UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

**Estudo da multiplicidade de formas de β -glicosidases
de *Aspergillus versicolor***

Alexandre Favarin Somera

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como
parte das exigências para a obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área: Biologia Comparada

RIBEIRÃO PRETO – SP

2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

**Estudo da multiplicidade de formas de β -glicosidases
de *Aspergillus versicolor***

Alexandre Favarin Somera

Orientador: Prof. Dr. João Atílio Jorge

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como
parte das exigências para a obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área: Biologia Comparada

RIBEIRÃO PRETO – SP

2008

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, Maria Judite Favarin Somera, a meu pai, Jaime Roberto Somera, e a minha irmã, Rafaela Favarin Somera, pelo apoio, confiança, amor e educação conferidos a mim durante minha vida.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. João Atílio Jorge, pela abertura do laboratório, confiança e educação científica que me foram dados durante os períodos de Iniciação Científica e Mestrado.

Agradeço ao CNPq, pelo financiamento.

Agradeço o apoio e consideração dos professores integrantes do laboratório do qual participei.

Agradeço ao técnico de laboratório Maurício de Oliveira, pela assistência técnica e amizade.

Agradeço a todos os colegas de laboratório pela amizade e apoio durante o transcurso de todo o trabalho.

ÍNDICE GERAL

Resumo.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Polissacarídeos da parede celular vegetal.....	17
1.2. Características estruturais dos componentes majoritários celulolítico e hemicelulolíticos.....	18
1.2.1. Características estruturais da celulose e xiloglucana.....	18
1.2.2. Características estruturais da xilana.....	19
1.2.3. Características estruturais das galacto(gluco)mananas.....	20
1.3. Biodegradação de celulose e hemiceluloses.....	21
1.3.1. Degradação de celulose e xiloglucanas.....	21
1.3.2. Degradação de xilana.....	22
1.3.3. Degradação de galacto(gluco)mananas.....	22
1.4. Multiplicidade de formas de glicosil-hidrolases, em especial as de <i>Aspergillus</i> , e a hipótese de glicosilação diferencial induzida pela fonte de carbono.....	23
1.5. Microorganismo de estudo: <i>Aspergillus versicolor</i> (Vuillemin) Tiraboschi.....	27
2. OBJETIVOS.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1. Organismos e condições de crescimento.....	33
3.1.1. Linhagem utilizada.....	33
3.1.2. Manutenção do organismo em meio sólido.....	33
3.1.3. Culturas em meio líquido.....	33
3.2. Preparação do extrato de enzima micelial.....	34
3.3. Obtenção de enzima extracelular.....	34
3.4. Ensaio enzimático.....	34
3.4.1. Enzimas miceliais.....	34
3.4.1.1. β -xilosidases.....	34
3.4.1.2. β -glucosidases.....	35
3.4.2. Enzimas extracelulares.....	36
3.5. Testes de indução e repressão da atividade β -glicosidásica de <i>A. versicolor</i>	36
3.6. Distribuição celular de β -glicosidases.....	37

3.7. Purificação enzimática.....	38
3.7.1. Purificação das β -xilosidases miceliais.....	38
3.7.2. Purificação das β -glucosidases miceliais.....	38
3.7.3. Purificação do heteroagregado extracelular.....	39
3.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	39
3.9. Filtração em gel.....	40
3.10. Determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$	41
3.11. Métodos analíticos.....	41
3.11.1. Remoção de glucanas N-ligadas à Asparagina.....	41
3.11.2. Análise preliminar da glicosilação.....	42
3.11.3. Análise preliminar do núcleo protéico.....	43
3.12. Reprodutibilidade dos resultados.....	44
4. RESULTADOS.....	46
4.1. β -xilosidases miceliais.....	46
4.1.1. Avaliação fisiológica preliminar.....	46
4.1.1.1. A relação entre isozima produzida com o pH e a fonte de carbono.....	46
4.1.2. Exploração dos efeitos da deglicosilação sobre as β -xilosidases de <i>A. versicolor</i>	53
4.1.2.1. Avaliação eletroforética.....	53
4.1.2.2. Composição e estrutura das glucanas covalentemente ligadas à Asparagina.....	58
4.1.3. Avaliação bioquímica.....	62
4.1.3.1. Influências no pH e temperatura.....	62
4.1.3.2. Influências sobre o comportamento diante de diferentes sais de íons metálicos.....	66
4.1.4. Efeito da deglicosilação por EndoH sobre os parâmetros cinéticos para hidrólise de pNP-xil.....	68
4.2. β -glucosidases miceliais.....	70
4.2.1. Avaliação fisiológica preliminar.....	70
4.2.2. Exploração dos efeitos da deglicosilação sobre β -glucosidases de <i>A. versicolor</i>	75
4.2.2.1. Avaliação eletroforética.....	75
4.2.2.2. Composição e estrutura das glucanas covalentemente ligadas à Asparagina.....	77

4.2.3. Avaliação bioquímica.....	80
4.2.3.1. Influências da deglicosilação sobre o comportamento frente a pH e temperatura.....	80
4.2.3.2. Efeito da deglicosilação sobre o comportamento frente a diferentes sais de íons metálicos.....	86
4.2.4. Parâmetros cinéticos.....	90
4.2.5. Sinergismo entre glicoformas.....	92
4.3. Componente extracelular da atividade β -glicosidásica.....	95
4.3.1. Co-purificação de fosfatase e β -glicosidase e confirmação de heteroagregação.....	95
4.3.2. Caracterização bioquímica.....	102
4.3.2.1. Efeitos do pH e temperatura.....	102
4.3.2.2. Efeito de sais de íons metálicos, EDTA e β -mercaptoetanol.....	106
4.3.2.3. Especificidade enzimática.....	110
4.3.3. Adsorção em farelo de trigo.....	113
4.3.4. Parâmetros cinéticos.....	116
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	124
5.1. A multiplicidade em <i>Aspergillus versicolor</i> – a influência da glicosilação e hipótese sobre os componentes dos carboidratos covalentemente ligados à Asn.....	124
5.2. O novo tipo de sinergismo – glicoformas de uma mesma enzima atuando cooperativamente.....	127
5.3. O componente extracelular – β -glicosidase inespecífica agregada com fosfatase ácida.....	128
5.4. Adsorção de β -glicosidase a farelo de trigo dependente de fosfatase ácida agregada.....	131
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	134
7. ANEXOS.....	149
7.1. ESTRUTURAS DE GLUCANAS N-LIGADAS.....	150
7.2. SUBSTRATOS DE ENDO-GLICANASES.....	152
7.3. N-GLUCANAS QUE SE LIGAM A ConA Sepharose.....	153
7.4. OUTRAS ESTRUTURAS QUE ADSORVEM A ConA.....	154
7.5. PURIFICAÇÃO – β -glucosidases.....	155
β -xilosidases.....	156

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1-pH dos meios de transferência após 10h de cultivo do microorganismo.....	50
Tabela 2-pH dos meios de cultivo após 72h de crescimento micelial.....	50
Tabela 3-Efeito de íons sobre β -xilosidases após tratamento com EndoH.....	67
Tabela 4-Efeito da deglicosilação por EndoH sobre parâmetros cinéticos para hidrólise de pNP-xil das β -xilosidases de <i>A.versicolor</i>	69
Tabela 5-Efeito de íons sobre as β -glucosidases de <i>A. versicolor</i>	87
Tabela 6-Parâmetros cinéticos das β -glucosidases I e II.....	91
Tabela 7-Copurificação de β -glicosidase e fosfatase extracelulares.....	99
Tabela 8-Efeito de íons sobre β -glicosidase e fosfatase extracelulares agregadas.....	107
Tabela 9-Efeito de CoCl_2 sobre a agregação de β -glicosidase e fosfatase.....	109
Tabela 10-Especificidade das enzimas co-purificadas extracelulares.....	111

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Zimogramas dos extratos miceliais de <i>Aspergillus versicolor</i> cultivado em xilana ou xilose.....	49
Figura 2. pH ótimo dos extratos miceliais de <i>Aspergillus versicolor</i> oriundo dos meios de transferência.....	51
Figura 3. Esquemas dos zimogramas de extratos miceliais oriundos dos materiais transferidos para meios tamponados.....	52
Figura 4. PAGE das β -xilosidases purificadas e tratadas com EndoH ou PNGaseF.....	55
Figura 5. SDS-PAGE das β -xilosidases purificadas antes e depois de deglicosilação por PNGaseF.....	56
Figura 6. Mapas trípticos das β -xilosidases miceliais de <i>A. versicolor</i> , antes e depois de deglicosilação por PNGaseF.....	57
Figura 7. Cromatografia em camada delgada dos produtos de hidrólise ácida das glucanas componentes da glicosilação de β -xilosidase de xilana e xilose.....	60
Figura 8. Cromatografia em ConA Sepharose das β -xilosidases induzidas por xilana e por xilose, antes e depois de deglicosilação por EndoH.....	61
Figura 9. Efeito da temperatura sobre as β -xilosidases deglicosiladas.....	63
Figura 10. Estabilidade térmica das duas β -xilosidases deglicosiladas por EndoH.....	64
Figura 11. Efeito do pH sobre as β -xilosidases deglicosiladas por EndoH.....	65
Figura 12. Zimogramas dos extratos miceliais de <i>A. versicolor</i> crescido em farelo de trigo antes do tratamento de Mandels.....	72
Figura 13. Perfis cromatográficos, em DEAE-celulose, das proteínas eluídas de B1.....	73
Figura 14. Zimogramas esquematizados dos extratos de micélios de <i>A. versicolor</i> obtidos de diversas fontes de carbono oferecidas para crescimento.....	74
Figura 15. PAGE e SDS-PAGE das β -glucosidases purificadas e seus mapas trípticos, não deglicosiladas e deglicosiladas por PNGaseF ou EndoH.....	76
Figura 16. Perfis cromatográficos das β -glucosidases I e II em Con A-Sepharose.....	78
Figura 17. Cromatografia em camada delgada dos produtos de hidrólise ácida das glicanas N-ligadas das β -glucosidases I e II.....	79
Figura 18. pH ótimo das β -glucosidases I e II, antes e depois de deglicosilação por EndoH e PNGaseF.....	82

Figura19. Temperatura ótima de β -glucosidase I e , antes e depois de deglicosilação por EndoH e PNGaseF.....	83
Figura 20. Estabilidade térmica das β -glucosidases I e II a 45°C, antes e depois de deglicosilação por EndoH e PNGaseF.....	84
Figura21. pH ótimo das β -glucosidases I e II, após incubação a 45°C por 30min., deglicosiladas ou não.....	85
Figura22. Estabilidade das β -glucosidases I e II glicosiladas frente a diferentes concentrações dos sais de íons metálicos ZnCl ₂ , AlCl ₃ e CuSO ₄	88
Figura23. Estabilidade das β -glucosidases I e II deglicosiladas por PNGaseF frente a diferentes concentrações dos sais de íons metálicos AlCl ₃ , CuSO ₄ , FeSO ₄ e AgNO ₃	89
Figura 24. Sinergismo sobre celobiose dependente do pH e da glicosilação.....	93
Figura 25. Sinergismo sobre celooligossacarídeos dependente de glicosilação.....	94
Fig. 26. Zimogramas do filtrado extracelular de culturas em meio líquido de <i>A. versicolor</i> crescido em diferentes fontes de carbono.....	96
Fig. 27. Co-purificação de fosfatase e β -glucosidase em DEAE-Sephacel e Octyl-Sephacel.....	100
Fig. 28. Eletroforeses das enzimas extracelulares co-purificadas em PAGE e SDS-PAGE.....	101
Fig. 29. Temperatura ótima das enzimas extracelulares em agregação e após desagregação.....	103
Fig. 30. Estabilidade térmica a 45°C e 55°C, antes e depois da desagregação.....	104
Fig. 31. pH ótimo das atividades β -glucosidásica e fosfatásica, agregadas e desagregadas.....	105
Fig. 32. Determinação da concentração ótima de CoCl ₂ para máxima atividade fosfatásica ácida extracelular de <i>A. versicolor</i> crescido em farelo de trigo.....	108
Fig. 33. TLC dos produtos de hidrólise enzimática gerados pela atividade β -glucosidásica extracelular de <i>Aspergillus versicolor</i> sobre Avicel e farelo de trigo.....	112
Fig. 34. Adsorção das enzimas do agregado em farelo de trigo.....	114
Fig. 35. Inibição da atividade β -glucosidásica em heteroagregado por farelo de trigo..	115
Fig. 36. Estudo cinético dos componentes β -glucosidásico e fosfatásico, enquanto agregados, sobre seus respectivos substratos.....	118

Fig. 37. Atividades glicosidásica e fosfatásica tomadas após desagregação, no pH ótimo de cada componente desagregado.....	119
Fig. 38. Efeito de fosfato sobre a atividade celobiásica.....	120
Fig. 39. Atividade fosfatásica agregada sobre farelo de trigo.....	121
Fig. 40. Atividades fosfatásica e β -glicosidásico após desagregação, em presença dos substratos do respectivo componente anteriormente agregado.....	122

ABREVIATURAS

CM-celulose- carboximetil-celulose
 ConA- Concanavalina-A Sepharose
 EDTA-ácido etilenodiaminotetracético
 EndoH- *Endo-β-N-acetylglucosaminidase H*; EC 3.2.1.96
 FPLC- *Fast Protein Liquid Chromatographic*
 G- glicose
 IEF-PAGE- *Isoelectric focusing - polyacrylamide gel electrophoresis*
 NAcGlc- N-acetil-glucosamina
 oNP-gal- *o*-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo
 PAGE- *Polyacrylamide gel electrophoresis*
 PNGaseF- *Peptide-N-glycosidase F*; EC 3.2.1.18
 pNP-ara- *p*-nitrofenil-α-L-arabinopiranosídeo
 pNP-fuco- *p*-nitrofenil-β-D-fucopiranosídeo
 pNP-glu- *p*-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo
 pNP-P- *p*-nitrofenil-fosfato
 pNP-xil- *p*-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo
 pNP-α-glu- *p*-nitrofenil-α-D-glucopiranosídeo
 SDS-PAGE- *Sodium dodecil sulphate - polyacrylamide gel electrophoresis*
 TBS- *Tris-buffered saline*
 TCA- *Tricloroacetic acid*
 TLC- *Thin layer chromatography*
 X- xilose
 XA- atividade β-xilosidásica induzida por xilana
 XO- atividade β-xilosidásica induzida por xilose
 XX- atividade β-xilosidásica induzida por xilose e xilana
 α e β- constantes cinéticas que caracterizam mecanismos de inibição mista:

$$\frac{1}{\Delta_{\text{intercept}}} = \frac{\alpha K_I V_{\text{MAX}}}{(1 - \beta)} \cdot \frac{1}{[I]} + \frac{\beta V_{\text{MAX}}}{(1 - \beta)}$$

 β-GI- β-glucosidase I
 β-GII- β-glucosidase II

RESUMO

Este trabalho procurou avaliar algumas glicoformas, encontradas em *Aspergillus versicolor*, envolvidas com o processo de degradação de polissacarídeos da parede celular vegetal.

Duas β -xilosidases foram purificadas por meio de DEAE-celulose e precipitação com sulfato de amônia. Ambas mostraram-se enzimas que, quando deglicosiladas por PNGaseF, apresentaram mesmos mapas trípticos. A glicosilação sensível a EndoH mostrou-se importante para a manifestação de diferenças bioquímicas relacionadas às interações com ambiente eletrolítico adjacente, visto as mudanças das curvas de pH e alterações de comportamento frente a sais de íons metálicos registradas. A glicosilação também mostrou-se relevante a manutenção do funcionamento das enzimas, uma vez que deglicosilação por PNGaseF eliminou qualquer atividade remanescente. Também foi verificado que as diferentes formas glicosiladas periplásmicas são produzidas em meios distintos (xilana e xilose), cujos pH finais corresponderam aos pH das enzimas encontradas. Por meio de zimogramas, verificou-se que estas não eram produzidas de imediato, mas selecionadas ao longo do tempo de cultivo. Esta seleção foi inicialmente independente do pH, visto este, mesmo tamponado, ser corrigido pelo fungo, de modo a se apresentar, ao final de 48h, correlato com o da enzima selecionada. Exame cromatográfico em Concanavalina-A das enzimas deglicosiladas por EndoH mostraram que a oriunda de xilana tem aporte maior de ramificações biantenárias, que são ricas em galactose. Ambas apresentaram mapas trípticos iguais. A β -xilosidase induzida por xilana apresentou proporções de manose, galactose e glucose iguais a 69,68 : 30,25 : 0,056 %, respectivamente, enquanto que β -xilosidase induzida por xilose apresentou proporções iguais a 85,35 : 14,54 : 0,094%, respectivamente, resultado que corrobora com a resultado anterior.

Duas β -glucosidases de superfície micelial foram purificadas por meio de DEAE-Sephacel e DEAE-celulose. Ambas mostraram-se mais semelhantes entre si que as β -xilosidases, e independentes de fonte de carbono ou pH. No entanto, apresentaram diferenças frente à inibição por celobiose (acentuada a partir de 10mM para β -glucosidase I e 20mM para β -glucosidase II) e, embora sutis, a pH. Após serem submetidas a 45 °C por 30min (temperatura que induziu segunda conformação estável) mostraram curvas de pH muito distintas, que foram eliminadas nas enzimas submetidas ao mesmo experimento após deglicosilação por PNGaseF. Ambas apresentaram mapas trípticos iguais. A β -glucosidase I mostrou-se constituída de Man:Gal:Glu em proporções iguais a 78,36%:21,61%:0,033% do carboidrato total, respectivamente, e a β -glucosidase II, Man:Gal:Glu iguais a 83,59%:16,38%:0,028%, respectivamente. Ambas também apresentaram sinergismo quando juntas. Sobre celobiose, foi verificado apenas em pH acima de 5,5. Sobre celooligossacarídeos, manifestou-se em pH 5,25. A β -glucosidase I foi menos ativa que a β -glucosidase II quando em ausência de glucose e celobiose na solução de reação inicial, situação na qual o contrário foi verdadeiro. O sinergismo foi drasticamente eliminado após deglicosilação por PNGaseF. Não se sabe se este resultado foi oriundo de mudanças cinéticas provocadas pela deglicosilação ou de uma possível eliminação de agregação anteriormente existente entre glicosiladas. Curvas de absorvância entre 200 e 300nm não apontaram existência de interação entre as duas enzimas, glicosiladas ou deglicosiladas.

O componente β -glicosidásico extracelular foi purificado por meio de DEAE-Sephacel e Octyl-Sepharose e se revelou um heteroagregado de fosfatase ácida com β -glicosidase, que se mostrou estável e ativo em ampla gama de temperaturas e pH, com

ótimos de 55°C e 5,5, respectivamente. Entretanto, os perfis das curvas foram distintos entre as enzimas componentes. Somente concentrações superiores a 0,8mM CoCl₂ apresentaram efeito desagregador, podendo ser empregadas em conjunto com DEAE-celulose para purificação das enzimas isoladas. Quando separadas, fosfatase mostrou-se 260% mais ativa e β-glicosidase, 50% menos ativa. Nesta condição, as faixas de pH se restringiram, acidificando-se, localizando-se entre pH 4,0 e 5,5. Aparentemente, a agregação reforça a atividade celobiásica. A fosfatase foi ativa sobre farelo de trigo e fitato de sódio e adsorveu fortemente em farelo de trigo. A β-glicosidase apresentou atividade sobre farelo de trigo, xilana e Avicel (liberando apenas glicose desta última), revelando-se enzima com atividade celobiohidrolásica inespecífica, embora ávida por celobiose. As atividades de cada enzima foram determinadas como oriundas de um único sítio catalítico. β-glicosidase não foi seqüestrada por farelo de trigo quando desagregada, mas adsorveu no material quando agregada ou reagregada à fosfatase. O seqüestro por farelo de trigo, aparentemente, deveu-se a interações entre sítio catalítico da fosfatase e o substrato de adsorção.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A parede celular vegetal consiste, principalmente, de polissacarídeos tais como celulose, hemiceluloses e pectina, os quais, juntos com proteínas e lignina, formam estrutura rígida e complexa. Estima-se que, aproximadamente, 4.10^9 toneladas de celulose são formadas anualmente (Aro et al., 2005). Esta apreciável quantidade, contudo, não se acumula sobre a terra graças a ação de bactérias e fungos, capazes de degradar com eficiência esses materiais, reciclando carbono nos ecossistemas.

Degradação de componentes da parede celular vegetal é um processo complexo que inclui a participação de grande número de enzimas, tanto intra quanto extracelulares. Em ambiente terrestre, estas proteínas são, principalmente, de origem fúngica, enquanto que, em águas, são bacterianas (Aro et al., 2005). Esta separação, aparentemente, é fruto do histórico de colonização terrestre por fungos em conjunto com plantas, em associações conhecidas como micorrizas, que garantiam à hifa proteção contra dessecação e radiação, em conjunto com a capacidade do crescimento micelial de explorar ambientes aerados e particulados ou penetrar superfícies rígidas, tais como as paredes vegetais de plantas terrestres (de Boer et al., 2005).

