2014.
7. 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013.
8. 20º Simpósio Internacional Iniciação Científica, 2012.
9. Plágio em publicações científicas, 2012.
10. SIFEA - Simpósio de Fermentação Alcoólica, 2012.

11. XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia - ALAM, 2012.
12. 19 Simpósio Internacional de Iniciação Científica, 2011.
13. XL Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2011.
14. I Escola de Inverno de Separações, 2010. (Outra)

Bancas

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. **MELEIRO, L. P.;** SILVA, J. C. R.

Participação em banca de Renata Garcia Coelho. **Produção e caracterização parcial das amilases de *Colletotrichum graminicola***, 2013

(Bacharelado em Ciências Biológicas) Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP

Participação em banca de comissões julgadoras

Outra

1. **XIV Olimpíada Regional de Química (comissão avaliadora)**, 2016

Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP

2. **24º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP - SIICUSP (Avaliador)**, 2016

Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP

3. **23º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP - SIICUSP (Avaliador)**, 2015

Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP

4. **22º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP - SIICUSP (Avaliador)**, 2014

Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP

5. **21º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP - SIICUSP (Avaliador)**, 2013

Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP

6. **20º Simpósio de Iniciação Científica (SIICUSP) - Avaliador**, 2012

Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP

Citações

Web of Science Total de citações : 35; Total de trabalhos : 6; Data : 27/12/2016; Fator H: 4;
Nome(s) do autor utilizado(s) na consulta para obter o total de citações:
Meleiro, Luana P

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em	
periódico.....	6
Trabalhos publicados em anais de	
eventos.....	16
Apresentações de trabalhos	
(Seminário).....	1