Fungos filamentosos possuem um rico conjunto de enzimas capazes de atacar os componentes da parede celular vegetal. Por se tratarem de materiais muito refratários ao ataque químico ou enzimático, tais enzimas são tidas como potentes catalisadores, produzindo acelerações de reação na ordem de 10^{17} vezes.

Além de provirem o fungo com carboidrato reduzido para obtenção de energia e matéria-prima para o anabolismo, acredita-se que estas enzimas contribuam para a patogenicidade de fungos parasitas de plantas, permitindo a invasão da célula vegetal (ten Have et al., 2002). Proteínas que degradam carboidratos poliméricos também têm

influência sobre a habilidade de fungos antagonistas de atacar microorganismos alvos através da hidrólise da parede celular do hospedeiro (Inglis e Kawchuk, 2002).

Muitas dessas proteínas têm recebido considerável atenção devido ao seu potencial de aplicação na indústria têxtil, de alimentos, ração, papel, polpa e sucos. Por exemplo, a clarificação e incremento de extração de polpas por enzimas xilanolíticas, clarificação de sucos por pectinases, bioclarificação de produtos têxteis por celulases, amaciamento de tecidos por xilanases e xilosidases e branqueamento de papel por enzimas hemicelulolíticas encontram-se em uso ou em avaliação para aplicação (Bhat e Bhat, 1997; de Vries et al., 2001; Buchert et al., 1998; Penttilä et al., 2003; aGalante et al., 1998; bGalante et al., 1998).

Outro importante alvo de estudos é o uso de enzimas lignocelulolíticas para conversão de biomassa vegetal em açúcares fermentescíveis, que poderiam ser empregados na produção de produtos químicos e combustíveis. No entanto, produção heteróloga de celulosomos, agregados de enzimas celulolíticas produzidos por bactérias, não se mostrou eficaz para conversão de matéria vegetal em etanol ou metanol, devido a complicações com a estabilização do complexo enzimático e de falhas nos nós metabólicos dos organismos empregados (Lynd et al, 2002). Aparentemente, engenharia fisiológica – atuação em pontos de regulação de fluxos metabólicos em organismos celulolíticos capazes de realizar algum tipo de fermentação de interesse (Desvaux, 2005) – ou culturas mistas são caminhos para se alcançar tais fins.

Esses estudos empregaram, em sua maioria, bactérias. Um dos grandes desafios no uso de fungos, fortes decompositores de compostos vegetais, nesta tecnologia em desenvolvimento, encontra-se na solução de problemas referentes ao consumo de

açúcares produzidos e na capacidade de degradação inferior observada quando se utilizam coquetéis enzimáticos montados artificialmente. Respostas para estes problemas encontram-se na interação entre organismos da microbiota, no papel destas enzimas no desenvolvimento do fungo, no fluxo de metabólitos e na compreensão da infinidade de isozimas ou isoformas de um mesmo componente catalítico. Espera-se que o conhecimento de tais fatores permita a reprodução, ao menos em parte, da eficiência de ciclagem observada na natureza, conquista que possibilitaria o uso do abundante resíduo agroindustrial para produção de formas alternativas de combustível, necessárias para suplantação do petróleo e manipulação segura e eficaz dos processos de decomposição, fator preponderante na relação carbono fixado/carbono liberado em ecossistemas.

1.1. Polissacarídeos da parede celular vegetal

Polissacarídeos da parede celular vegetal são os compostos orgânicos mais abundantes encontrados na natureza. Perfazem, aproximadamente, 90% desta parede celular e podem ser divididos em três grupos: celulose, hemiceluloses e pectina (McNeill et al., 1984). Destes, a celulose, polissacarídeo insolúvel, representa o constituinte em maior quantidade, enquanto que as hemiceluloses, mais heterogêneas, o constituinte com a segunda maior representação. O polímero de hemicelulose mais abundante em cereais e madeiras “duras” chama-se xilana. Menos abundante, o grupo de galacto(gluco)mananas é encontrado em madeiras tanto macias como duras, sendo as galactoglucomananas predominantes em macias, enquanto as glucomananas predominantes em duras (de Vries et al., 2001). Xiloglucanas abundam em dicotiledôneas e interagem com as redes de microfibrilas de celulose através de pontes

de hidrogênio, contribuindo para a integridade destas estruturas (Carpita et al., 1993). Pectinas formam outro grupo de heteropolissacarídeos e são compostas por resíduos de ácido D-galacturônico α -1,4 ligados. Resíduos de L-ramnose α -1,2 ligados interrompem a cadeia em áreas de ramificação, onde L-arabinose e D-galactose estão inseridas. Já o ácido ferúlico somente está presente em algumas poucas pectinas, tais como as de maçã (de Vries et al., 2001).

1.2. Características estruturais dos componentes majoritários celulolítico e hemicelulolíticos

1.2.1. Características estruturais da celulose e xiloglucana

Celulose, composto refratário de baixa densidade, consiste de cadeias lineares de D-glucopirranose β -1,4 ligadas, atreladas por pontes de hidrogênio em estrutura cristalina, chamada microfibrila. Devido à característica da ligação, a unidade de repetição estrutural é celobiose, e não glucose, como em outros polissacarídeos, dentre eles calose e amido (Desvaux, 2005). Fibras celulósicas compreendem grupos com quantidades que podem superar 250 cadeias de glucose, permeadas e interligadas por hemiceluloses (Carpita et al., 1993). Em adição à estrutura cristalina, celulose contém áreas amorfas, não cristalinas, onde a estrutura ordenada inexiste. Esta composição, somada às irregularidades observadas nas cadeias cristalinas, tal como curvaturas que aumentam sua superfície, atribuem característica paracristalina à estrutura (Desvaux, 2005). A cadeia de glucana pode variar em tamanho, apresentando 25.000 unidades de glucose ou mais, em suas formas insolúveis, ou valores de polimerização (DP) entre 2 e 7, em suas formas solúveis, conhecidas como celodextrinas (Pereira et al., 1988). As quantidades de celulose cristalina e amorfa variam de acordo com a origem.

Dois maiores tipos de xiloglucanas foram identificados em paredes celulares vegetais. Xiloglucana na variante XXXG consiste de grupos de unidades repetidas de três D-glucopiranoses β -1,4 ligadas, substituídas por D-xilopiranosose por meio de uma ligação α -1,6 e separados por resíduo de glucose não substituído. Em xiloglucanas do tipo XXGG, dois resíduos de glucose substituídas por xilose estão separados por dois resíduos de glucose não substituídos (Vincken et al., 1997). Os resíduos de xilose em xiloglucanas podem ser substituídos com α -1,2-L-fucopiranosose- β -1,2-D-galactopiranosose e α -1,2-L-galactopiranosose- β -1,2-D-galactopiranosose (Hisamatsu et al., 1992). Grupos acetil O-ligados e L-arabinofuranose também são detectados em pontos das cadeias de xiloglucanas (de Vries et al., 2001; Maruyama et al., 1996).

Xiloglucanas estão fortemente associadas à celulose e contribuem para sua integridade estrutural. Atribui-se papel de regulação da extensão da parede celular vegetal a estes polissacarídeos (McCann e Roberts, 1991). Estabelecem interações cruzadas com as microfibrilas de celulose e, assim, criam a estrutura rígida peculiar de parede celular.

1.2.2. Características estruturais da xilana

As estruturas das xilanas encontradas em paredes celulares vegetais diferem, dependendo de sua origem. Entretanto, todas contêm um esqueleto de D-xiloses β -1,4 ligadas. Xilose, ácido glucurônico, arabinose, galactose, ácido ferúlico e grupos acetil são componentes que podem ser encontrados ligados em diferentes combinações ao esqueleto principal de xiloses (Ebringerová et al., 2000). Xilanas encontradas em cereais e plantas anuais têm grande quantidade de L-arabinoses, sendo chamadas de

arabinoxilanas, enquanto que xilanas de madeiras duras possuem muitos resíduos de ácido D-glucurônico, sendo nomeadas glucuroxilanas (de Vries, 2001).

Arabinose encontra-se conectada ao esqueleto principal por ligações α -1,2 ou α -1,3 como resíduo único ou curtas cadeias laterais, que também podem conter D-xilose β -1,2 ligada, e galactose, unida por ligação β -1,5 à arabinose ou β -1,4 à xilose da ramificação. Grupos acetil podem ser encontrados ligados ao O-2 ou O-3 dos resíduos de xilose do esqueleto principal, mas não há um padrão aparente de acetilação entre xilanas de diferentes origens. Ácido glucurônico e seu 4-O-metil éter são ligados ao esqueleto de xilanas por meio de ligação α -1,2, enquanto que resíduos aromáticos (feruloil e *p*-coumaroil) têm sido reportados somente em ligações com O-5 de arabinoses terminais (de Vries, 2001). Como consequência, xilanas são um grupo de polissacarídeos muito heterogêneos.

1.2.3. Características estruturais das galacto(gluco)mananas

Galactomananas e galactoglucomananas formam um segundo grupo de estruturas hemicelulolíticas presentes nas paredes celulares vegetais. Em Gimnospermas, compreendem a maior fração hemicelulolítica (Aspinall, 1980). São, também, encontradas em leguminosas, onde podem alcançar 38% do peso seco de sementes (Dea e Morrison, 1975). Compreendem resíduos de D-manose β -1,4 ligadas, que podem estar substituídas por resíduos de D-galactose por meio de ligação α -1,6. As proporções de manose e galactose são variáveis. D-Glucose α -1,6 ligada também compõe o esqueleto de galactoglucomananas. Galactoglucomananas solúveis contêm maiores quantidades de galactose que as formas insolúveis, em adição a grupos acetil

ligados à cadeia principal (de Vries et al, 2001). A esterificação com acetila pode ocupar 20 a 30% do esqueleto principal do polissacarídeo (Lindberg et al., 1973).

1.3. Biodegradação de celulose e hemiceluloses

1.3.1. Degradação de celulose e xiloglucanas

Quatro classes majoritárias de atividades enzimáticas estão envolvidas na biodegradação da celulose. Endoglucanases (EC 3.2.1.4), que hidrolisam regiões internas à cadeia celulolítica, principalmente em regiões amorfas, gerando celooligossacarídeos; celobioidrolases (EC 3.2.1.91), que removem celobiose das extremidades do polissacarídeo, incluindo a forma cristalina; exoglucanases (EC 3.2.1.71), que liberam glucose de extremidades não redutoras, tanto da celulose quanto dos celooligossacarídeos (de Vries et al., 2001; Aro et al., 2005); e β -glucosidases (EC 3.2.1.21), as quais hidrolisam celobiose e celooligossacarídeos curtos a glucose, removendo inibição por produto das outras enzimas e gerando fonte de carbono facilmente metabolizável.

Embora alguns sistemas celulolíticos possam apresentar celobiose-oxidase e/ou celobiose-desidrogenase, que também atuam na remoção da inibição exercida por celobiose sobre exo e endoglucanases (Eriksson *et al.*, 1974; Igarashi *et al.*, 2003; Wood, 1991), somente as β -glucosidases hidrolisam o dissacarídeo, produzindo glicose para posterior conversão biológica.

Em adição às celulases clássicas, foi descrito recentemente “swollenin” (SWOI), em *Trichoderma reesei*, com seqüência de aminoácidos semelhantes às das expansinas de plantas, que perturbam a estrutura das fibras celulolíticas, tornando-as mais

acessíveis a outras enzimas, sem exercer atividade catalítica (Saloheimo et al., 2002). Mostrou-se que SWOI tem função semelhante à dessas enzimas.

Endoglucanases e β -glucosidases também têm sido reportadas como capazes de degradar xiloglucanas. Endoglucanase de *Aspergillus aculeatus* foi descrita como específica para xiloglucanas substituídas, não sendo hábil para degradar celulose (Pauly et al., 1999).

1.3.2. Degradação de xilana

A degradação do esqueleto de xilana depende da ação de duas classes enzimáticas principais. Endoxilanases (EC 3.2.1.8), capazes de degradar xilana aleatoriamente em curtos oligossacarídeos, os quais são posteriormente hidrolisados a xilose pela ação de β -xilosidases (EC 3.2.1.37). A atividade de endoxilanases depende, fundamentalmente, do grau de substituição do esqueleto xilanolítico (de Vries et al., 2001). Tipos de endoxilanases variam com o tipo de seqüência de xiloses substituídas que atacam. β -Xilosidases de *Aspergillus* são altamente específicas para xilooligosacarídeos curtos não substituídos e apresentam mecanismo hidrolítico conhecido como retentor (de Vries et al., 2001). Enzimas acessórias são requeridas para a completa degradação de xilana substituída. Estas incluem α -glucuronidases (EC 3.2.1.139) e acetil xilana estearases (EC 3.1.1.72), α -arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), ácido ferúlico estearases (EC 3.1.1.73) e *p*-coumaril estearases (EC 3.1.1.-).

1.3.3. Degradação de galacto(gluco)mananas

Degradação de galacto(gluco)mananas depende da ação de β -endomananases (EC 3.2.1.78) e β -manosidases (EC 3.2.1.25). Estas enzimas são comumente produzidas

por *Aspergillus* spp. e suas atividades catalíticas dependem das proporções de manose/glucose e do grau de substituição da cadeia principal das galacto(gluco)mananas. β -Endomananases são endoidrolases verdadeiras, mais ativas em esqueletos com baixo grau de substituição, enquanto que a presença de galactoses na cadeia principal atrapalha suas atividades (McCleary e Mathesen, 1983). β -Manosidases são enzimas que liberam manose das extremidades não redutoras de manooligossacarídeos. Galactoses reduzem suas atividades. Completa hidrólise de galacto(gluco)mananas, da mesma forma que para xilanas, depende de enzimas acessórias, neste caso β -glucosidases e α -galactosidases. β -Endomananases e β -manosidases de *Aspergillus*, estudadas em maiores detalhes, também exibiram unicamente mecanismo retentor (de Vries et al., 2001).

1.4. Multiplicidade de formas de glicosil-hidrolases, em especial as de Aspergillus, e a hipótese de glicosilação diferencial induzida pela fonte de carbono

Produção de múltiplos componentes enzimáticos tem sido descrita para inúmeros fungos, mesmo filogeneticamente distantes, fato este que pode apontar grande importância fisiológica à multiplicidade enzimática (Bath et al., 1999; de Vries et al., 2001). Os fungos mais bem estudados quanto a estes aspectos são *T. reesei*, *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. A importância deste evento tão abrangente, no entanto, não está clara. Mesmo o número de componentes e suas caracterizações, fundamentais para a compreensão deste fato, estão distantes de serem conhecidos integralmente para um único fungo (de Vries et al., 2001).

O conhecimento da existência de multiplicidade de componentes enzimáticos envolvidos em processos de sacarificação de material celulosídico e hemicelulosídico é

antigo. Na década de 80, mensuração de atividade de componentes resolvidos em PAGE mostrou que, dentre as enzimas envolvidas, β -glucosidases de *Aspergillus phoenicis* são abundantes quanto ao número de isozimas e diversas em suas especificidades (Khan et al., 1985). Neste mesmo trabalho, foi descrito que as proporções de cada componente variaram quando o microfungo foi crescido em conjunto com *Trichoderma reesei*, e que celobiose foi substrato preferencial para mensuração de capacidade de sacarificação de misturas enzimáticas. Outras investigações iniciais sobre multiplicidade são as avaliações das celobioidrolases de *Trichoderma viride* (Gum e Brown, 1977) e *T. reesei* (Nummi et al., 1983) e endoglucanases de *Talaromyces emersonii* (Moloney et al., 1985), entre outros exemplos.

Mais recentemente, 45 isolados de *A. terreus* revelaram não somente diferenças eletroforéticas para suas enzimas, como também ausência de endoglucanase I para muitos isolados (Singh et al., 1996). Três exoglucanases foram isoladas de *A. nidulans*, mas somente uma foi estudada em detalhes. Diferiram significativamente em massa molecular e afinidade a celulose (Bagga et al., 1990). Da mesma forma, celobioidrolases de *A. ficuum* (Hayashida et al., 1988) apresentaram massas moleculares distintas – 128 e 50kDa – mas as duas isoladas de *A. terreus* (Ivanova et al., 1983) foram similares – 28,5 e 29,5kDa – indicando grande variação entre microorganismos relativamente próximos, ou mesmo dentre isolados de um mesmo microorganismo.

No início da década de 90, trabalho de triagem de atividades enzimáticas no gênero *Aspergillus* mostrou, por meio de separação eletroforética, a presença de constância na amplitude de variação do número de isozimas de endoglucanase e β -glucosidase, o qual oscilou de 1 a 3 na maioria das espécies observadas. Todas apresentaram ótimos de pH próximos a 5,0 e, em geral, redução completa de atividade

quando em presença de Hg^{+2} . No entanto, a redução foi apenas parcial frente a Ca^{+2} e Co^{+2} . Alterações de mobilidade eletroforética também foram descritas para as enzimas algumas enzimas tratadas com Hg^{+2} (Sharma et al., 1991).

Com relação à distribuição de β -glucosidases em culturas de *Aspergillus*, a variação também é grande. Em *A. kawachii*, três enzimas foram identificadas, sendo duas intracelulares e uma extracelular, todas oriundas de um mesmo gene e diferenciadas por processos de modificação pós-traducionais, dos quais a glicosilação foi o mais importante (Iwashita et al., 1998). Entretanto, a proporção de cada componente mostrou-se variável frente às condições de cultivo, uma vez que, em meios sólidos, o componente extracelular foi mais abundante (Iwashita et al., 1998). Em segundo lugar, foi verificado para este mesmo fungo que a enzima extracelular era aprisionada na superfície micelial e liberada tão somente com um oligossacarídeo derivado da parede celular e produzido pelo próprio fungo (Iwashita et al., 1998).

Em trabalho muito mais antigo, desenvolvido na década de 60, foi descrita, igualmente, a distribuição de uma mesma β -glucosidase em conídios de *Aspergillus oryzae*, tanto dormentes quanto em germinação. Observou-se que, em ambos, a maior quantidade de enzima era localizada na superfície da estrutura conidial, mas que as proporções de enzima liberada aumentavam durante a germinação. Detergentes, EDTA, uréia, sais e β -1,3-glucanase, não foram capazes de remover a enzima de superfície com eficiência, mas sonicação sim (Horikoshi e Ikeda, 1965).

Já para os componentes extracelulares celulásicos, muitos fungos sem relação filogenética direta apresentaram entidades enzimáticas únicas, fato que contrasta com os múltiplos componentes miceliais (Bhat e Bhat, 1997). Contudo, agregados enzimáticos foram reportados para *T. reesei*, os quais possuíram múltiplas atividades (Sprey e

Lambert, 1983). Para as enzimas envolvidas na degradação de galacto(gluco)mananas, existem poucos dados, sendo que somente um gene para β -manosidases de *A. niger* (Ademark et al., 1999) e *A. aculeatus* (Takada et al., 1999) e um para β -endomananase de *A. aculeatus* (Christgau et al., 1994) foram relatados.

Com relação às enzimas degradadoras de hemiceluloses, endoxilanases de *Aspergillus* apresentaram massas moleculares ou pIs ótimos muito semelhantes, mas diferiram em seus pIs, que variaram de 3,5 a 9,0, e especificidade. Em vários fungos deste gênero, três componentes endoxilanásicos são normalmente descritos (de Vries et al., 2001). Em *A. awamori*, as especificidades dos três quanto à xilana com diferentes graus de substituição foram distintos (Kormelink et al., 1993). As famílias destas enzimas, muitas vezes, são diferentes, podendo estar inclusas nas glicosil-hidrolases 10 ou 11 (de Vries et al., 2001).

Estudos de multiplicidade mais detalhados mostram que esta pode, muitas vezes, chegar a extremos. 15 xilanases extracelulares foram relatadas para *A. niger* (Biely et al., 1985), e 13 para *T. viride* (Biely et al., 1985). Esta multiplicidade pode ser resultado de redundância genética, mas casos de modificação pós-traducional diferencial têm sido reportados (Biely, 1985).

Glicosilação é, geralmente, observada como uma das modificações pós-traducionais mais relevantes em frequência e proporção relativa. Consiste, normalmente, de coleção de variantes nas quais conjuntos de diferentes oligossacarídeos são associados com diferentes sítios de glicosilação (N-ligados, quando o sítio de inserção é um grupo amina livre de asparaginas acompanhadas por serinas e treoninas – o chamado sequon – ou O-ligadas, quando ligadas a grupos carboxilas livres localizados em áreas ricas em serinas, treoninas e prolinas). A significância desta diversidade de

glicoformas é assunto de muito debate. Em particular, é muito pouco conhecido para muitas enzimas como e quando estruturas de oligossacarídeos associadas com uma única população de glicoformas podem modificar a atividade funcional de uma proteína. Trabalhos apontam para alterações cinéticas e de características dependentes da interação com o ambiente eletrolítico – dinâmica molecular (Rudd et al., 1994). Em adição, diversidade de glicoformas pode fornecer um espectro de atividade celular, contribuindo para a regulação fina de processos metabólicos e de respostas a variações ambientais. (Rudd et al., 1994). (Ver anexos para tipos estruturais de glicosilação N-ligada e especificidade da cromatografia de afinidade em ConA-Sepharose e enzimas deglicosiladoras para N-glicosilação.)

Recentemente, foi verificado que *A. versicolor* é capaz de produzir duas formas de β -xilosidases, as quais se mostraram dependentes da fonte de carbono fornecida para crescimento do fungo. (Andrade et al., 2004). A dependência do substrato – mais fácil de controlar em culturas descontínuas - e não do pH, amônia ou temperatura para a produção de formas distintas – tal como identificados para outras cepas de *Aspergillus* (ver Biely et al., 1985) – o número reduzido de variantes observadas e a possibilidade destas enzimas serem resultado de processo de glicosilação diferencial, questão intrigante que foi vinculada como dependente da fonte de carbono, tornam este fungo alvo para estudos de multiplicidade enzimática dependente da glicosilação.

1.5. Microorganismo de estudo: Aspergillus versicolor (Vuillemin) Tiraboschi

As espécies de *Aspergillus* são interessante material para se estudar o metabolismo do carbono e sua regulação, visto a grande variedade de compostos de carbono que estão aptas a utilizar (Hondmann e Visser, 1994). Constitui gênero que

abriga formas fialídicas anamórficas filamentosas de uma das duas linhagens da família Trichocomaceae, inclusa na ordem Eurotiales, grupo dos plectomicetos, classe Ascomycetes, divisão Ascomycota (Alexopoulos, 1996).

Aspergillus é gênero com pouco mais de 100 espécies, monografado por Raper e Fennel (1965) (Alexopoulos, 1996). Seu conidióforo característico, com estipe asseptada terminada em vesícula, sobre a qual células conidiógenas – fiálides e métula – se desenvolvem, é o critério morfológico primário para delimitação do taxa (Gilman, 1950; Samson, 1994). A coloração da estrutura conidial é, também, importante, juntamente com as características das células de Hülle e esclerótia (Samson, 1994). Pouco se conhece sobre o papel ecológico deste grupo de organismos na natureza (Lacey, 1994).

A grande maioria das espécies de *Aspergillus* pode ser identificada quando cultivada em meio Czapek ou agar extrato de malte (Samson, 1994). As culturas de espécimes anamórficos podem ser incubadas por 5-7 dias a 25°C (Samson, 1994).

Aspergillus versicolor (Vuillemin) Tiraboschi – sin.: *A. diversicolor* Waksman, *A. globosus* Jensen, *A. tiraboschi* Corbone; basion.: *Sterigmatocystis versicolor* Vuillemin – pertence ao subgênero *Nidulantes*, seção *Versicolores* (Lacey, 1994), sendo comum em locais com matéria orgânica vegetal em decomposição. Pode formar superfícies aveludadas quando cultivado em agar, geradas pelo grande desenvolvimento de conidióforos, cujas fiálides mostram-se radiadas em duas séries (Gilman, 1950). Produz metabólitos tóxicos de interesse farmacêutico ou agropecuário, tais como ácido ciclopiazólico, esterigamocistina, versicolorinas e nidulotoxinas (Moss, 1994; Kozakiewicz, 1994). Condições de anaerobiose podem reduzir rapidamente seu crescimento. Suporta temperaturas entre 4 a 39°C, com ótimo entre 25-30°C. A

atividade da água mínima para crescimento linear é de 0,78 *aw*, com ótimo entre 0,90-0,95 *aw*. (Lacey, 1994)

Aspergillus versicolor é conhecido por produzir altas quantidades de hemicelulases – xilanases e β -xilosidases, baixas quantidades de endo e exocelulases e razoável quantidade de β -glucosidases (Carmona *et al.*, 1997, Carmona *et al.*, 1998). Por esses motivos, torna-se interessante objeto de estudo visando sistemas enzimáticos de bioconversão da celulose em produtos fermentescíveis, geralmente baseados no mecanismo celulolítico de *Trichoderma reesei*, produtor fraco de β -glucosidases (Solovyeva *et al.*, 1997; Wood, 1991), ou para aplicação em processos onde a preservação da integridade da celulose é necessária.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

A presente dissertação de mestrado teve como objetivos verificar a importância da glicosilação para o estabelecimento de características bioquímicas de dois grupos de isozimas (um, formado por duas β -xilosidases, e outro, composto por duas β -glucosidases, já descritas e purificadas), supostamente dotadas de mesmo núcleo protéico. Assim, também procurou evidenciar a veracidade desta suposição, baseada em similaridades bioquímicas e moleculares. Também procurou estender a avaliação para o componente β -glicosidásico extracelular, a fim de verificar se este é igualmente resultante de algum processo de glicosilação diferencial.

Para tanto, foram avaliadas as características bioquímicas e moleculares de todas as enzimas em foco após N-deglicosilação por EndoH, específica para o núcleo Man α 1-3Man α 1-6 β Man1-4NAcGlc e incapaz de remover NAcGlc ligada à Asparagina; e PNGaseF, inespecífica e capaz de remover NAcGlc.

Similaridade protéica foi avaliada por eletroforese, características bioquímicas e mapas trópticos de material deglicosilado por PNGaseF.

Composição parcial da estrutura oligossacarídica foi avaliada por cromatografia em ConA Sepharose, específica para glicanas ricas em manose suscetíveis ao ataque de EndoH, tipos híbridos das mesmas e biantenárias ricas em galactose. Composição monossacarídica foi avaliada por TLC dos hidrolisados de glicanas por meio de ácido clorídrico.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Organismos e condições de crescimento

3.1.1. Linhagem utilizada

Vem sendo empregado, para a realização deste trabalho, fungo filamentoso *Aspergillus versicolor*, isolado de solo brasileiro pelo Prof. Dr. J. A. Jorge e comprovadamente identificado por Dr. R. A. Samsom, do “Centraalbureau voor Schimmelcultures” de Baarn, Holanda.

3.1.2. Manutenção do organismo em meio sólido

A linhagem de *Aspergillus versicolor* foi mantida em tubos de ensaio com 7 ml de meio sólido contendo sais de Vogel (Vogel, 1956), 2% de sacarose e 2% de agar. Após esterilização, os meios de cultura foram solidificados em posição inclinada. Os tubos contendo meio foram inoculados com o auxílio de alça de platina e incubados por 7 dias a 25°C. As culturas obtidas foram armazenadas em geladeira para posterior uso por, no máximo, 30 dias.

3.1.3. Culturas em meio líquido

Conídios das culturas de 7 dias de idade foram ressuspensos com 10 ml de água destilada estéril, após raspagem da superfície micelial com pipeta esterilizada, e inoculados em meio de Vogel líquido mais a fonte de carbono desejada em concentração de 1%. Os frascos de Erlenmeyer com 1/5 de seus volumes preenchidos por cultura em meio líquido foram incubados a 25°C e 150 rpm por 96 horas em incubadora rotatória.

3.2. Preparação do extrato de enzima micelial

Micélio foi separado do meio de cultivo por filtração a vácuo em papel de filtro Whatman nº1, lavado com água destilada, seco em papel à temperatura ambiente, congelado e, por fim, macerado com areia fina lavada com solução sulfocrômica. O material, suspenso em água destilada, foi centrifugado a 9.800g por 30min a 4°C e o componente não precipitado, em solução, empregado como fonte de enzima micelial.

3.3. Obtenção de enzima extracelular

Micélio foi separado do meio de cultivo por filtração a vácuo em papel de filtro Whatman nº1 e o filtrado foi empregado como fonte de enzima extracelular.

3.4. Ensaio enzimático

3.4.1. Enzimas miceliais

3.4.1.1. β -xilosidases

Atividades β -xilosidásicas foram quantificadas em 50mM de tampão McIlvaine (McIlvaine, 1921) pH 6,0 à 40°C, para enzima induzida por xilana, e pH 5,5 e 45°C, para enzima induzida por xilose. Empregou-se *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (pNP-xil) em concentração final de 1,5mM para avaliação de atividade β -glucosidásica. Reações foram interrompidas em diferentes intervalos de tempo com solução saturada de tetraborato de sódio e as absorbâncias determinadas em 410nm. Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um μ mol de produto por minuto. Atividade específica foi expressa em U.mg proteína⁻¹.

3.4.1.2. *β-glucosidases*

Atividades β -glicosidásicas foram avaliadas em presença de 50 mM de tampão McIlvaine (McIlvaine, 1921), à temperatura de 50°C. A enzima β -glucosidase I foi quantificada em pH5,0 e a β -glucosidase II, em pH5,5. Empregou-se *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (pNP-glu) em concentração final de 1,5mM para avaliação de atividade β -glicosidásica. Reações foram interrompidas em diferentes intervalos de tempo com solução saturada de tetraborato de sódio e as absorbâncias determinadas em 410nm. Atividades β -Xilosidásicas, β -galactosidásica, α -arabinofuranosidásica, fucosidásica, α -glucosidásica e fosfatásica ácida foram mensuradas nas mesmas condições, exceto que *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo (pNP-xyl), *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (oNP-gal), *p*-nitrofenil- α -L-arabinopiranosídeo (pNP-ara), *p*-nitrofenil- β -D-fucopiranosídeo (pNP-fuco) e *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo (pNP- α -glu) foram os respectivos substratos. Atividades celobiásica, CMcelulásica e Avicelásica foram mensuradas tal como descrito acima, embora usando 10 mg mL⁻¹ de substrato. Glucose liberada foi acompanhada pelo método da glucose-oxidase (Bergmeyer and Bernt, 1974). Atividade sobre sacarose, lactose, rafinose, Avicel, CM-celulose, xilana e farelo de trigo foram tomadas igualmente, mas a hidrólise foi acompanhada por meio de mensuração do material em solução, após centrifugação da mistura de reação (10.000 g; 5min), pelo método do ácido dinitrossalicílico (Miller, 1956). Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um μ mol de produto por minuto. Atividade específica foi expressa em U.mg proteína⁻¹.

3.4.2. Enzimas extracelulares

Atividades β -glicosidásica e fosfatásica foram avaliadas em presença de 100mM de tampão MES, à temperatura de 55°C e pH 5,5. Empregou-se *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (pNP-glu), em concentração final de 1,5mM, para avaliação de atividade β -glucosidásica, e *p*-nitrofenil-fosfato (pNP-P) a 2,5mM para mensuração da atividade fosfatásica. Atividades celobiásica, CMcelulásica e Avicelásica foram mensuradas tal como descrito acima (seção 3.4.1). Glucose liberada foi acompanhada pelo método da glucose-oxidase (Bergmeyer e Bernt, 1974). Atividade sobre sacarose, lactose, rafinose, Avicel, CM-celulose, xilana e farelo de trigo foram tomadas igualmente, mas a hidrólise foi acompanhada por meio de mensuração do material em solução [após centrifugação da mistura de reação (10.000 g; 5min)], pelo método do ácido dinitrossalicílico (Miller, 1956). Atividade fosfatásica sobre 50mg de farelo de trigo e 2,5 mg mL⁻¹ de fitato de sódio empregaram as mesmas condições já referidas para pNP-P, sendo acompanhadas pelo método de Heinonen & Lathi (1981). Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um μ mol de glucose (ou açúcar redutor correspondente a glucose) ou fosfato por minuto. Atividade específica foi expressa em U.mg proteína⁻¹.

3.5. Testes de indução e repressão da atividade β -glicosidásica de *A. versicolor*

Efeitos da ausência de fonte de carbono, glucose, glicerol e celobiose na obtenção de atividade β -glucosidásica de *A. versicolor* foram analisados pré-incubando-se o microorganismo em meios de Vogel líquidos contendo 1% de glicerol por 48 horas e posterior transferência das massas miceliais obtidas, cuidadosamente lavadas com solução aquosa estéril osmoticamente idêntica ao meio de cultivo, para meios sem fonte

de carbono ou contendo glicerol 1%, glicose 1%, celobiose 1%, xilose 0,5%, xilana 0,75% ou misturas equivalentes, em porcentagem de massa, destas respectivas fontes de carbono. Culturas transferidas foram mantidas por 11 horas em seus novos meios de cultivo. Os micélios obtidos foram, posteriormente, filtrados, secos e congelados, constituindo material para obtenção de enzima intracelular.

3.6. Distribuição celular de β -glicosidases

Fração enzimática total ligada à superfície micelial foi estimada por meio de ensaio de amostra de micélio intacto lavado com água destilada em volume equivalente ao do meio de cultura. Fração enzimática intracelular foi estimada no extrato de micélio pré-tratado com HCl a 0°C, seguindo procedimento proposto por Mandels (Mandels, 1953). Material extraído de micélios (cujas superfícies foram tratadas com ácido) foi submetido aos processos de purificação descritos em 3.7, a fim de identificar o componente superficial. Separação eletroforética seguida por atividade em gel em presença de íons inibidores específicos também foi empregada para reconhecimento da natureza dos componentes localizados na superfície micelial (ver seção 3.9 de Material e Métodos). Extratos de membranas foram obtidos por homogeneização de micélio em 20 volumes de tampão contendo 2% de Tween 20, 1mM de Mg SO₄, 2mM de CaCl₂, 150mM de NaCl e 25mM de Tris-HCl pH 8,0. Após incubação por 1h em banho de gelo, o material foi centrifugado a 3.000 g por 30min a 4°C e o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 100.000 g por 1h a 4°C. O precipitado foi separado e solubilizado em tampão composto por 2% de deoxicolato de sódio e 10mM de Tris-HCl, pH 8,0. O material homogeneizado foi novamente incubado em banho de gelo por

1h e centrifugado a 100.000g por 1h a 4°C. O sobrenadante foi separado e empregado como fonte de enzima ligada à membrana.

3.7. Purificação enzimática

3.7.1. Purificação das β -xilosidases miceliais

Purificação das β -xilosidases miceliais, obtidas de micélios cultivados em xilana ou xilose, seguiu protocolo estabelecido por Andrade et al. (2004), que consiste em uma cromatografia em DEAE-celulose pH 6,0, seguida por precipitação da fração ativa, eluída em gradiente salino, por 100% de sulfato de amônia.

3.7.2. Purificação das β -glucosidases miceliais

O extrato bruto contendo enzima, obtido de micélio crescido em farelo de trigo 1% por 96h, foi aplicado em coluna DEAE-Sephacel (8cm X 1,5cm) equilibrada com 50mM de tampão Tris-HCl pH 7,0 e eluído com gradiente linear de 0 a 0,5M de cloreto de sódio no mesmo tampão. As frações ativas coletadas, A e B, foram dialisadas contra água decaionizada por quatro vezes consecutivas e liofilizadas. O material obtido da liofilização de A foi diluído em 2,5 ml de tampão fosfato de sódio monobásico – NaOH a 100mM, pH 6,0, e recromatografado em DEAE-celulose (16cm X 2cm), equilibrada com o mesmo tampão da diluição. A primeira fração ativa, eluída com gradiente linear de NaCl, no mesmo tampão, corresponde a β -glucosidase I (β -GI), enquanto que a fração liberada entre 0,25M a 0,35M de NaCl corresponde a β -glucosidase II (β -GII). (Ver anexo 7.5)

3.7.3. Purificação do heteroagregado extracelular

Filtrado foi dialisado “overnight” contra água destilada e aplicado em DEAE-Sepharcel (8cm x 1,5cm) equilibrada com 50mM de tampão Tris-HCl, pH 6,0, e eluída com gradiente linear crescente de NaCl (0 a 0,5M), no mesmo tampão. Frações ativas foram agrupadas, dialisadas, liofilizadas e dissolvidas em pequeno volume de tampão MES a 100mM, contendo 150mM de NaCl, pH6,0. O material obtido foi aplicado em Octyl-Sepharose (8cm x 2cm) equilibrada com o mesmo tampão, mais 1M de NaCl. Frações ativas que não adsorveram na coluna cromatográfica foram agrupadas, dialisadas, liofilizadas e dissolvidas em água, sendo nomeadas agregado β -glicosidásico-fosfatásico extracelular.

3.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Eletroforeses sob condições não desnaturantes (PAGE) foram feitas de acordo com o método de Davis (1964), usando 6% de poliacrilamida. Eletroforeses sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) foram feitas de acordo com o método de Laemmli (1970), usando 7,5% de acrilamida. Miosina (205 kDa), β -galactosidase (116 kDa), fosforilase (97,4 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e soroalbumina bovina (66 kDa) (Sigma) foram empregadas como padrões para massa molecular.

Focagens isoeletricas, usando anfólitos “Pharmalyte” pH 3-10 e pH 4-6,5, foram feitas em géis cilíndricos (0.6cm X 9cm), de acordo com O’Farrel et al. (1977), usando 5% de acrilamida e 5% (v/v) de anfólitos. Após as focagens isoeletricas a 500V por 6 horas, os géis controles para mensuração do gradiente de pH foram fatiados em pedaços

de 5mm de comprimento, os quais foram incubados em 2,5 ml de solução a 25mM de KCl durante a noite, para dosagem do pH das seções.

Atividade enzimática dos eletroforetogramas – zimogramas – foi medida pela fragmentação de PAGEs ou géis de pI (IEF-PAGE) em fatias de 5mm de comprimento, as quais receberam banho inicial de 30 minutos com 50mM de tampão McIlvaine pH 5,0 ou pH 5,5 – de acordo com a enzima estudada – mais 25% de álcool isopropílico, e dois banhos subseqüentes de 20 minutos em 50mM de tampão McIlvaine no mesmo pH. A incubação das fatias para reação, após os banhos para troca de tampão, seguiu o método especificado para o ensaio enzimático na seção 3.4. Transcorridos 90 minutos, as reações foram interrompidas com dois volumes de solução saturada de tetraborato de sódio e a absorbância a 410nm foi estimada.

Dosagem qualitativa de glicoproteínas em gel foi feita segundo Racusen (1979). Os géis não destinados à dosagem de atividade enzimática ou identificação de glicoproteínas foram corados com “Coomassie brilliant blue” R-250.

3.9. Filtração em gel

O peso molecular nativo da β -glucosidase I purificada foi estimado por filtração em Superdex 75 equilibrada e eluída com 50mM de tampão fosfato de sódio, pH 7,0, contendo 150mM de NaCl, utilizando FPLC (“Fast Protein Liquid Chromatographic”). Frações de 1,5 ml foram coletadas e analisadas por absorbância (280nm) e atividade β -glucosidásica. As seguintes proteínas foram utilizadas para calibração da coluna: β -amilase (200 kDa), álcool desidrogenase (150 kDa), soroalbumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa).

3.10. Determinação dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$

As determinações dos parâmetros cinéticos (K_m e $V_{m\acute{a}x}$) das enzimas purificadas foram realizadas pelo procedimento proposto por Hanes (1932).

3.11. Métodos analíticos

Carboidratos neutros totais foram estimados pelo método de Dubois (Dubois et al., 1956), usando manose como padrão. Conteúdo protéico foi estimado pelo método de Lowry et al. (Lowry et al., 1951), usando soroalbumina bovina como padrão.

3.11.1. Remoção de glucanas *N*-ligadas à *Asparagina*

Deglicosilação em condições não desnaturantes foi efetuada a 37°C por 20h, utilizando 1mU.mL⁻¹ de EndoH (Endo- β -N-acetilglucosaminidase H; EC 3.2.1.96) de *Streptomyces plicatus*, para 1nmol de glicoproteína em 50mM de tampão MES, pH 5,5, ou empregando 1U de PNGaseF (*Peptide-N-glycosidase F*; EC 3.2.1.18) para 10nmol de glicoproteína em 40mM de tampão KH₂PO₄, pH7,4, 10mM EDTA, a 37°C por 72h. Deglicosilação em condições desnaturantes foram feitas com as mesmas enzimas e condições acima especificadas. Entretanto, a digestão foi iniciada somente após incubação prévia do material a ser deglicosilado a 100°C por 5min em 0,2% de SDS, somada a adição concomitante de Triton X-100. O tempo de digestão, neste caso, foi reduzido para 3h. Vale ressaltar que EndoH é específica para glicanas que apresentam o núcleo Man α 1-3Man α 1-6 β Man1-4NAcGlc exposto e não modificado (conhecidas como *High mannoses* e seus tipos híbridos, em geral glicanas reprocessadas por meio de remoção de manoses e adição de extensões de galactose), sendo incapaz de remover NAcGlc ligada à Asn. PNGaseF, ao contrário, é inespecífica e capacitada para remoção

do primeiro resíduo de açúcar ligado à asparagina. Sua atuação é eliminada por fucosilações em porções das glicanas próximas ao sítio de inserção destas às proteínas.

Os biopolímeros liberados pela deglicosilação foram posteriormente incubados com 80% de acetona a -20°C por 2h a 4°C e concentrados por centrifugação (13.000g, 10min, 4°C). O material concentrado foi seco em banho de gelo e dissolvido em pequeno volume de água. Cromatografia em Con A-Sepharose encontra-se descrita na purificação do componente extracelular de *A. versicolor*.

3.11.2. *Análise preliminar da glicosilação*

Análise da composição de glicanas das proteínas em questão foi feita por meio de cromatografia em Concanavalina-A Sepharose (ConA) dos materiais deglicosilados tanto por EndoH quanto por PNGaseF. ConA é específica para *High mannoses* e seus tipos híbridos, tão bem como para biantenárias, ricas em galactose. Con A-Sepharose (0,5 X 5cm) foi equilibrada e eluída com 0,1M de Tris-HCl, pH8.0, contendo 150mM de NaCl e 1mM de CaCl₂ e MgCl₂. Para eluição de componentes contendo N-glicanas híbridas ou biantenárias em Con A-Sepharose, foi utilizado 50mL de tampão contendo 20mM α -metilglucosídeo. Para eluição de N-glicanas classificadas como *High mannose*, empregou-se tampão contendo 200mM de α -metilmanosídeo, pré-aquecido a 60°C.

Produtos de hidrólise ácida foram cromatografados em sílica-gel G60 (TLC) sob o sistema solvente 1-butanol: etanol: ácido acético: piridina: água decationizada (10:100:3:10:30) e corados por pulverização de solução 2% Timol- 20% H₂SO₄ a 100°C por 10min. Replicatas foram empregadas para extração e quantificação dos monossacarídeos purificados pelo método de Dubois (Dubois et al., 1956).

3.11.3. *Análise preliminar do núcleo protéico*

Mapas trípticos (mapas de peptídeos obtidos por eletroforese dos fragmentos gerados por digestão protéica por meio da ação de tripsina) foram feitos por meio de clivagem da proteína, purificada a partir de SDS-PAGE bidimensional, por meio de tripsina tratada com TPCK, em solução de bicarbonato de sódio pH 8.0, a 100mM, contendo 1mM de cloreto de cálcio, a fim de evitar agregação da protease e sua conseqüente auto-hidrólise.

As enzimas, localizadas em PAGE 8,9 7,5% e eluídas, por difusão, em presença de tampão SDS-PAGE (portando 1mM de SDS) por dois dias, foram concentradas por meio de precipitação com ácido tricloroacético (TCA) a 10% e centrifugação, por 20min, a 20.000g. O resíduo de detergente mais TCA foi eliminado com lavagens sucessivas em acetona 80% e etanol:éter (1:1). O material obtido foi submetido a nova eletroforese em condições desnaturantes (SDS 10%) e eluído por difusão em tampão (Tris-HCl, pH7,5, contendo 1mM de SDS; 2 dias). O produto foi deglicosilado com 5U de PNGase F, a 37°C, por 24h. O material resultante foi novamente precipitado com TCA 10% e, após eliminação do resíduo de ácido e detergente, proteolísado. Foram utilizadas 5U de tripsina, divididas em duas aplicações, uma inicial e outra após 24h, em presença de 1mM de CaCl₂, no tampão bicarbonato de sódio 100mM pH8,0. O tempo de digestão foi fixado em 48h. Atividade triptica verificada sob BSA, por meio de nihidrina (Doi, 1981). O material diluído foi aplicado diretamente no gel (sistema descontínuo proposto por Laemmli), sendo o eletroforetograma resultante fixado com 10%TCA, 10%ácido acético e 0,25%glicerol e corado por meio do procedimento proposto por Wray (1981) de coloração por diamina de prata, e corrigido com o redutor de Farmer.

3.12. Reprodutibilidade dos resultados

Todos os experimentos foram repetidos ao menos três vezes. Todos os resultados correspondem à média destas repetições. Quando conveniente, foi adicionado à média seu erro padrão.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. β -xilosidases miceliais

4.1.1. Avaliação fisiológica preliminar

β -xilosidases miceliais de *Aspergillus versicolor* foram purificadas de acordo com protocolo estabelecido por Andrade et al. (2004). 61% da atividade β -xilosidásica localizou-se na superfície micelial (42% deste total em extratos de membrana), sendo inteiramente removida com 20 banhos sucessivos de água destilada. Ambas as enzimas (oriundas de xilana ou xilose) perderam seus respectivos registros em zimogramas de extratos de micélio tratado com ácido, resultado que aponta para localização predominante na superfície micelial (Figura 1). Em segundo lugar, foi observado que seus pH ótimos (β -xilosidase xilana = 6,0; β -xilosidase xilose = 5,5, Andrade et al, 2004) foram coincidentes com os pH observados nos seus respectivos meios de cultivo (xilana = pH 6,03; xilose = pH 5,11), resultado que aponta não só possível relação entre a fonte de carbono com o tipo enzimático produzido, mas também provável relação com o pH, uma vez que todos os meios de cultivo partiram com pH inicial igual a 5,70.

4.1.1.1. A relação entre isozima produzida com o pH e a fonte de carbono

Uma das hipóteses que nortearam o desenvolvimento deste primeiro estudo de caso foi a possibilidade de seleção de isozimas (aparentemente glicoformas com um mesmo núcleo protéico) pela fonte de carbono. Visto que o pH poderia ser um seletor não menos importante, avaliação mais detalhada foi necessária. Portanto, foram feitos testes de indução com fixação de combinações de fonte de carbono (xilana e xilose) e pH (5,0 e 6,0). Todos empregaram *A. versicolor* previamente crescido em glucose 1% por 48h. Os pH finais observados em meios tamponados ou tão somente corrigidos

quanto ao pH estão registrados na Tabela 1. Tabela 2 mostra as atividades específicas observadas em micélios após 10h de transferência. Figura 2 mostra as curvas de pH ótimo dos extratos obtidos após 10h de transferência e Figura 3 apresenta os zimogramas esquematizados obtidos dos extratos miceliais.

Os resultados mostraram que o tampão a 200mM não foi suficiente para que, após 10h de transferência, os pH dos meios de cultivo se mantivessem constantes (Tabela 1). Entretanto, pôde-se observar que xilose, um monossacarídeo, é mais forte indutor que xilana, um polímero, nas 10 primeiras horas após transferência, resultado que suporta a hipótese de um carboidrato solúvel funcionar como fonte indutora inicial (Tabela 2). Foi igualmente observado que a combinação do monossacarídeo com uma fonte polimérica incrementa suavemente a atividade específica. As gamas de pH ótimo sustentadas pelo aparato enzimático desenvolvido nestas 10h iniciais mostraram-se, tanto para xilose quanto para xilana e independentemente do pH inicial fixado, iguais, cobrindo uma faixa ótima entre pH 5,0 e 6,5, a qual se sobrepõe aos pH observados nos meios, antes e depois da atividade do microorganismo (Figura 2). Em meio misto (xilana 0,5% : xilose 0,5%), foi observado um comportamento similar quanto à independência do pH ambiental para as atividades registradas, mas, também, diferença quanto à distribuição dos pH ótimos, dividida em dois picos, um em pH 5,0 e outro em platô entre pH 6,5 e pH 7,0 (Figura 2). Embora diferente, a distribuição cobre os pH registrados nos meios de cultivo, antes e depois da atividade fúngica.

Os padrões de atividade em gel de eletroforese (Figura 3) mostraram grande complexidade devido à multiplicidade de atividades β -xilosidásicas verificadas. Nesta complexidade, pode-se distinguir uma área que corresponde ao Rf obtido da enzima de xilana (ver Figura 1), outra, que compreende posição da enzima oriunda de micélios

mantidos em xilose, e um terceiro, mais lento, que não corresponde a nenhum Rf anteriormente obtido. Toda a gama de atividades pode não representar exclusivamente β -xilosidases clássicas, mas também enzimas inespecíficas. Entretanto, vê-se que a ação xilosidásica, independente do componente ao qual está vinculada, é exercida por uma diversidade bastante rica de proteínas, ao menos em uma primeira etapa de crescimento de 10h. Aparentemente, existe um padrão triplo de atividade reconhecido em xilana ou xilose pH 6,0 (pH final observado em xilana). Talvez a presença de um indutor somada ao pH final do meio polimérico seja sinal mimetizador das condições encontradas em meio portando xilana. Tal padrão, observado apenas nas 10h iniciais de incubação em xilose pH 6,0 ou xilana, mantém-se após 48h ou 72h em meios contendo xilana e xilose na proporção de 1:1.

Fig. 1. Zimogramas dos extratos miceliais de *Aspergillus versicolor* cultivado em xilana ou xilose. Gráficos representam micélios tratados ou não com ácido clorídrico a frio. A sensibilidade a bário mais o posicionamento eletroforético foram empregados como identificadores das duas β -xilosidases.

Tabela 1

pH dos meios de transferência após 10h de cultivo do microorganismo

Suplemento - pH corrigido		pH final	Suplemento - pH tamponado		pH final
xilana 0.75%	pH 6.0	6.33	xilana 0.75%	pH 6.0	6.27
xilana 0.75%	pH 5.0	5.89	xilana 0.75%	pH 5.0	5.83
xilose 1%	pH 6.0	5.49	xilose 1%	pH 6.0	5.51
xilose 1%	pH 5.0	5.08	xilose 1%	pH 5.0	5.02
xilana 0.5% + xilose 0.5%	pH 6.0	5.88	xilana 0.5% + xilose 0.5%	pH 6.0	5.85
xilana 0.5% + xilose 0.5%	pH 5.0	5.42	xilana 0.5% + xilose 0.5%	pH 5.0	5.39

pH corrigido com ácido ou base antes da transferência; pH tamponado com tampão citrato - fosfato dibásico (McIlvaine, 1921) a 200mM. Pré-cultivos em glucose 1% por 48h, meio não tamponado, pH inicial igual a 5.7.

Tabela 2

pH dos meios de cultivo após 72h de crescimento micelial

Suplemento	pH registrado
xilose 1%	5.11
xilana 0.75%	6.03
xilana + xilose 0.5%/0.5%	5.75
farelo de trigo 1%	5.66
celobiose + xilose 0.5% : 0.5%	6.18
glucose 1%	4.88

Meios iniciais com pH 5.7, não corrigido, não tamponado

Fig. 2. pH ótimo dos extratos miceliais de *Aspergillus versicolor* oriundo dos meios de transferência. Legenda contida no gráfico. As concentrações protéicas foram as mesmas para todos os ensaios.

Fig. 3. Esquemas dos zimogramas de extratos miceliais oriundos dos materiais transferidos para meios tamponados. A- Meios com pH inicial corrigido. B- Meios com pH inicial fixado e tamponado. XA5 = xilana pH inicial = 5,0; XA6 = xilana pH inicial = 6,0; XO5 = xilose pH inicial = 5,0; XO6 = xilose pH inicial = 6,0; XX5 = xilana/xilose pH inicial = 5,0; XX6 = xilana/xilose pH inicial = 6,0. Controles: micélios cultivados diretamente nas fontes de carbono indicadas, por 72h: XAc = xilana 0,75%; XOc = xilose 1%; G = glucose 1%.

4.1.2. Exploração dos efeitos da deglicosilação sobre as β -xilosidases de *A. versicolor*

Atividade β -xilosidásica micelial de *Aspergillus versicolor* foi, em trabalho anterior (Andrade et al., 2004), reportada como existente em duas formas enzimáticas distintas, uma presente em micélios cultivados em xilana e outra, em xilose. Tais enzimas apresentaram diferenças bioquímicas, das quais a mais relevante foi a porcentagem de carboidrato a elas covalentemente ligado. Uma vez que ambas mostraram-se iguais em SDS-PAGE, atribuiu-se à glicosilação as diferenças observadas. A fim de confirmar tal possibilidade, avaliou-se, aqui, as características bioquímicas e moleculares destas duas enzimas tanto após deglicosilação por EndoH, enzima específica para triantenárias com ramificação 3-6 ricas em manose, ditas “*High mannose*”, e por PNGaseF, enzima inespecífica. Além da especificidade, estas duas enzimas diferem no fato de uma, EndoH, não remover o resíduo inicial de NAcGlc, N-ligado à Asn, enquanto a outra, PNGaseF, é capaz de remove-lo.

4.1.2.1. Avaliação eletroforética

Eletroforeses em condições não desnaturantes (PAGE 8.9 7.5%) efetuadas com as enzimas deglicosiladas por EndoH mostraram incrementos de R_f para ambas, embora sem aproximação de suas velocidades de migração (Figura 4). Tal resultado foi modificado quando se efetuou deglicosilação por PNGaseF, após a qual ambas passaram a apresentar mesmos R_f em PAGE 8.9 (Figura 4). Tal resultado aponta duas possibilidades: ou a disposição dos resíduos de carboidrato é diferente entre ambas e, assim, a carga elétrica superficial da molécula também, gerando resultados diferentes em PAGE quando o resíduo de NAcGlc permanece na proteína, ou existe alguma estrutura de carboidrato inatacável por EndoH, mas hidrolisável por PNGaseF. Uma vez

que as porcentagens de carboidrato mensuradas para ambas as glicoproteínas são distintas (44% para a oriunda de micélio mantido em xilana e 22% para a de xilose) a segunda possibilidade é mais interessante à primeira vista, pois também não exclui diferença de sítios de glicosilação em ambas as glicoproteínas. Um segundo aspecto observado foi a presença de única banda para as duas proteínas após deglicosilação, indicando que a estrutura trimérica, observada anteriormente por Andrade et al., 2004, permanece intacta após remoção de carboidrato.

Em SDS-PAGE (Figura 5), ambas mostraram o mesmo padrão trimérico anteriormente observado, com leve aumento da velocidade de migração de duas de suas subunidades. Os mapas trípticos após deglicosilação também mostraram o mesmo padrão eletroforético, indicando a semelhança dos núcleos protéicos (Figura 6). Vale notar que não só um dos fragmentos observados alterou fortemente sua velocidade de migração, fato que o transforma em sério candidato a possuidor das maiores diferenças de glicosilação entre as duas enzimas, como também um novo surgiu, indicando que a deglicosilação abriu, também, outro sítio para a ação da tripsina.

Fig. 4. PAGE das β -xilosidases purificadas e tratadas com EndoH ou PNGaseF. 15 μ g de proteína foram aplicadas em cada linha. As amostras foram deglicosiladas com 5U de EndoH, em 10mM de tampão citrate de sódio, pH 5.5, por 24h, a 37°C. Tratamento com PNGaseF empregou 2U de N-glicanase em 100mM de tampão Tris-HCl pH7.4. Linhas ímpares: β -xilosidases oriundas de micélio manido em xilana; linhas pares: em xilose. Linhas 1-2, 3-4 e 5-6 representam, respectivamente, controles, tratamento com EndoH e tratamento com PNGaseF.

Fig. 5. SDS-PAGE das β -xilosidases purificadas. (A), enzima induzida por xilana; (B), enzima induzida por xilose.

Fig. 6. Mapas trípitos das β -xilosidases miceliais de *A. versicolor*. Linhas 1- tripsina; 2- β -xilosidase de xilana; 3- β -xilosidase de xilose; 4- β -xilosidase de xilana deglicosilada por PNGaseF; 5- β -xilosidase de xilose deglicosilada por PNGaseF; 6- PNGaseF. Deglicosilações foram efetuadas sobre enzimas desnaturadas. Para maiores informações, ver Material e métodos.

4.1.2.2. Composição e estrutura das glucanas covalentemente ligadas à Aparagina

β -xilosidase de xilana e xilose mostraram diferenças no percentual de açúcar de suas estruturas glicoprotéicas (44% e 21%, respectivamente). Esta foi composta, primordialmente, por manose, galactose e glucose, excluído N-acetil-glucosamina, não detectável pelos métodos de coloração empregados, mas cuja presença foi reconhecida pela deglicosilação enzimática, a qual depende de NAcGlc. β -xilosidase induzida por xilana apresentou proporções de manose, galactose e glucose iguais a 69,68 : 30,25 : 0,056 %, respectivamente, enquanto que β -xilosidase induzida por xilose apresentou proporções iguais a 85,35 : 14,54 : 0,094%, respectivamente. As quantidades de manose foram semelhantes em valores absolutos (β -xilosidase xilana = 34,29 μ g; xilose = 32,63 μ g; valores referentes a 2,37mg e 2,42mg de proteína total, respectivamente). Assim, ambas diferiram, principalmente, na quantidade de galactose presente. A Figura (7) mostra replicata de TLC empregada para purificação dos produtos de hidrólise ácida das glucanas liberadas de ambas as enzimas, onde se pode ver a acentuada diferença de saturação de cor dos pontos reconhecidos como galactose.

Estes resultados foram confirmados e complementados por avaliação das enzimas em ConA, antes e depois de deglicosilação por EndoH (Figura 8). ConA é resina específica para estruturas de glucanas *High mannose*, seus tipos híbridos e biantenárias, em geral ricas em galactose. EndoH cliva especificamente as duas primeiras estruturas. Antes do tratamento, ambas as enzimas ficaram fortemente adsorvidas em ConA, sendo eluídas com dificuldade com misturas de α -metilglucopiranosídeo (específico para eluição de biantenárias) e α -metilmanopiranosídeo (específico para eluição de *High mannose* e seus tipos híbridos). Foi necessária quantidade 10 vezes maior de α -metilglucopiranosídeo para eluição

eficiente de β -xilosidase de xilana. Após tratamento com EndoH, apenas α -metilglucopiranosídeo foi necessário para eluição, embora mantendo as concentrações diferentes. Estes resultados permitem atrelar as diferentes proporções de galactose a diferentes quantidades de ramificações biantenárias, ricas em galactose. Também mostram a existência de estruturas *High mannose* e tipos híbridos destas, embora não permitam suas distinções. A necessidade de inclusão de SDS para remoção de parte da enzima que ainda permaneceu na coluna cromatográfica mostra alguma heterogeneidade dos componentes purificados e a grande quantidade de carboidrato de núcleo *High mannose* sem ramificação, os quais se ligam fortemente à resina e somente são eluídos mediante alteração estrutural promovida por SDS.

Fig. 7. Cromatografia em camada delgada (TLC) dos produtos de hidrólise ácida das glucanas componentes da glicosilação de β -xilosidase de xilana (4) e xilose (5). Controles: 1- manose; 2- galactose; 3- glucose.

Fig. 8. Cromatografia em ConA Sepharose das β -xilosidases induzidas por xilana e por xilose, antes (A) e depois (B) de deglicosilação por EndoH.

4.1.3. Avaliação bioquímica

4.1.3.1. Influências no pH e temperatura

O tratamento com PNGaseF, embora tenha gerado as maiores aproximações eletroforéticas entre ambas, eliminou por completo qualquer vestígio de atividade residual nas condições anteriormente determinadas como funcionais para as duas enzimas, resultado este que evidencia a importância do resíduo de NAcGlc para as duas glicoproteínas. Da mesma forma, mostrou as acentuadas semelhanças entre as duas, uma vez que este não é um resultado geral – β -glucosidases do mesmo fungo, da mesma forma que seu componente extracelular, não perdem atividade após deglicosilação por PNGaseF, embora suas características bioquímicas e eletroforéticas sofram fortes alterações.

Dessa forma, a caracterização bioquímica foi feita somente para as tratadas com EndoH. Foi avaliada a influência da temperatura (Figuras 9 e 10) e pH (Figura 11) nas atividades de ambas as enzimas. Para todos os resultados, verificou-se aproximação, quando não igualamento, dos valores obtidos para ambas as proteínas. Temperatura ótima foi reduzida em 5°C para enzima induzida por xilose e em 10°C para induzida por xilana, tornando-as iguais com o ótimo registrado de 35°C (Figura 9). Estabilidade térmica foi reduzida drasticamente (Figura 10) e o pH ótimo foi igualado em pH 6,0 (Figura 11).

Fig. 9. Efeito da temperatura sobre as β -xilosidases deglicosiladas. (A) Enzimas não submetidas a tratamento. (B) Enzimas tratadas com EndoH. Símbolos: (○) enzima induzida por xilose; (●) enzima induzida por xilana.

Fig. 10. Estabilidade térmica das duas β -xilosidases deglicosiladas por EndoH. (A) Controles; (B) tratamentos. Símbolos: (○) enzima induzida por xilose; (●) enzima induzida por xilana.

Fig. 11. Efeito do pH sobre as β -xilosidases deglicosiladas por EndoH. (A) Controles; (B) tratamentos. Símbolos: (o) enzima induzida por xilose; (●) enzima induzida por xilana.

4.1.3.2. Influências sobre o comportamento diante de diferentes sais de íons metálicos

O efeito de diversos sais de íons metálicos sobre as duas β -xilosidases após deglicosilação por EndoH estão representados na Tabela 3. Observou-se, além da semelhança de comportamentos após remoção de carboidratos, anulação de ativações anteriormente constatadas e quedas generalizadas nas atividades residuais para todos os sais de íons avaliados. Tal resultado, além de mostrar que os íons avaliados influenciam a atividade enzimática por meio de interações de superfície, mas não com o sítio catalítico diretamente, reforçam o papel das estruturas de carboidrato covalentemente ligadas às duas β -xilosidases nas interações com o ambiente eletrolítico, não somente evitando danos para a dinâmica molecular exigida para o bom funcionamento do sítio catalítico, como também, por meios ainda não determinados, elevando a atividade enzimática registrada quando em presença de determinados efetores (talvez por interações direcionadas pelos espaços não ocupados pela glicosilação).

Tabela 3Efeito de íons sobre β -xilosidases após tratamento com EndoH

Efeitores	Atividade β -xilosidásica			
	induzida por xilana ^A	induzida por xilose ^A	induzida por xilana ^B	induzida por xilose ^B
EDTA (1mM)	100	100	100	100
(Controle)				
CaCl ₂	189	118	88	91
(0.25 mM)				
BaCl ₂	158	105	98	100
(0.25 mM)				
MgSO ₄	158	113	102	96
(0.25 mM)				
CoCl ₂	147	102	99	100
(1 mM)				
ZnCl ₂	120	123	94	92
(1 mM)				
AlCl ₃	26	92	0	0
(1 mM)				
CuSO ₄	33	26	0	0
(1 mM)				

A- controles; B- enzimas tratadas com EndoH

4.1.4. Efeito da deglicosilação por EndoH sobre os parâmetros cinéticos para hidrólise de pNP-xil

Deglicosilação por EndoH para ambas as β -xilosidases gerou redução das velocidades máximas de hidrólise de pNP-xil. Valores 3,4x e 2,6x menores foram registrados para enzimas induzidas por xilana e xilose, respectivamente. Em contrapartida, valor de K_m manteve-se constante para enzimas induzida por xilose, diferentemente do observado para enzima de xilana, para a qual aumento de 2,7x foi registrado. Por fim, parâmetros cinéticos de ambas tornaram-se muito similares após deglicosilação por EndoH (Tabela 4).

Tabela 4

Efeito da deglicosilação por EndoH sobre os parâmetros cinéticos para hidrólise de pNP-xil pelas β -xilosidases de *A. versicolor*

β -xilosidase indutor	Tratamento EndoH	V _{máx} (U mg proteína-1)	K _m (mM)
xilana	-	1060 $\pm$ 206	0,16 $\pm$ 0,03
xilana	+	315 $\pm$ 59	0,43 $\pm$ 0,04
xilose	-	815 $\pm$ 114	0,31 $\pm$ 0,02
xilose	+	322 $\pm$ 82	0,41 $\pm$ 0,03

Resultados são referentes a médias + DV de 6 purificações.

4.2. β -glucosidases miceliais

4.2.1. Avaliação fisiológica preliminar

A. versicolor foi cultivado em diferentes fontes de carbono e os extratos miceliais obtidos mapeados quanto às atividades β -glucosidásicas por meio de zimogramas. Aproximadamente 70,8% da atividade β -glucosidásica observada em micélio crescido em farelo de trigo mostrou-se localizada na superfície micelial, visto sua detecção nos ensaios de micélio intacto. Banhos consecutivos com água destilada fria extraíram 63,2% desta atividade enzimática. 29,2% da atividade β -glucosidásica foi detectada somente em extratos de micélio previamente tratados com ácido, fração esta representativa da porção enzimática intracelular, e nenhuma atividade foi observada em extratos de membrana.

Duas bandas de atividade distintas foram observadas em eletroforese (PAGE 8,9 6%). Destas, apenas B1 ((banda eletroforética 1) mostrou-se localizada na superfície micelial, devido ao seu desaparecimento em eletroforese após tratamento da superfície micelial com ácido (procedimento de Mandels, 1953) (Figura 12).

As enzimas componentes da banda eletroforética B1 foram eluídas do gel e cromatografadas em DEAE-celulose (Figura 13), única resina capaz de separar a β -glucosidase I da II. O procedimento demonstrou que B1 é realmente composto por β -glucosidases I, sensível a Ag^+ , e II, insensível ao íon.

B1 esteve presente em praticamente todas as fontes de carbono, exceto meio misto sintético (Avicel : xilana : xilose : celobiose; totalizando 1%) e Avicel, onde um segundo e único pico, de migração mais rápida, não purificado e chamado B2, foi observado (Figura 14). B2 esteve presente unicamente em fontes poliméricas de

celobiose, mas, também, em xilana, quando oferecida em conjunto com celobiose.

Assim, B2 depende, aparentemente, de substrato polimérico.

Fig. 12. Zimogramas dos extratos miceliais de *A. versicolor* crescido em farelo de trigo antes do tratamento de Mandels (Mandels, 1953) (A) e depois do tratamento (B).

Fig.13. Perfis cromatográficos, em DEAE-celulose, das proteínas eluídas de B1, oriundo de farelo de trigo (A) e celobiose (B). β -GI foi sensível a Ag^+ , e β -GII não. Retas tracejadas representam gradientes lineares crescentes de NaCl (0 a 0,5M) em tampão fosfato de sódio a 100mM e pH 6,0 [o mesmo utilizado para equilíbrio da coluna cromatográfica (DEAE-celulose 0,5cm X 3cm)].

Fig. 14. Zimogramas (em PAGE 8,9 6%) esquematizados dos extratos de micélios de *A. versicolor* obtidos de diversas fontes de carbono oferecidas para crescimento.

4.2.2.Exploração dos efeitos da deglicosilação sobre as β -glucosidases de A. versicolor

4.2.2.1. Avaliação eletroforética

Análises das enzimas não deglicosiladas em SDS-PAGE mostraram massas moleculares de 146kDa para β -glucosidase I e 131 kDa para β -glucosidase II (Figura 15B). Cromatografia em Superdex 75 indicou massas moleculares aparentes de 123 kDa para ambas as proteínas (dado não apresentado). A principal diferença entre estas glicosil-hidrolases residiu na glicosilação, quantificada em 51% para β -glucosidase I e 43% para β -glucosidase II.

Ambas as enzimas migraram igualmente em PAGE (Figura 15A) e SDS-PAGE (Figura 15B) após tratamentos com EndoH ou PNGase F, sugerindo, em conjunto com o valor residual de açúcar das glicoproteínas deglicosiladas de 3.6 a 7.6%, composição oligossacarídica muito semelhante, completamente suscetível a EndoH. Após tratamento, não foi detectado, por coloração em gel, presença de açúcares nas regiões coincidentes com as posições de β -GI e β -GII deglicosiladas (dado não apresentado). Os valores de glicosilação residual foram, assim, determinados sobre proteínas eluídas de gel, pelo método de Dubois. É provável que sejam oriundos de glicanas O-ligadas, geralmente unidas por um resíduo de manose às proteínas de origem fúngica (Gemmil e Trimble, 1999). Esta forma não é removível pelos métodos enzimáticos atualmente disponíveis.

Mapas trípticos revelaram as acentuadas semelhanças entre as duas enzimas, glicosiladas ou deglicosiladas, sugerindo, em conjunto com as outras avaliações, que ambas compartilham um mesmo núcleo protéico (Figura 15C).

Fig. 15. PAGE (A) e SDS-PAGE (B) das β -glucosidases purificadas; e seus mapas trpticos (SDS-PAGE 15%) (C). A - PAGE 8.9 6% das β -glucosidases 1 (1,3,5) e 2 (2,4,6) antes de deglicosilao (1,2) e deglicosiladas por EndoH (3,4) e PNGaseF (5,6). B: Linha 1 – marcadores moleculares. Linhas pares - β -glucosidase I; linhas mpares - β -glucosidase II. 4 e 5 – deglicosiladas por EndoH; 6 e 7 – deglicosiladas por PNGaseF. C: Linha 1 – marcadores moleculares. So apresentadas: β -glucosidases I e II controles (2 e 3) e tratadas com PNGaseF (4 e 5).

4.2.2.2. Composição e estrutura das glucanas covalentemente ligadas à Asparagina

Os resultados eletroforéticos apontaram para indiferenciação dos tratamentos por EndoH e PNGaseF, implicando predomínio de estruturas suscetíveis ao ataque de EndoH, a mais específica das enzimas utilizadas. Avaliação posterior da glicosilação destes componentes foi feita em Con A-Sepharose (Figura 16), específica para glicosilação *High mannose* e biantenárias não fucosiladas, antes e depois de deglicosilação por EndoH, específica para *High mannose*. Ambas as enzimas aderiram à resina antes do tratamento (Figura 16A), mas foram eluídas em tampão quando deglicosiladas (Figura 16B), revelando a existência de glicosilação N-ligada abundante, predominantemente *High mannose* ou uma forma híbrida deste tipo de glicana, como evidenciado pela difícil eluição com α -metilmanosídeo, específico para liberação da interação com formas *High mannose*, confirmando a hipótese apontada pelos exames eletroforéticos. Assim, a principal diferença entre os dois tipos de deglicosilação enzimática para as β -glucosidases estaria na permanência do resíduo de NAcGlc ligado à Asparagina após digestão por EndoH.

Glicosilação de β -glucosidase I mostrou-se rica em manose, mas com proporção relativa de galactose maior que a apresentada por β -glucosidase II (Man:Gal:Glu igual a 78,36%:21,61%:0,033%, respectivamente para β -glucosidase I, e Man:Gal:Glu igual a 83,59%:16,38%:0,028%, respectivamente para β -glucosidase II). Figura 17 mostra replicata de TLC utilizado para purificação e extração de monossacarídeos purificados. A razão manose/galactose para β -glucosidase I foi igual a 5,1, enquanto que a para β -glucosidase II, igual a 3,27. A elevada quantidade de galactose e a relação manose/galactose sugerem, em conjunto com a suscetibilidade por EndoH, presença de tipos híbridos de “high-manose”, principalmente na superfície de β -glucosidase II.

Fig.16. Perfis cromatográficos das β -glucosidases I (barras cheias) e II (barras hachuradas) em Con A-Sepharose. A- Amostras não deglicosiladas, foram eluídas com dificuldade com α -metilmanosídeo. α -Metilmanosídeo + SDS foi empregado para remoção de componentes que resistiram à eluição. B- Após deglicosilação com EndoH, ambas as enzimas não aderiram à coluna, sendo eliminadas com tampão Tris-salina (TBS).

Fig.17. Cromatografia em camada delgada (TLC) dos produtos de hidrólise ácida das glicanas N-ligadas das β -glucosidases 1 (4) e 2 (5). Padrões: 1- manose; 2- galactose; 3- glucose.

4.2.3. Avaliação bioquímica

4.2.3.1. Influências da deglicosilação sobre o comportamento frente a pH e temperatura

β -GI e β -GII mostraram pH ótimos iguais a 5,0 e 5,5, respectivamente (Figura 18A), e comportamentos frente a diferentes temperaturas muito similares, com ótimos de atividade em 50°C (Figura 19A) e perfis de curvas de termoestabilidade que diferiram apenas nos tempos de meia-vida observados quando estas foram incubadas, em água destilada, a 45°C (Figura 20A). Nesta situação, β -GI apresentou tempo de meia-vida de 16min, enquanto que β -GII, 7min. β -GI e β -GII também mostraram termoinativação bifásica a 45°C, sugerindo dois estados conformacionais estáveis para ambas. Adição de tampão McIlvaine na solução contendo as enzimas em incubação elevou 3,2 vezes a termotolerância das β -glucosidases I e II a 50°C (dados não apresentados).

Estudos preliminares das enzimas deglicosiladas por EndoH em condições não desnaturantes não modificaram resultados de comportamento térmico (Figuras 19B e 20B), a não ser pela redução do tempo de meia-vida de β -GI a 45°C para 6,5min (Figura 20B), resultado igual ao obtido para β -GII (Figura 20B). Tratamentos com coquetel contendo PNGase F não geraram resultados diferentes dos obtidos com tratamento empregando EndoH (Figuras 19C e 20C)

Perfis de curvas de atividade a diferentes pHs foram modificados pelo tratamento com EndoH e aproximaram β -GI e β -GII, embora os platôs de atividade máxima, mesmo sobrepostos, tenham-se mostrado diferentes (Figura 18B). É possível que o resíduo de NAcGlc, não removido por EndoH, tenha contribuído para a manutenção destas diferenças, uma vez que, após deglicosilação por coquetel contendo

PNGase F, houve tanto sobreposição de platôs de atividade, localizados entre pH 4,5 e 5,0, quanto dos perfis das curvas de pH ótimo (Figura 18C). Estabilidade a diferentes pHs, no entanto, não revelaram diferenças relevantes entre as duas enzimas, antes ou depois de deglicosilação, permanecendo ótimas entre pH 4.0 e 4.5 (dado não apresentado).

Ambas as β -glucosidases foram estudadas quanto ao pH ótimo após exposição a 45°C por 30 min, antes e depois de deglicosilação por PNGaseF ou EndoH (Figura 21). Os perfis das curvas de pH obtidos para estas segundas conformações estáveis foram muito diferentes dos obtidos para as enzimas não tratadas termicamente (Figura 21A), a não ser para as deglicosiladas por PNGaseF e submetidas à incubação a 45°C, as quais mostraram curvas de pH idênticas tanto entre si quanto frente as enzimas não submetidas ao tratamento térmico (Figura 21C). As enzimas não deglicosiladas foram bastante diferentes entre si após tratamento térmico, com extensão do platô de atividade para β -glucosidase II e basificação do pH ótimo de β -glucosidase I. Enzimas tratadas com EndoH, que mantêm NAcGlc ligado ao núcleo protéico, mostraram um perfil aparentemente intermediário entre o tratamento com PNGaseF e enzimas glicosiladas (Figura 21B), e desarranjo das curvas de pH, talvez devido a reconformações locais após aquecimento, diferentemente influenciadas por variação de ocupação de sítios de glicosilação por NAcGlc, eliminado com deglicosilação por PNGaseF. As diferenças acentuadas observadas nas enzimas glicosiladas, no entanto, podem muito bem refletir composição de glicanas diferenciada, como os estudos de composição glicosídica apontaram.

Fig. 18. pH ótimo das β -glucosidasas I (●) e II (○). A – controles; B – tratamento com EndoH; C – tratamento com PNGaseF.

Fig.19. Temperatura ótima de β -glucosidase I (●) e II (○). A – ensaio com enzimas não deglicosiladas. B – enzimas após deglicosilação com EndoH. C – após delicosilação com coquetel contendo PNGase F.

Fig. 20. Estabilidade térmica das β -glucosidases I (●) e II (○) a 45°C. A – controles; B – tratamento com EndoH; C – tratamento com PNGaseF.

Fig.21. pH ótimo das β -glucosidases I (●) e II (○), após incubação a 45°C por 30min., deglicosiladas ou não. A- enzimas não deglicosiladas tratadas termicamente; B- enzimas deglicosiladas por EndoH e tratadas termicamente; C- enzimas deglicosiladas por PNGaseF e tratadas termicamente.

4.2.3.2. Efeito da deglicosilação sobre o comportamento frente a diferentes sais de íons metálicos

A enzima β -glucosidase II foi mais drasticamente inibida por sais de prata ou ferro a 1mM que β -glucosidase I (Tabela 5). No entanto, os efeitos de sais de zinco, alumínio e cobre sobre ambas as enzimas, quando a 1mM, foram relativamente próximos. Nenhuma das enzimas foi ativada por qualquer íon metálico testado ou responderam a EDTA ou β -Mercaptoetanol, resultado que, ao contrário, reforça as similaridades das duas glicoproteínas. Ambas as enzimas são, qualitativamente, muito similares para os íons analisados em concentrações de 1mM. Diferenças foram realçadas por meio da exploração de diferentes concentrações de íons (Figura 22). β -GII mostrou-se menos sensível aos íons testados nessas concentrações, em especial para bário, cobalto, cobre e zinco. As similaridades mostraram-se mais acentuadas após deglicosilação por PNGaseF, seja em testes de concentrações fixas (Tabela 5) quanto em avaliações com diferentes concentrações de um mesmo íon (Figura 23). A estabilidade frente a diferentes íons em concentrações de 1mM foi perturbada pela deglicosilação (Tabela 5), reduzindo-se e aproximando-se.

Tabela 5Efeito de sais de íons metálicos, EDTA e β -Mercaptoetanol sobre as atividades β -glucosidásicas I e II.

Efetor	Atividade residual (%)			
	β -glucosidase I		β -glucosidase II	
	PNGaseF - (1mM efetor)	PNGaseF + (1mM efetor)	PNGaseF - (1mM efetor)	PNGaseF + (1mM efetor)
controle	100 $\pm$ 4		100 $\pm$ 2	
EDTA	100 $\pm$ 1	NA	100 $\pm$ 3	NA
CaCl ₂	100 $\pm$ 2	100 $\pm$ 9	100 $\pm$ 3	100 $\pm$ 2
BaCl ₂	100 $\pm$ 3	97 $\pm$ 3	100 $\pm$ 5	98 $\pm$ 6
MgCl ₂	100 $\pm$ 1	102 $\pm$ 14	100 $\pm$ 6	109 $\pm$ 15
CoCl ₂	100 $\pm$ 4	100 $\pm$ 13	100 $\pm$ 2	103 $\pm$ 8
ZnCl ₂	92 $\pm$ 5	92 $\pm$ 11	100 $\pm$ 8	90 $\pm$ 7
MnCl ₂	100 $\pm$ 3	100 $\pm$ 3	100 $\pm$ 4	100 $\pm$ 14
AlCl ₃	93 $\pm$ 4	56 $\pm$ 2	100 $\pm$ 1	52 $\pm$ 4
KCl	100 $\pm$ 1	100 $\pm$ 16	100 $\pm$ 2	99 $\pm$ 10
HgCl ₂	0	0	0	0
CuSO ₄	64 $\pm$ 7	12 $\pm$ 3	80 $\pm$ 2	16 $\pm$ 3
NH ₄ Cl	100 $\pm$ 2	NA	100 $\pm$ 7	NA
FeSO ₄	90 $\pm$ 9	51 $\pm$ 9	56 $\pm$ 1	49 $\pm$ 7
AgNO ₃	100 $\pm$ 4	83 $\pm$ 6	69 $\pm$ 6	79 $\pm$ 7
β -Mercaptoetanol	100 $\pm$ 1	NA	100 $\pm$ 8	NA

Dados representam médias $\pm$ DV de seis experimentos diferentes. NA = não avaliado

Fig.22. Estabilidade das β -glucosidases I (●) e II (○) glicosiladas frente a diferentes concentrações dos sais de íons metálicos ZnCl₂ (A), AlCl₃ (B) e CuSO₄ (C).

Fig.23. Estabilidade das β -glucosidases I (○) e II (●) deglicosiladas por PNGaseF frente a diferentes concentrações dos sais de íons metálicos AlCl_3 (A), CuSO_4 (B), FeSO_4 (C) e AgNO_3 (D).

4.2.4. Parâmetros cinéticos

A enzima β -glucosidase I exibiu valores de K_m e V_{max} iguais a $0,89 \pm 0,06 \text{ mM}$ e $13,89 \pm 0,07 \text{ U mg prot}^{-1}$ ($n = 6$) para pNP-glu e $5,49 \pm 0,3 \text{ mM}$ e $2,10 \pm 0,04 \text{ U mg prot}^{-1}$ ($n = 6$) para celobiose, respectivamente. A eficiência catalítica, determinada pela relação V_{max}/K_m , foi de $16,15 \pm 0,13 \text{ U/(mg.mM)}$ para pNP-glu e $0,38 \pm 0,18 \text{ U/(mg.mM)}$ para celobiose. β -glucosidase II foi muito similar, com K_m e V_{max} iguais a $0,60 \pm 0,06 \text{ mM}$ e $16,24 \pm 0,29 \text{ U mg prot}^{-1}$ ($n = 6$), respectivamente. Os valores de K_m e V_{max} determinados para celobiose foram de $4,45 \pm 0,08 \text{ mM}$ e $2,44 \pm 0,12 \text{ U/mg}$ de proteína ($n = 6$). A eficiência catalítica, determinada pela relação V_{max}/K_m , foi de $27,07 \pm 0,35 \text{ U/(mg.mM)}$ para pNP-glu e $0,55 \pm 0,20 \text{ U/(mg.mM)}$ para celobiose.

As enzimas apresentaram inibição por substrato sintético em concentrações acima de $1,0 \text{ mM}$ e inibição competitiva pelo produto (glicose) (dados não apresentados), com constante para o complexo de dissociação da enzima-inibidor (K_i), determinado pelo gráfico de Lineweaver-Burk e Dixon (Dixon & Webb, 1964), em reação com pNP-Glu, de $1,77 \pm 0,26 \text{ mM}$ ($n = 6$) para β -GI e $1,89 \pm 0,06 \text{ mM}$ ($n = 6$) para β -GII, valores não distinguíveis visto o número de repetições e o erro observado.

Após deglicosilação com PNGase F, K_m e V_{max} , verificados somente para celobiose, substrato natural, foram alterados para $4,67 \pm 0,23 \text{ mM}$ e $2,18 \pm 0,30 \text{ U.mg prot}^{-1}$, respectivamente, para β -GI, e para $4,32 \pm 0,33 \text{ mM}$ e $2,14 \pm 0,45 \text{ U.mg prot}^{-1}$ para β -GII, alterações não significantes a $P=0,05$ e $N=6$. Os resultados estão sumarizados na Tabela 6.

Tabela 6Parâmetros cinéticos das enzimas β -glucosidase 1 e 2 purificadas.

Enzima	Substrato	não deglicosiladas		deglicosiladas	
		K_m (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ (U/mg)	K_m (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ (U/mg)
β -G1	pNP-glu	0,89 $\pm$ 0,06	13,89 $\pm$ 0,07	ND	ND
	celobiose	5,49 $\pm$ 0,3	2,10 $\pm$ 0,04	4,67 $\pm$ 0,23	2,18 $\pm$ 0,30
β -G2	pNP-glu	0,60 $\pm$ 0,06	16,24 $\pm$ 0,29	ND	ND
	celobiose	4,45 $\pm$ 0,08	2,44 $\pm$ 0,12	4,32 $\pm$ 0,33	2,14 $\pm$ 0,45

Resultados são médias + EP de seis experimentos diferentes. ND= não disponível.

4.2.5. Sinergismo entre glicoformas

Forte sinergismo entre β -glucosidases I e II foi verificado sobre celobiose acima de pH 5,5 (Figura 24) e sobre oligossacarídeos (Figura 25). Sobre substratos oligoméricos, o sinergismo foi intensificado em soluções de celooligossacarídeos sem glucose e celobiose residuais (obtidas por meio de purificação dos hidrolisados de papel de filtro em TLC), implicando atividade sinérgica dependente dos processos de inibição por substrato e produto. Suportando esta observação, encontra-se a inversão do componente com atividade máxima após remoção de celobiose e glucose da solução de reação inicial (Figura 25A). A deglicosilação por PNGaseF eliminou o sinergismo observado anteriormente, resultado que aponta, pela primeira vez, a existência de sinergismo entre glicoformas e a dependência deste fenômeno frente à características bioquímicas influenciadas pela variação gerada nas interações com o ambiente eletrolítico (Figura 24A e 25B).

Fig. 24. Sinergismo sobre celobiose dependente do pH. **A-** Comparação das atividades individuais, esperada com a mistura, observada com a mistura de ambas as enzimas e da mistura de enzimas deglicosiladas com PNGaseF. ● – β-glucosidase I; ○ – β-glucosidase II; ▲ - atividade observada da mistura de ambas após deglicosilação; Δ – antes da deglicosilação; (---) – valor esperado sem sinergismo (Σ dos valores observados para cada enzima separadamente). **B** – Aumento observado na atividade sinérgica frente aos valores esperados para cada pH. Foram empregadas as mesmas quantidades de cada enzima em todos os ensaios. Resultados representam médias de 4 experimentos diferentes.

Fig. 25. Sinergismo sobre celooligossacarídeos. Barras cheias – atividade das β -glucosidases I e II glicosiladas sobre celooligossacarídeos purificados (sem glucose e celobiose). Barras hachuradas – atividade das enzimas glicosiladas sobre celooligossacarídeos brutos (contendo glucose e celobiose residuais). Barras vazias – atividade das enzimas deglicosiladas por PNGaseF sobre celooligossacarídeos purificados. Esperado: valor esperado correspondente a β -GI + β -GII. Observado: valor observado para β -GI + β -GII.

4.3. Componente extracelular da atividade β -glicosidásica

Avaliação prévia da composição β -glicosidásica extracelular de *A. versicolor* não apontou isozimas geradas por glicosilação, mas um outro tipo de fenômeno produtor de multiplicidade em avaliações bioquímicas: agregação.

4.3.1. Co-purificação de fosfatase e β -glicosidase e confirmação de heteroagregação

Foram empregados filtrados de culturas de *A. versicolor* mantido em farelo de trigo por 96h, primeiro meio onde foi identificado co-migração de fosfatase e β -glicosidase (Figura 26). Embora os registros qualitativos de atividade enzimática, seja fosfatásica ou β -glicosidásica, tenham se mostrado variáveis, a co-migração eletroforética foi constante nos três outros meios observados, celobiose, xilana e xilose (Figura 26).

Fig. 26. Zimogramas (atividade em PAGE 8,9 6%) do filtrado extracelular de culturas em meio líquido de *A. versicolor* crescido em diferentes fontes de carbono.

A purificação da atividade β -glicosidásica extracelular empregou meios líquidos de farelo de trigo com 96h de cultivo e duas etapas de purificação, DEAE-Sephacel e Octyl-Sepharose, ambas calibradas em pH 6,0, sem sucesso de separação da atividade fosfatásica da β -glicosidásica (Figura 27A e B, respectivamente). A co-purificação foi completada com estes dois processos cromatográficos. Octyl-Sepharose é importante para remoção de contaminantes que produzem rastros no *front* do gel de eletroforese. Outras cromatografias (DEAE-celulose, Sephadex G-100 e Con-A Sepharose, dados não apresentados) não foram capazes de separar ambas as enzimas. Somente DEAE-celulose calibrada nas mesmas condições acrescida de 1mM CoCl_2 (Figura 27C) ou NaCl acima de 2,6M (dado não apresentado) foram capazes de separar ambas as atividades, mostrando que são realmente enzimas diferentes. PAGE das frações ativas obtidas de Octyl-Sepharose mostraram uma única banda (Figura 28, raia 1), enquanto que PAGE em presença de 1mM CoCl_2 revelou duas bandas (Figura 28, raia 2), confirmando o caráter desagregador do íon cobalto. SDS-PAGE mostrou, igualmente, duas bandas (Figura 28, raia 3). SDS-PAGE das enzimas recromatografadas em DEAE-celulose em presença de 1,0 mM CoCl_2 apresentaram, entretanto, uma banda cada: a de migração mais rápida, com 98,6 kDa, correspondente à β -glicosidase (Figura 28, raia 4), e uma mais lenta, de 204 kDa, correspondente à fosfatase (Figura 28, raia 5). As enzimas isoladas foram dialisadas, tratadas com 10 mM de EDTA, misturadas e submetidas a eletroforeses em PAGE e SDS-PAGE não desnaturante, sendo obtido novamente uma única banda, comprovando a agregação (Figura 28, raias 6 e 7, respectivamente). Deglicosilação por PNGaseF não desagregou as enzimas (Figura 28, raia 8). Os resultados do processo de purificação do heteroagregado, concluído com

55,17U de atividade β -glicosidásica e 19,47U de atividade fosfatásica ácida, estão sumarizados na Tabela 7.

Tabela 7Co-purificação de β -glicosidase e fosfatase extracelulares de *Aspergillus versicolor*

Enzima	Etapas	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	Atividade específica (U.mg.proteína ⁻¹)	Purificação (X)	Rendimento (%)
B-Glicosidase	Filtrado	1510.20 $\pm$ 0.23	151.23 $\pm$ 2.45	0.10 $\pm$ 0.20	1	100
	DEAE-Sephacel	363.41 $\pm$ 0.21	149.00 $\pm$ 1.32	0.41 $\pm$ 0.53	4.1	98.54
	Octyl-Sepharose	324.55 $\pm$ 0.60	55.17 $\pm$ 1.23	0.17 $\pm$ 0.09	1.7	36.48
Fosfatase	Filtrado	1510.20 $\pm$ 0.23	90.61 $\pm$ 3.45	0.06 $\pm$ 0.03	1	100
	DEAE-Sephacel	363.41 $\pm$ 0.21	54.51 $\pm$ 2.67	0.15 $\pm$ 0.09	1.5	60.16
	Octyl-Sepharose	324.55 $\pm$ 0.60	19.47 $\pm$ 1.87	0.06 $\pm$ 0.02	1.0	21.49

Resultados são referentes a médias de 6 purificações.

Fig. 27. Co-purificação de fosfatase (▲) e β -glicosidase (●) em DEAE-Sephacel (A) e Octyl-Sepharose (B). (C) - cromatografia em DEAE-Sephacel em presença de 1,0 mM CoCl_2 . (○) Absorbância a 280nm.

Fig. 28. Eletroforeses das enzimas co-purificadas em PAGE 6% (1, 2, 6 e 8) e SDS-PAGE 7.5% (3) e 6% (4, 5 e 7). A: 1- Co-purificado de Octyl-Sepharose. 2- Perfil eletroforético do co-purificado em presença de 1mM CoCl₂. 3- SDS-PAGE do co-purificado. 4- β -glicosidase isolada. 5- fosfatase isolada. 6- PAGE das enzimas reagrupadas em presença de 10mM EDTA. 7- SDS-PAGE das enzimas reagrupadas em presença de 10mM EDTA. 8- PAGE do agregado deglicosilado por PNGaseF.

4.3.2. Caracterização bioquímica

4.3.2.1. Efeitos do pH e temperatura

Antes da desagregação, ambas as enzimas mostraram mais de 80% de suas atividades entre 45 e 65°C, com máximo em 55°C e curvas de temperatura muito similares (Figura 29). Estabilidade térmica de ambas a 45°C e 55°C também foram similares, com curvas monofásicas, embora fosfatase tenha-se mostrado menos estável (Figura 30). Desagregação reduziu levemente os resultados anteriores. As curvas de pH, entretanto, divergiram entre ambas as enzimas, agregadas ou não (Figura 31). No entanto, quando agregadas, o pH ótimo foi igual a 5,5 para ambas as enzimas (Figura 31, símbolos vazios). A faixa ótima de pH suportado pela β -glicosidase em agregação foi maior que o da fosfatase, cuja atividade decresceu bruscamente acima de pH 5,5 (Figura 31B). Desagregação alterou os resultados observados, acidificando ambos os pH ótimos (Figura 31, símbolos cheios) e restringindo a extensão do raio de ação frente a diferentes pH.

Fig. 29. Temperatura ótima (A) em agregação e (B) após desagregação. (●) β -glicosidase; (○) fosfatase.

Fig. 30. Estabilidade térmica a 45°C (círculos) e 55°C (quadrados), antes (símbolos cheios) e depois (símbolos vazios) da desagregação. A- β -glicosidase; B- fosfatase.

Fig. 31. pH ótimo das atividades β -glicosidásica (A) e fosfatásica (B). (●) Agregadas; (○) Desagregadas.

4.3.2.2. Efeito de sais de íons metálicos, EDTA e β -mercaptoetanol

A β -glicosidase não foi ativada por nenhum sal de íon metálico aqui empregado, apresentando inibição de 57,23% por cobalto e forte inibição por HgCl_2 , CuSO_4 e AgNO_3 . Fosfatase diferiu: enquanto foi fortemente inibida por HgCl_2 e CuSO_4 tal como a β -glicosidase, apresentou ativação quando em presença de BaCl_2 , MnCl_2 , FeSO_4 , CaCl_2 e CoCl_2 . CoCl_2 foi o mais forte ativador (260,12%) (Tabela 8). A ativação mediada por cobalto foi gradual, com máximo entre 0,8 e 1,0mM (Figura 32). Entretanto, este resultado não foi devido a um efeito do íon diretamente sobre a atividade, mas pela desagregação induzida por este, uma vez que a quelação do cobalto (por 10mM EDTA) existente nas soluções das enzimas isoladas não alterou as modificações observadas nas atividades (Tabela 9).

Tabela 8Efeito de sais de íons metálicos, EDTA e β -mercaptoetanol

Efator [1mM]	β -glicosidase Atividade (%)	Fosfatase Atividade (%)
controle	100.00	100.00
NH ₄ Cl ₂	98.18	134.90
β -ME	83.54	87.98
MnCl ₂	97.01	186.80
EDTA	100.07	90.91
AlCl ₃	93.65	89.74
MgCl ₂	105.27	108.50
CoCl ₂	57.23	260.12
HgCl ₂	6.02	0.00
CuSO ₄	6.28	0.00
AgNO ₃	22.59	63.34
BaCl ₂	106.51	121.41
FeSO ₄	105.46	180.06
CaCl ₂	106.70	128.15
KCl	105.18	89.74
ZnCl ₂	81.55	26.39

Resultados são médias de seis experimentos diferentes.

Fig. 32. Determinação da concentração ótima de CoCl_2 para máxima atividade fosfatásica ácida extracelular de *A. versicolor* crescido em farelo de trigo.

Tabela 9Efeito de CoCl₂ sobre a agregação de fosfatase e β -glicosidase

Condição	Enzima	Atividade (%)		
		controle	1mM CoCl ₂	EDTA
Agregada	fosfatase ácida	100.00	261.80	100.00
	β -glicosidase	100.00	56.98	100.00
Desagregada em CoCl ₂	fosfatase ácida	262.21		219.43
	β -glicosidase	54.32		61.21

Resultados são médias de seis experimentos diferentes.

4.3.2.3. Especificidade enzimática

Atividade β -glicosidase foi inespecífica tanto para substratos sintéticos quanto para naturais, dissacarídicos ou polissacarídicos. No entanto, atividade elevada foi observada somente em celobiose e pNP-glu. Atividades próximas, embora inferiores a 50% da observada sobre pNP-glu, foi verificada sobre oNP-gal, pNP-xil ou pNP-P. Excluído atividade fosfatásica, todas as outras foram geradas pelo mesmo sítio catalítico ativo sobre pNP-glu e celobiose, tal como verificado em ensaios com misturas de substratos (Tabela 10). A atividade sobre pNP-P foi verificada como produto de um segundo sítio catalítico por meio de misturas de substratos, uma vez que a atividade sobre pNP-P e pNP-glu se somaram, e celobiose não gerou interferências detectáveis na atividade fosfatásica (Tabela 10). Tais resultados estão de acordo com a já demonstrada agregação destas duas enzimas, fosfatase e β -glicosidase.

A β -glicosidase, agregada ou não, mostrou-se ativa sobre Avicel, liberando unicamente glicose (Figura 33). Também se mostrou ativa sobre xilana, produzindo xilooligossacarídeos e xilose, e sobre farelo de trigo (FT), gerando glicose além de xilose e xilooligosacarídeos (Figura 33). Todas as atividades da β -glicosidase foram verificadas como pertencentes a um mesmo sítio catalítico, como evidenciado pela redução da atividade com misturas entre substratos dissacarídicos e polissacarídicos (Tabela 10). Já a fosfatase, desagregada ou não, mostrou-se ativa sobre farelo de trigo e fitato de sódio, além de pNP-P, liberando apenas fosfato inorgânico (Tabela 10).

Tabela 10Especificidade das enzimas co-purificadas de *A. versicolor*.

Substratos sintéticos (2mg/mL)	Atividade (%)
pNP-glu	100.00
pNP-xil	17.98
pNP-a-ara	12.56
oNP-gal	9.22
pNP- α -glu	0.00
pNP-P	49.33
pNP-gal	48.69
pNP-P + pNP-glu	148.91
pNP-P + 10mM celobiose	47.98
pNP-P + 10mM glucose	49.32
pNP-P + fitato de sódio (2mg/mL)	35.33
pNP-P + 25mg farelo de trigo	38.41
pNP-glu + pNP-gal	74.55
pNP-glu + pNP-xil	81.46
pNP-glu + pNP-ara	96.85
pNP-glu + oNP-gal	90.33
pNP-glu + 25mg farelo de trigo	38.88
Substratos naturais (10mg/mL)	Atividade (%) (β -glicosidase)
celobiose	100.00
Avicel	7.86
celobiose + Avicel (1:1)	93.40
rafinose	ND
CMC	ND
lactose	ND
farelo de trigo - GOD	25.21
farelo de trigo - DNS	12.33
farelo de trigo + celobiose-GOD	88.67
Substratos naturais (10mg/mL)	Atividade (%) (fosfatase)
fitato de sódio	100.00
farelo de trigo	57.67
fitato de sódio + farelo de trigo (1:1)	75.33

Dados são médias de 6 experimentos diferentes.

FT (farelo de trigo), Avicel e CMC foram determinados com GOD.

DNS detectou atividade sobre Avicel e CMC. Atividade sobre rafinose e lactose foram mensuradas com DNS.

Fig. 33. TLC dos produtos de hidrólise enzimática gerados pela atividade β -glicosidásica extracelular de *Aspergillus versicolor* sobre Avicel (4) e farelo de trigo (6). Controles: 1- agregado; 2- Avicel; 3- glucose; 5- farelo de trigo.

4.3.3. Adsorção em farelo de trigo

52,17% da atividade fosfatásica adsorveu em farelo de trigo, isolada ou agregada com β -glicosidase. Em agregação, atividade se reduz, mas a porcentagem de adsorção foi similar (50,15%). Tal resultado mostrou que a agregação não alterou a capacidade de adsorção da fosfatase a farelo de trigo, pois esta foi confirmada por meio do valor observado 2x maior que o esperado (o qual é igual ao valor existente no volume de solução retido por farelo de trigo, verificado como correspondente a 200 μ L) (Figura 34A). A β -glicosidase apresentou resultados diferentes. 14,17% da atividade β -glicosidásica foi observada em farelo de trigo, muito inferior ao esperado (Figura 34B). O valor de atividade retida em farelo de trigo, reduzida em 38,46%, foi consistente com a inibição registrada por 100mg de farelo de trigo (igual a 63,34%, Figura 35). Esse resultado sugere, em conjunto com os valores registrados de enzima no sobrenadante ou no lavado, inexistência de adsorção em farelo de trigo. Quando agregada com fosfatase, foram verificados 39,15% do total de atividade registrada em farelo de trigo, valor acima do registrado para enzima isolada (Figura 34). Contudo, este valor, aparentemente, foi subestimado, devido à inibição provocada por farelo de trigo e variações de atividade provocadas pela agregação. Resultados com enzima reagregada mostraram as dificuldades em lidar com esta variação, uma vez que a reagregação não foi, em nenhum dos experimentos, completa. Assim, as unidades de β -glicosidase em farelo de trigo podem ser 2x maiores (barras superpostas ao registro observado). A forte redução de atividade no sobrenadante e no lavado corrobora com a retenção de enzima agregada ou reagregada em farelo de trigo.

Fig. 34. Adsorção das enzimas do agregado em farelo de trigo. S- Sobrenadante (não adsorvido) – 1mL; W- Lavado (não adsorvido) – 1mL; WS- porcentagem de atividade mensurada em 100mg de farelo de trigo – corresponde a um volume de retenção de 200μL. A – Fosfatase: Barras pretas: desagregada (1,81U aplicados; 1,15U observados); Barras brancas: reagregada (0,67U aplicado; 0,44U observado); Barras hachuradas: agregado (0,23U aplicado; 0,22U observado). B – β-glicosidase: Barras pretas: desagregada (0,64U aplicado; 0,45U observado); Barras brancas: reagregada (1,94U aplicado; 0,57U observado); Barras hachuradas: agregado (1,64U aplicado; 0,45U observado); * Barras de Extensão: valor esperado sem inibição por 100mg de Farelo de Trigo.

Fig. 35. Inibição da atividade β -glicosidásica em heteroagregado por farelo de trigo.

4.3.4. Parâmetros cinéticos

Antes da desagregação, β -glicosidase apresentou cinética Michaeliana e K_m , V_{max} e K_i (para glucose) de hidrólise de pNP-glu igual a $0,39 \pm 0,08 \text{ mM}$, $0,17 \pm 0,03 \text{ U/mg}$ and $0,22 \pm 0,02 \text{ mM}$ ($N=4$, $P=0,05$), respectivamente (Figura 36A). Inibição apresentou $\sigma = 0,32$ e $\beta = 2,14$, isto é, inibição do tipo C2, ou mista hiperbólica, cujo estado enzima-substrato-inibidor (ESI) é catalítico. A fosfatase agregada apresentou K_m , V_{max} e K_i (para fosfato) para hidrólise de pNP-P iguais a $0,76 \pm 0,04 \text{ mM}$, $0,06 \pm 0,02 \text{ U/mg}$ ($N=4$, $P=0,05$) e $4,44 \pm 0,04 \text{ mM}$ ($N=3$, $P=0,05$), respectivamente (Figura 36B e C).

Desagregada, a β -glicosidase mostrou-se 2x menos ativa em relação ao estado heteroagregado, apontando influência positiva da fosfatase sobre sua atividade. Os parâmetros cinéticos após desagregação foram iguais a $0,19 \pm 0,05 \text{ mM}$, $0,08 \pm 0,03 \text{ U/mg}$ e $0,12 \pm 0,02 \text{ mM}$ ($N=4$, $P=0,05$) para K_m , V_{max} e K_i , respectivamente (Figura 37A). Fosfatase desagregada também apresentou modificação nos parâmetros cinéticos K_m , V_{max} e K_i , alterados para $1,01 \pm 0,02 \text{ mM}$, $0,18 \pm 0,03 \text{ U/mg}$ ($N=4$, $P=0,05$) e $8,11 \pm 0,06 \text{ mM}$ ($N=3$, $P=0,05$), respectivamente (Figura 37B e C).

O sal NaH_2PO_4 , empregado inicialmente como inibidor da fosfatase, apresentou influências sobre a atividade β -glicosidásica quando utilizado em concentrações acima de 50 mM , reduzindo-a em 21,7% (Figura 38A). Entretanto, outros sais (MES e NaCl) não produziram efeito algum nas mesmas condições (Figura 38B).

A fosfatase também mostrou atividade hidrolítica sobre farelo de trigo, removendo fosfato presente neste substrato (previamente lavado e fervido) com K_m igual a $8,48 \pm 1,34 \text{ mg/mL}$ e V_{max} igual a $1,70 \pm 0,74 \text{ U/mg}$, quando agregada (Figura 39).

Desagregadas, nenhuma das enzimas mostrou-se suscetível ao substrato utilizado pela outra (Figuras 40A e B).

Fig. 36. Estudos da ação dos componentes β -glicosidásico (em presença e ausência de glucose) (A); e fosfatásico (B – em presença e ausência de celobiose; e C – em presença de fosfato inorgânico), enquanto agregados, sobre seus respectivos substratos.

Fig. 37. Atividades glicosidásica (A) e fosfatásica (B) tomadas após desagregação, no pH ótimo de funcionamento dos componentes desagregados. C - Inibição da atividade fosfatásica por PO_4 após desagregação.

Fig. 38. Efeito de fosfato sobre a atividade celobiásica. A- Atividade β -glicosidásica agregada em presença de diferentes concentrações de fosfato. B- Cinética de hidrólise de celobiose em presença de diferentes sais a 0,6M.

Fig. 39. Atividade fosfatásica agregada sobre farelo de trigo.

Fig. 40. Atividades fosfatásica (A) e β -glicosidásico (B) após desagregação. Nota-se ausências de interferências por celobiose sobre fosfatase, e de pNP-P sobre celobiase.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

5.1. A multiplicidade em *Aspergillus versicolor* – a influência da glicosilação e hipótese sobre os componentes dos carboidratos covalentemente ligados à Asn

Embora a constatação da existência de múltiplos componentes seja corriqueira (Sharma et al., 2002) e que, em uma primeira análise, não exista, aparentemente, regra para o número de componentes observados, os quais podem atingir valores expressivos, a multiplicidade é notável e carece de análise experimental para o estabelecimento da significação, se é que existe alguma, da produção de diferentes componentes que executam uma mesma função. Em geral, mesmo avaliações mais finas da natureza de seus constituintes são escassas, sendo motivo de muita especulação. Neste trabalho aqui apresentado, foram isoladas duas formas de β -glucosidase em *Aspergillus versicolor*, freqüentes em micélios cultivados em diversas fontes de carbono (Figuras 12, 13 e 14). Ambas foram demonstradas como de superfície micelial (Figura 12) e portadoras de mesmo núcleo protéico modificado por glicosilação levemente diferenciada entre cada glicoforma (Figuras 15C e 16), ampliando a gama de pH ótimo de funcionamento das glicoformas, que, em conjunto, cobriram toda a faixa de pH encontrada nos diversos meios de cultivo (Figura 18A). Embora tal constatação seja simples, já associa a multiplicidade de formas enzimáticas responsáveis por uma mesma atividade às características ambientais, inferência fortemente suportada pelos resultados fisiológicos para as β -xilosidases.

Estas duas β -xilosidases miceliais foram observadas em grande quantidade na superfície das hifas (Figura 1) e diferiram uma da outra quanto à glicosilação, primordialmente quanto à abundância de galactose, maior no componente oriundo de xilana, mais glicosilado (Figura 7), e, possivelmente, quanto aos sítios de glicosilação

ocupados, visto os resultados comparados de PAGEs das enzimas deglicosiladas por EndoH e PNGaseF (Figura 4). Neste caso, ao contrário do observado para β -glucosidases I e II, verificou-se a dependência da fonte de carbono para a seleção do componente sintetizado, indicando a existência de um controle de glicosilação (Figura 3).

Outro aspecto importante observado foi a relação do pH do meio com a fonte de carbono, pH este regulado pelo fungo e condizente com o pH da enzima observada na superfície micelial (Tabelas 1 e 2, Figura 3). Observou-se, igualmente, que nas 10 primeiras horas de incubação, foram produzidas múltiplas atividades enzimáticas, as quais desapareceram após 48h, período no qual uma única forma de xilosidase, existente já no *pool* inicial de atividades, passou a predominar. Tal resultado levanta a possibilidade de que o fungo testa seu meio ambiente e o altera mediante a fonte de carbono existente para seu uso, alcançando um “ótimo de desempenho” ao selecionar a forma enzimática cujo pH de ação é condizente com o do meio ambiente, o qual também foi alterado pelo microorganismo.

Vale ressaltar que os experimentos de deglicosilação foram efetuados com duas enzimas distintas, EndoH, específica para *High mannose*, e PNGaseF, inespecífica, gerando resultados diferentes. Em geral, para pH e íons, o tratamento com PNGaseF foi mais efetivo, alterando, e igualando, os parâmetros das duas β -glucosidases avaliadas (Figuras 18 e 21, Tabela 5). Comportamento destoante foi observado para β -xilosidases do mesmo organismo, para as quais EndoH já foi suficiente para a aproximação das características. PNGaseF, neste caso, eliminou atividade remanescente das duas enzimas (Figuras 9, 10 e 11, Tabela 3).

Pode-se levantar alguns aspectos em comum para as β -glucosidases avaliadas. Uma vez que a porcentagem de açúcar remanescente após ambos os tratamentos foi idêntica, a migração, tanto em PAGE quanto em SDS-PAGE, igual (Figura 15), e a adsorção das enzimas por ConA, após tratamento com EndoH, inexistente (Figura 16), infere-se que a constituição de carboidrato das glicoformas seja pouco destoante, composta principalmente de *High mannose* ou algum tipo híbrido seu. Dessa maneira, a principal diferença entre tratamentos por EndoH e PNGaseF seria a permanência do resíduo de NAcGlc na molécula após tratamento com EndoH, diferença esta possivelmente responsável pelos resultados de pH ótimo obtidos com enzimas em suas segundas conformações estáveis (Figura 21). Caso esta inferência seja correta, um único resíduo seria suficiente para gerar alterações bruscas na curva de potencial de superfície da molécula de proteína, influenciando a dinâmica molecular e, por conseguinte, o processo de catálise, baseado em transferência de prótons. Isto relegaria à estrutura imensa de açúcar um papel secundário, relacionado com a ampliação das faixas ótimas de atividade frente a pH, explicando observações reportadas na literatura sobre enzimas de *Aspergillus* deglicosiladas por EndoH, as quais, em geral, apontam para alterações marginais de parâmetros bioquímicos e cinéticos (Eriksen et al., 1998; Kalisz et al., 1991). Somente estudos de dinâmica molecular com compostos radioativos revelaram alterações de comportamento bioquímico (Rudd et al., 1994; Kohen et al., 1997; Dumoulin et al., 1999). O comportamento das β -xilosidases avaliadas, no entanto, é antagônico frente a esta hipótese, uma vez que a deglicosilação por EndoH foi efetiva para o igualamento das características bioquímicas. Entretanto, a eliminação de qualquer atividade residual remanescente após tratamento por PNGaseF mostraram a relevância dos resíduos não removidos por EndoH na estabilidade estrutural das

enzimas estudadas. Mesmo assim, a observação de adsorção em ConA após digestão por EndoH (Figura 8) e a riqueza em galactose indicaram a presença de estruturas de porte relevante (biantenárias ricas em galactose), as quais podem ser relevantes nessa estabilização. Salvo estas diferenças, ficou claro que a glicosilação foi a responsável pelas alterações bioquímicas, provavelmente por canalização de interações entre superfície molecular e meio eletrolítico, como pôde ser inferido com base nos resultados de suscetibilidade a íons e pH.

Uma segunda questão levantada, diferente da importância do resíduo de NAcGlc, refere-se à alta porcentagem de carboidrato encontrada nas enzimas e à localização celular destas, predominantemente superficial. Visto que tais estruturas de carboidrato são inegavelmente volumosas (um resíduo de açúcar pode ser 5x mais volumoso que um resíduo de carboidrato), seria a glicosilação responsável pela retenção, ao menos por certo período de tempo, destas enzimas no espaço periplasmático? Vale lembrar que o aumento do raio molecular aumenta o coeficiente friccional e o arrasto, tão bem como reduz o movimento browniano. Igualmente importante, a atividade glicosidásica pôde ser extraída da superfície micelial por meio de lavagens sucessivas com solução isotônica de Vogel ou tão somente água destilada, indicando que estas enzimas não estão adsorvidas ou ligadas covalentemente às estruturas da superfície celular (parede celular, membrana).

5.2. O novo tipo de sinergismo – glicoformas de uma mesma enzima atuando cooperativamente

Quatro tipos de sinergismo haviam sido descritos entre celulasas fúngicas: a- entre endoglucanase e celobiohidrolase (CBH) (Wood et al., 1989, 1988); b- entre duas

CBHs distintas em seqüência e sensibilidade a mesmos anticorpos (Wood et al., 1986; Kyriascou et al., 1987); c- entre β -glucosidase e endoglucanase ou CBH (Eriksson et al., 1985); e d- entre C1, a CBM(*carbohydrate binding module*)/expansina, e endoglucanase (Wood et al., 1979). Contudo, o sinergismo entre CBH I e II de *Trichoderma reesei* pôde ter sido gerado por traços de endoglucanase na preparação (Bhat et al., 1997), e CBH I e II de *Penicillium pinophilum*, quando preparadas livres de endoglucanase, atuaram sinergisticamente por pouco tempo durante a hidrólise de celulose cristalina (Wood et al., 1989).

Neste trabalho, foi verificado um novo tipo de sinergismo, que ligou diretamente a diversidade de glicoformas de β -glucosidases com sua funcionalidade (Figuras 24 e 25). Trata-se de sinergismo entre glicoformas de um mesmo componente protéico, o qual é eliminado por meio de deglicosilação por PNGaseF (Figuras 24A e 25B). Uma vez que este foi realizado em pHs diferentes dos ótimos para cada enzima (Figura 24B), ou sobre substratos oligoméricos (Figura 25), os quais não são os substratos preferenciais para estas glicoproteínas, tal sinergismo parece estar vinculado a diferenças cinéticas que refletem interações entre proteína e meio tampão circundante.

5.3. O componente extracelular – β -glucosidase inespecífica agregada com fosfatase ácida

A purificação do hetero-agregado mostrou-se rápida, com dois passos, o primeiro em DEAE-Sephacel, igualmente ao utilizado para os componentes miceliais, e o segundo, em Octyl-Sepharose, passo que comumente retém fosfatases ácidas (Figura 27).

Dentre as características bioquímicas verificadas, a inibição mista-hiperbólica do componente celobiásico implica em capacidade hidrolítica mesmo sob condição repressora e, portanto, capacidade de operar em maiores concentrações de substratos e produtos (Figura 36). Já a inespecificidade revela enzima multifuncional, e a hidrólise de pNP-gal, mas não de lactose, mostra possível participação desta enzima na degradação de galacto(gluco)mananas (Tabela 10). A atividade catalítica do componente β -glicosidásico mostrou-se presente sobre compostos celooligoméricos. A atividade sobre Avicel, produzindo unicamente glucose (Figura 33), embora fraca, é surpreendente, pois demonstra a existência de atividade celobiohidrolásica em *Aspergillus versicolor*, a qual era, até o presente momento, considerada inexistente (Carmona et al., 1997).

Um dos aspectos intrigantes do heteroagregado foi seu comportamento frente a cobalto (Tabela 9). A ativação incomum do componente fosfatásico, somada a uma curva gradual de ativação por concentrações crescentes de cobalto foram fatores intrigantes que levaram à exploração dos efeitos deste íon sobre o agregado. Os exames eletroforéticos revelaram seu efeito desagregador, que culminou em alterações de curvas de pH, à semelhança das mudanças provocadas pela deglicosilação. Tal fenômeno, aparentemente, provém de interferências eletrônicas e /ou conformacionais promovidas pela carga e volume do íon. Efeito semelhante foi obtido com elevadas concentrações de NaCl (superiores a 2,7M) sobre agregados adsorvidos em caulim, embora com perdas significativas de ambas as atividades enzimáticas (dado não apresentado). Tal resultado mostra, no entanto, que alterações conformacionais geradas pelas características eletrolíticas do meio são tais que desagregam o componente extracelular. Também apontam para possível retenção do componente extracelular em

argila, uma vez que caulim é um tipo de argila. Dessa forma, o agregado permaneceria nas proximidades do micélio, a estrutura de exploração do ambiente, resistindo à processos de lixiviação e solubilização. Assim, sua atividade poderia ser mais bem aproveitada pelo microorganismo em questão.

Os efeitos de ativação e inibição constatados sob cobalto foram demonstrados como oriundos da desagregação (Tabela 9). Este resultado levanta implicações fisiológicas, visto ter mostrado que a agregação, mas não o íon metálico, é responsável pelo aumento da atividade celobiásica e redução da fosfatásica. Aparentemente, a complexação tem importante papel na flexibilidade funcional do componente β -glicosidásico quanto à faixa ótima de pHs e manutenção de atividade em condições talvez desfavoráveis, tais como temperatura (Figuras 29, 30 e 31). Não foram percebidas alterações nas características da inibição, mista-hiperbólica, observada para glucose, indicando inexistência de trânsito de substrato entre os sítios catalíticos das duas enzimas do agregado (Figura 37).

As interferências observadas nas atividades de ambas as enzimas quando operando concomitantemente foram pequenas, mas as perturbações por fosfato ainda possibilitam a exploração deste aspecto em particular (Figura 38). Exames de hetero-agregados extracelulares de celobiase com sucrase já haviam sido reportados em *Termitomyces clypeatus* (Mukherjee *et al.*, 2000), onde a atividade celobiásica foi avaliada em presença e ausência de sacarose, revelando interferências da agregação sobre a atividade, estabilidade e conformação do componente glicosidásico envolvido. Naquele trabalho, sacarose mostrou-se, aparentemente, reguladora da atividade e estabilidade da celobiase em meio extracelular.

5.4. Adsorção de β -glicosidase a farelo de trigo dependente de fosfatase ácida agregada

A descrição de uma nova forma de agregação é um achado intrigante que abre caminhos para reinterpretação da funcionalidade das enzimas envolvidas. Geralmente, β -glicosidases são descritas como components solúveis, periplasmáticos ou ligados de alguma forma à parede celular fúngica. Até o presente momento, somente uma β -glucosidase de *Phanerochaete chrysosporium* foi descrita como dotada de módulos de ligação a carboidrato, indicando capacidade de adsorção a substrato (Lymar et al., 1995). Já celulasas e xilanases geralmente são compostas por uma arquitetura molecular de diferentes módulos, alguns dos quais podem funcionar como módulos de ligação a carboidrato (*carbohydrate binding modules*, ou CBM) (Bath et al., 1997; Shoseyov et al., 2006). Em *Trichoderma reesei*, capacidade de adesão a polissacarídeos foi identificada em hemicelulasas, endomananases e acetilxilanaestearases (Margolles-Clark et al., 1996; Stalbrand et al., 1995); CBM também foram identificadas em estearase de *Penicillium funiculosum* (Kroon et al., 2000), isomaltodextranase de *Arthrobacter globiformis* (Hatada et al., 2004) e arabinofuranosidases de *Aspergillus kawachii* e *Cellvibrio japonicus* (Bolam et al., 2004; Miyanaga et al., 2004).

Nesta presente dissertação, foi descrito um componente extracelular com atividades β -glicosidásica e fosfatásica independentes e capazes de adsorver em farelo de trigo, substrato natural para suas duas atividades (Figura 34). Entretanto, a adsorção foi comprovada como dependente unicamente do componente fosfatásico, visto que a β -glicosidase, quando separada deste, mostrou-se incapaz de adsorver em farelo de trigo nos ensaios realizados (Figura 34B). Assim, a adsorção do complexo extracelular foi dependente apenas de uma de suas enzimas integrantes. A agregação, pois, tem aparente

importância funcional não somente sobre a regulação da atividade de cada componente, mas também sobre a localização e distribuição destas atividades no substrato de suporte e nutrição do fungo em questão. No entanto, ainda não é claro se a adsorção é dependente de CBM ou de sítio catalítico, visto sua labilidade (que poderia excluir a dependência de CBM) e baixa interferência na capacidade catalítica do componente fosfatásico (que, por sua vez, poderia excluir a dependência de sítio catalítico para a adsorção).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ademark, P.; de Vries, R.P.; Stålbrand, H.; Visser, J. 1999. Cloning and characterization of genes encoding a β -mannosidase and an α -galactosidase from *Aspergillus niger* involved in galactomannan degradation. *Eur. J. Biochem.* 268:2982-2990.

Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W.; Blackwell, M. 1996. *Introductory Mycology*. John Wiley & Sons, Inc. New York, 869p.

Andrade, S.V.; Polizeli, M.L.T.M.; Terenzi, H.F.; Jorge, J.A. 2004 Effect of carbon source on the biochemical properties of β -xylosidases produced by *Aspergillus versicolor*. *Process Biochemistry* 39:1931-1938.

Aro, N.; Pakula, T.; Penttilä, M. 2005. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:719-739.

Aspinall, G.O. 1980. Chemistry of cell wall polysaccharides. (Preiss, J., Ed.) *The biochemistry of plants*. Vol. 3. pp. 473-500. Academic Press, Inc., New York.

Bagga, P.S.; Sandhu, D.K.; Sharma, S. 1990. Purification and characterization of cellulolytic enzymes produced by *Aspergillus nidulans*. *J. Appl. Bacteriol.* 68:61-68.

Bergmeyer, H.U.; Bernt, E. 1974 Determination of glucose with oxidase and peroxidase. In: *Methods of enzymatic analysis* (Bergmeyer, H.U., ed.) Vol. 3, pp. 1205-1215. Verlag/Academic Press. New York.

Bhat, M.K.; Bhat, S. 1997. Cellulose degrading enzymes and their potencial industrial applications. *Biotechnol. Adv.* 15:583-620.

Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* 3:286-290.

Biely, P.; Markovic, O.; Misloicova, D. 1985 Sensitive detection of endo-1,4-beta-glucanases and endo-1,4-beta-xylanases in gels. *Anal. Biochem.* 144:147-151.

de Boer, W.; Folman, L.B.; Summerbell, R.C.; Boddy, L. 2005. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiol. Rew.* 29:795-811.

Bolam, D.N.; Xie, H.; Pell, G.; Hogg, D.; Galbraith, G.; Henrissat, B.; Gilbert, H.J. 2004. X4 modules represent a new family of carbohydrate-binding modules that display novel properties. *J. Biol. Chem.* 279:22953–22963.

Buchert, J.; Oksanen, J.; Pere, J.; Siika-Aho, M.; Suurnäkki, A.; Viikari, L. 1998. Applications of *Trichoderma reesei* enzymes in the pulp and paper industry. In: *Trichoderma and Gliogladium* (Harman, G.E.; Kubicek, C.P., Eds.), Vol.2, pp.343-364. Taylor & Francis, London.

Carmona, E.C.; Brocheto-Braga, M.R.; Pizzirani-Kleiner, A.A.; Jorge, J.A. 1998. Purification and biochemical characterization of an endoxylanase from *Aspergillus versicolor*. *FEMS Microbiol. Lett.* 166:311-315.

Carmona, E.C.; Pizzirani-Kleiner, A.A.; Monteiro, R.T.R.; Jorge, J.A. 1997. Xylanase production by *Aspergillus versicolor*. *J. Basic Microbiol.* 37:387-394.

Carpita, N.C.; Gibeaut, D.M. 1993. Structural models of primary cell wall in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3:1-30.

Christgau, S.; Kauppinen, S.; Vind, J.; Kofod, L.V.; Daldog, H. 1994. Expression cloning, purification and characterization of β -1,4-mannanase from *Aspergillus aculeatus*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 33:917-925.

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

Dea, I.C.M.; Morrison, A. 1975. Chemistry and interactions of seed galactomannans. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 31:241-312.

Desvaux, M. 2005. *Clostridium cellulolyticum*: model organism of mesophilic cellulolytic clostridia. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:741-764.

Dixon, M.; Webb, E.C. 1964. Enzyme inhibitors. In: *Enzymes*. 2nd ed. ch. VIII, pp. 315-359. Academic Press, Inc., New York.

Doi, E.; Shibata, D.; Matoba, T. 1981. Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. *Anal. Biochem.* 118:173-184.

Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28:350-356.

Ebringerová, A.; Heinze, T. 2000. Xylan and xylan derivatives – biopolymers with valuable properties. 1. Naturally occurring xylan structures, isolation procedures and properties. *Macromol. Rapid Commun.* 21:542-556.

Eriksen, S.H.; Jensen, B.; Olsen, J. 1998. Effect of N-linked glycosilation on secretion, activity, and stability of alpha-amylase from *Aspergillus oryzae*. *Current Microbiol.* 37:117-122.

Eriksson, K.-E.; Pettersson, B.; Westermarck, U. 1974. Oxidation: an important enzyme reaction in fungal degradation of cellulose. *FEBS Lett.* 49:282-285.

Eriksson, K.-E.; Wood, T.M. 1985. Biodegradation of cellulose. In: *Biosynthesis and biodegradation of wood components* (Higuchi, T., Ed.), pp.469-503. Academic Press, Inc., New York.

a Galante, Y.M.; De Conti, A.; Monteverdi, R. 1998. Applications of *Trichoderma reesei* enzymes in the food and feed industries. In: *Trichoderma and Gliogladium* (Harman, G.E.; Kubicek, C.P., Eds.), Vol.2, pp.338-342. Taylor & Francis, London.

b Galante, Y.M.; De Conti, A.; Monteverdi, R. 1998. Applications of *Trichoderma reesei* enzymes in the textile industry. In: *Trichoderma and Gliogladium* (Harman, G.E.; Kubicek, C.P., Eds.), Vol.2, pp.311-326. Taylor & Francis, London.

Gemmil, T.R.; Trimble, R.B. 1999. Overview of N- and O-linked oligossacharide structures found in various yeast species. *Biochim. Biophys. Acta* 1426:227-237.

Gilman, C. J. 1950. *A manual of soil fungi*. The Iowa State College Press, Ames, Iowa. 392p.

Gum, E.K.; Brown, R.D. 1977. Comparison of four purified extracellular 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase enzymes from *Trichoderma viridae*. *Biochim. Biophys. Acta*. 492: 225-231.

Hanes, C. S. 1932. The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. *Biochemical Journal* 26:1406-1421.

Hatada, Y.; Hidaka, Y.; Nogi, Y.; Uchimura, K.; Katayama, K.; Li, Z.; Akita, M.; Ohta, Y.; Goda, S.; Ito, H.; Matsui, H.; Ito, S.; Horikoshi, K. 2004. Hyper-production of an isomalto-dextranase of an *Arthrobacter* sp. by a protease-deficient *Bacillus subtilis*:

sequencing, properties, and crystallization of the recombinant enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65:583–592.

ten Have, A.; Tenberge, K.B.; Benen, J.A.E.; Tudzynski, P.; Visser, J.; van Kan, J.A.L. 2002. The contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of fungal plant pathogens. In: *The Mycota* (Osiewaszc, H.D., Ed.), Vol. 11, pp.341-358. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.

Hayashida, S.; Mo, K.; Hosoda, A. 1988. Production and characteristics of avicel-digesting and non-avicel-digesting cellobiohydrolases from *Aspergillus ficuum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1523-1529.

Heinonen, J.K.; Lahti, R.J. 1981. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphate. *Anal. Biochem.* 15: 113(2) 313-317.

Hisamatsu, M.; York, W.S.; Darvill, A.G.; Albersheim, P. 1992. Characterization of seven xyloglucan oligosaccharides containing from seventeen to twenty glycosyl residues. *Carbohydr. Res.* 227:45-71.

Hondmann, D.H.A.; Visser, J. 1994. Carbon metabolism. In: *Aspergillus: 50 years on. Progress in industrial microbiology* (Martinelli, S.D., Kinghorn, J.R., eds.) Vol.29, pp. 61-139. Elsevier Science B.V. Amsterdam.

- Horikoshi, K.; Ikeda, Y. 1965. Studies on the spore coats of *Aspergillus oryzae*; II. Conidia coat-bound β -glucosidase. *Biochim. Biophys. Acta*. 101:352-357
- Igarashi, K.; Tani, T.; Kawai, R.; Samejima, M. 2003. Family 3 β -glucosidase from cellulose-degrading culture of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* is a glucan 1,3- β -glucosidase. *J. Biosci. Bioeng.* 95:572-576.
- Inglis, G.D.; Kawchuk, L.M. 2002. Comparative degradation of oomycete, ascomycete, and basidiomycete cell walls by mycoparasitic and biocontrol fungi. *Can. J. Microbiol.* 48:60-70.
- Ivanova, G.S.; Beletskaya, O.P. Okunev, O.N.; Golovlev, E.L.; Kulaev, I.S. 1983. Fractionation of cellulose complex of the fungus *Aspergillus terreus*. *Appl. Biochem. Microbiol.* 19:275-281.
- Iwashita, K.; Todoroki, K.; Kimura, H.; Shimoi, H.; Iyo, K. 1998. Purification and characterization of extracellular and cell wall bound β -glucosidases from *Aspergillus kawachii*. *Biosci. Biochem.* 62:1983-1946.
- Kalisz, H.M.; Hecht, H-J; Schomburg, D.; Schmid, R.D. 1991. Effects of carbohydrate depletion on the structure, stability and activity of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Biochim. Biophys. Acta* 1080:138-142.

Khan, A.W.; Meek, E.; Henschel, J.R. 1985. β -Glucosidase: multiplicity of activities and significance to enzymic saccharification of cellulose. *Enz. Microb. Technol.* 7:465-467.

Kormelink, F.J.M.; Searle-van Leeuwen, M.J.F.; Wood, T.M.; Voragen, A.G.J. 1993. Purification and characterization of three endo-(1,4)- β -xylanases and one β -xylosidase from *Aspergillus awamori*. *J. Biotechnol.* 27:249-265.

Kozakiewicz, Z. 1994. *Aspergillus* toxins and taxonomy. In: *The Genus Aspergillus: from taxonomy and genetics to industrial application*. (Powell, K.A.; Renwick, A.; Peberdy, J. F., eds.), pp. 303-312. FEMS Symposium n° 69, Plenum Press, New York.

Kroon, P. A.; Williamson, G.; Fish, N.M.; Archer, D.B.; Belshaw, N.J. 2000. A modular esterase from *Penicillium funiculosum* which releases ferulic acid from plant cell walls and binds crystalline cellulose contains a carbohydrate binding module. *Eur. J. Biochem.* 267:6740–6752.

Kyriascou, A.; Mackenzie, C.R.; Neufeld, R.J. 1987. Detection and characterization of the specific and non specific endoglucanases of *Trichoderma reesei*: evidence demonstrating endoglucanase activity by cellobiohydrolase II. *Enzyme Microb. Technol.* 9:25-32.

Lacey, J. 1994. Aspergilli in feeds and seeds. In: *The Genus Aspergillus: from taxonomy and genetics to industrial application*. (Powell, K.A.; Renwick, A.; Peberdy, J. F., eds.), pp.73-92. FEMS Symposium n° 69, Plenum Press, New York.

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

Lindberg, B.; Rosell, K.-G.; Svensson, S. 1973. Positions of the *O*-acetyl groups in pine glucomannan. *Svensk. Papperstidn.* 76:383-384.

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:267-275.

Lyman, E. S., B. Li; Renganathan, V. 1995. Purification and characterization of a cellulose-binding β -glucosidase from cellulose-degrading cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2976–2980.

Lynd, L.R.; Weimer, P.J.; van Zyl, W.H.; Pretorius, I.S. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Rev.* 66:506-577.

Margolles-Clark, E.; Tenkanen, M.; Soderlund, H.; Penttilä, M. 1996. Acetyl xylan esterase from *Trichoderma reesei* contains an active site serine and a cellulose-binding domain. *Eur. J. Biochem.* 237:553–560.

Maruyama, K.; Goto, C.; Numata, M.; Suzuki, T.; Nakagawa, Y.; Hoshino, T.; Uchiyama, T. 1996. o-Acetylated xyloglucan in extracellular polysaccharides from cell-suspension cultures of *Mentha*. *Phytochemistry*. 41:1309-1314.

McCann, M.C.; Roberts, K. 1991. Architecture of the primary cell wall. In: *The cytoskeletal basis of plant growth and form* (Lloyd, C.W., Ed.), pp.109-129. Academic Press, Inc., New York.

McCleary, B.V.; Mathesen, N.K. 1983. Action patterns and substrate-binding requirements of β -D-mannanase with mannosaccharides and mannan-type polysaccharides. *Carbohydr. Res.* 119:191-219.

McIlvaine, T.C. 1921. A buffer solution for colorimetric comparison. *J. Biol. Chem.* 49:183-186.

McNeill, M.; Darvill, A.G.; Fry, S.C.; Albersheim, P. 1984. Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annu. Rev. Biochem.* 53:625-663.

Miller, G.H. 1956. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 31:426-429.

Miyanaga, A.; Koseki, T.; Matsuzawa, H.; Wakagi, T.; Shoun, H.; Fushinobu, S. 2004. Crystal structure of a family 54 α -L-arabinofuranosidase reveals a novel carbohydrate-binding module that can bind arabinose. *J. Biol. Chem.* 279:44907-44914.

Moloney, A.P.; McCrae, S.I.; Wood, T.M.; Coughlan, M.P. 1985. Isolation and characterization of the 1,4- β -D-glucan glucanohydrolase of *Talaromyces emersonii*. *Biochem. J.* 225:365-374.

Moss, M.O. 1994. Biosynthesis of *Aspergillus* toxins-non-aflatoxins. In: *The Genus Aspergillus: from taxonomy and genetics to industrial application*. (Powell, K.A.; Renwick, A.; Peberdy, J. F., eds.), pp. 29-50. FEMS Symposium n° 69, Plenum Press, New York.

Mukherjee, S.; Basak, S.; Khowala, S. 2001. Hetero-aggregation with sucrase affects activity, stability and conformation of extra- and intra-cellular cellobiase in the filamentous fungus *T. clypeatus*. *Enz. Microb. Technol.* 29:213-224.

Nummi, M.; Niku-Paavola, M.L.; Lappalainen, A; Enari, T.M.; Raunio, V. 1983. Cellobiohydrolase of *Trichoderma reesei*. *Biochem. J.* 215:677-683.

O'Farrel, P.Z.; Goodman, H.M.; O'Farrel, P.H. 1977. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well acidic proteins. *Cell* 12:1133-1142.

Pauly, M.; Andersen, L.N.; Kaupinnen, S.; Kofod, L.V.; York, W.S.; Albersheim, P.; Darvill, A. 1999. A xyloglucan-specific endo- β -1,4-glucanase from *Aspergillus aculeatus*: expression cloning in yeast, purification and characterization of the recombinant enzyme. *Glycobiology* 9:93-100.

Penttillä, M.; Limón, C.; Nevalainen, H. 2003. Molecular biology of *Trichoderma* and biotechnological applications. In: *Handbook of Fungal Biotechnology* (Aurora, K.D., Ed.) pp.413-427. Marcel Dekker Inc., New York.

Pereira, A.N.; Mobedshashi, M.; Ladish, M.R. 1988. Preparation of cellodextrins. *Meth. Enzymol.* 160:26-45.

Racusen, D. 1979. Glycoprotein detection in polyacrylamide gel with thymol and sulfuric acid. *Anal. Biochem.* 99:474-476.

Saloheimo, M.; Paloheimo, M.; Hakola, S.; Pere, J.; Swanson, B.; Nyssönen, E.; Bhatia, A.; Ward, M.; Penttillä, M. 2002. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *Eur. J. Biochem.* 269:4202-4211.

Samson, R.A. 1994. Current systematics of the genus *Aspergillus*. In: *The Genus Aspergillus: from taxonomy and genetics to industrial application*. (Powell, K.A.; Renwick, A.; Peberdy, J. F., Eds.), pp.261-276. FEMS Symposium n° 69, Plenum Press, New York.

Sharma, S.; Sandhu, D.K.; Bagga, P.S. 1991. Physical characterization of isozymes of endo- β -1,4-glucanase and β -1,4-glucosidase from *Aspergillus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 79:99-104.

Shoseyov, O.; Shani, Z.; Levy, I. 2006. Carbohydrate binding modules: biochemical properties and novel applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70:283-295.

Singh, S.; Brar, K.; Sandhu, D.K.; Kaur, A. 1996. Isozyme polymorphism of cellulases in *Aspergillus terreus*. *J. Basic Microbiol.* 36:289-296.

Solovyeva, I.V.; Ananjin, V.M.; Boev, A.V.; O.N. Okunev. 1997. The controlled biosynthesis of cellobiase by *Aspergillus* fungi. *Process Biochemistry* 32:21-28.

Sprey, B; Lambert, C. 1983. Tritation curves of cellulases from *Trichoderma reesei*: demonstration of cellulase-xylanase- β -glucosidase containing complex. *FEMS Microbiol. Lett.* 18:217-222.

Stalbrand, H.; Saloheimo, A.; Vehmaanpera, J.; Henrissat, B.; Penttila, M. 1995. Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a *Trichoderma reesei* α -mannanase gene containing a cellulose-binding domain. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1090–1097.

Takada, G.; Kawaguchi, T.; Kaga, T.; Sumitami, J.-I.; Arai, M. 1999. Cloning and sequencing of β -mannosidase gene from *Aspergillus aculeatus* No.F-50. *Bosci. Biothechnol. Biochem.* 63:206-209.

Trimble, R. B.; Maley, F. 1984. Optimizing hydrolysis of N-linked *High mannose* oligosaccharides by Endo- β -N-acetylglucosaminidase H. *Anal. Biochem.* 141:515-522.

Venturi, L.L.; Polizeli, M.L.T.M.; Terenzi, H.F.; Furriel, R.P.M.; J.A. Jorge. 2002. Extracellular β -D-glucosidase from *Chaetomium thermophilum* var. *coprophilum*: production, purification and some biochemical properties. *J. Basic Microbiol.* 42 (1): 55-66.

Vincken, J.-P.; York, W.S.; Beldman, G.; Voragen, A.G.J. 1997. Two general branching patterns of xyloglucan, XXXG and XXGG. *Plant Physiol.* 114:9-13.

Vogel, H.J.A. 1956. A convenient growth medium for *Neurospora* (medium N). *Microb. Genet. Bull.* 37:387-394.

de Vries, R.P.; Visser, J. 2001. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65:497-522.

Wood, T.M. 1991. Fungal cellulases. In: *Biosynthesis and biodegradation of cellulose* (Haigler, C.H., Weimer, P.J. eds.) Vol.1, pp. 491-533. M. Dekker, New York.

Wood, T.M.; McCrae, S.I. 1979. Synergism between enzymes involved in the solubilization of native cellulose. *Adv. Chem. Ser.* 181:181-209.

Wood, T.M.; McCrae, S.I. 1986. The cellulase of *Penicillium pinophilum*: synergism between enzymes components in solubilizing cellulose with special reference to the involvement of two immunologically distinct cellobiohydrolases. *Biochem. J.* 234:93-99.

Wood, T.M.; McCrae, S.I.; Bhat, K.M. 1989. The mechanism of fungal cellulase action. Synergism between enzyme components of *Penicillium pinophilum* cellulase in solubilizing hydrogen bound-ordered cellulose. *Biochem. J.* 260:37-43.

Wood, T.M.; McCrae, S.I.; Wilson, C.; Bhat, K.M.; Gow, L. 1988. Aerobic and anaerobic fungal cellulases with special reference to their mode of attack on crystalline cellulose. In: *Biochemistry and genetics of cellulose degradation, FEMS Symp. 43.* (Aubert, J.-P.; Beguin, P.; Millet, J. Eds.), pp.31-52. Academic Press, London.

Wray, W.; Boulukas, T.; Wray, V.P.; Hancock, R. 1981. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 118:197-203.

ANEXOS

7.1. ESTRUTURAS DE GLUCANAS N-LIGADAS

Monoantennary

Biantennary

Triantennary

2, 4-branched

2, 6-branched

Tetraantennary

Pentaantennary

R = GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc $\rightarrow$ Asn (peptide)

7.2. SUBSTRATOS DE ENDO-GLICANASES

Table 1. Structural requirements of various endo-type enzymes for their substrates		
Enzymes	Structures required for substrates	Sources
Endo D	$\begin{array}{c} R \rightarrow 6 \\ R \rightarrow 4 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \end{array} \text{Man}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 R_1$	<i>Diplococcus pneumoniae</i>
Endo H	$\begin{array}{c} R \rightarrow 6 \\ R \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \end{array} \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \\ R \rightarrow 4 \text{Man}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 R_1 \\ R \rightarrow 3$	<i>Streptomyces griseus</i> and <i>S. plicatus</i>
Endo C _{II}	$\begin{array}{c} R \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \\ R \rightarrow 4 \text{Man}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 R_2 \\ R \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \end{array}$	<i>Clostridium perfringens</i>
N-glycanase	All types of N-linked oligosaccharides ^a	<i>Flavobacterium meningosepticum</i>

R, sugar or hydrogen.
R₁, (±Fucα1→6)GlcNAc→Asn (peptide), (±Fucα1→6)GlcNAc, or (±Fucα1→6)GlcNAc_{Cor}.
R₂, GlcNAc→Asn, GlcNAc, or GlcNAc_{Cor}.
^a See text for details.

7.3. N-GLUCANAS QUE SE LIGAM A ConA Sepharose

Liga-se fortemente à Con A = eluição com 0,2M α -metilmanosídeo:

Liga-se brandamente à Con A = eluição com 10mM α -metilglucosídeo:

7.4. OUTRAS ESTRUTURAS QUE ADSORVEM A ConA:

Oligosaccharides	Structures	Con A
I.	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \end{array} \text{Man}\beta 1 \rightarrow \text{R}$	+
II.	$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \\ \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \end{array} \text{Man}\beta 1 \rightarrow \text{R}$	+
III.	$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \end{array} \text{Man}\beta 1 \rightarrow \text{R}$	+
IV.	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \end{array} \text{Man}\beta 1 \rightarrow \text{R}$	+
V.	$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \\ \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \end{array} \text{Man}\beta 1 \rightarrow \text{R}$	+
VI.	$\begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta 1 \\ \downarrow \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \quad 4 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \end{array} \text{Man}\beta 1 \rightarrow \text{R}$	-
VII.	$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \end{array} \text{Man}\beta 1 \rightarrow \text{R}$	-
VIII.	$\begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta 1 \\ \downarrow \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \quad 4 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \end{array} \text{Man}\beta 1 \rightarrow \text{R}$	-
IX.	$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \end{array} \text{Man}\beta 1 \rightarrow \text{R}$	-
X.	$\begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta 1 \\ \downarrow \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \quad 4 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \end{array} \text{Man}\beta 1 \rightarrow \text{R}$	-
XI.	$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \end{array} \text{Man}\beta 1 \rightarrow \text{R}$	-
XII.	$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \end{array} \text{Man}\beta 1 \rightarrow \text{R}$	-

^a Eluted with 5 mM α -methylglucopyranoside in TB- NaN_3 .
^b Eluted with 1% *N*-acetylglucosamine oligomers in TB- NaN_3 .
 R: 4GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc β OT

7.5. PURIFICAÇÃO

Purificação das β -glucosidases I e II

Cromatografias em DEAE-Sephacel (A) e DEAE-celulose (B). As setas indicam a poção selecionada. B: I representa β -glucosidase I, enquanto II representa β -glucosidase II. Linhas pontilhadas indicam gradiente de NaCl.

Tabela de purificação

Purificação das β -glucosidases I e II miceliais de *Aspergillus versicolor*

Etapa	Proteína total (mg)	Atividade específica (U.mg prot ⁻¹)
extrato bruto	464,56	1,58
DEAE-sephacel	13,60	5,07
DEAE-celulose		
β -GI	2,56	14,25
β -GII	4,02	17,30

Purificação das β -xilosidases induzidas por xilana e por xilose

Cromatografias em DEAE-celulose das β -xilosidases induzidas por xilana (A) e por xilose (B). As setas indicam a poção selecionada. Linhas pontilhadas indicam gradiente de NaCl.

Tabela de purificação A

Purificação da β -xilosidase micelial, induzida por xilana de *Aspergillus versicolor*

Etapa	Proteína total (mg)	Atividade específica (U.mg prot ⁻¹)
extrato bruto	531,23	36,67
DEAE-celulose	16,35	934,54
sulfato de amônia 100%	12,34	1060, 21

Tabela de purificação B

Purificação da β -xilosidase micelial, induzida por xilose de *Aspergillus versicolor*

Etapa	Proteína total (mg)	Atividade específica (U.mg prot ⁻¹)
extrato bruto	421,67	16,58
DEAE-celulose	12,12	256,13
sulfato de amônia 100%	9,76	322,82