

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação do potencial biotecnológico de uma nova β -glicosidase do
fungo *Aspergillus fumigatus***

Lucas Matheus Soares Pereira

Ribeirão Preto

2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação do potencial biotecnológico de uma nova β -glicosidase do
fungo *Aspergillus fumigatus***

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências e
Biotecnologia da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção
do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Bioagentes e
Biotecnologia Aplicados à Farmácia

Orientado(a): Lucas Matheus Soares
Pereira

Orientador(a): Profa. Dra. Taísa
Magnani Dinamarco

Ribeirão Preto

2022

Pereira, L. M.
S.

**Avaliação do potencial biotecnológico de uma nova β -
glicosidase do fungo *Aspergillus fumigatus***

Espaço de 2,5 cm
reservado para etiqueta de
localização da biblioteca

MESTRADO
FCFRPUSP
2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Pereira, Lucas Matheus Soares

Avaliação do potencial biotecnológico de uma nova β -glicosidase do fungo *Aspergillus fumigatus*. Ribeirão Preto, 2022.

112 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Bioagentes e Biotecnologia Aplicados à Farmácia.

Orientador: Dinamarco, Taísa Magnani

1. β -glicosidase. 2. Expressão heteróloga. 3. Caracterização enzimática. 4. Estimulação por glicose. 5. Sinergia.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Lucas Matheus Soares Pereira

Título do trabalho: Avaliação do potencial biotecnológico de uma nova β -glicosidase do fungo *Aspergillus fumigatus*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Bioagentes e Biotecnologia Aplicados à Farmácia

Orientador(a): Profa. Dra. Taísa Magnani Dinamarco

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Edna e Jair, e as minhas irmãs Jaine e Lílian, por todo amor incondicional, apoio e incentivo em minha jornada. Eu amo vocês!

Agradecimientos

Após dois anos e meio de mestrado, espero conseguir agradecer a todos que contribuíram de alguma forma para a conclusão dessa tão sonhada conquista.

O meu principal agradecimento é à minha orientadora, **Profa. Dra. Taisa Magnani Dinamarco**. Agradeço por todo apoio, confiança, paciência e por todos os conhecimentos transmitidos durante minha jornada científica.

Eu também agradeço:

Aos meus pais, **Edna e Jair**, e as minhas irmãs **Lílian e Jaine**, por todo suporte, apoio, carinho e amor incondicional durante esse período. Nada disso seria possível sem vocês!

Ao **Roberto**, por todo amor e carinho. Obrigado por toda ajuda e por acreditar tanto em mim nesse período.

Aos meus amigos do Laboratório de Biotecnologia de Proteínas: **Aline, Luis, Deborah, Paula e André**. Agradeço a amizade, ajuda e incentivo durante esses anos de convivência, por toda troca de conhecimento e pelos momentos de descontração.

Aos meus amigos **Giovanni, Vitor, Yuri, Flávia e Felipe**, pela amizade, por sempre me escutarem, pelos conselhos e pelos momentos de alegria compartilhados.

Ao **Prof. Sérgio Akira Uyemura** que, com muita gentileza, disponibilizou diversos equipamentos que tornaram possível a realização deste trabalho.

Ao **Prof. Arthur Henrique Cavalcante de Oliveira**, por todo suporte científico e ajuda com os experimentos de espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

Ao programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da FCFRP.

Às agências de fomento FAPESP, CNPq e Capes

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001

*“Na vida, não existe nada a temer,
mas a entender”*

Marie Curie

Resumo

RESUMO

Pereira, L. M. S. **Avaliação do potencial biotecnológico de uma nova β -glicosidase do fungo *Aspergillus fumigatus***. 2022. 112f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

A preocupação com impactos ambientais tem estimulado muitos esforços visando substituir os combustíveis fósseis por biocombustíveis, como o etanol. Porém, para tornar isso possível, é necessário investir em outras tecnologias de produção, como o etanol de segunda geração (2G), de modo a elevar os níveis desse produto e assim atender à crescente demanda. Atualmente, esse tipo de produção ainda não é viável economicamente, devido aos altos custos dos coquetéis enzimáticos utilizados na etapa de sacarificação das biomassas lignocelulósicas. De modo a otimizar esses coquetéis, a busca por enzimas com atividades superiores tem sido visada. As β -glicosidases, atuam na etapa final da sacarificação enzimática, catalisando a clivagem de ligações glicosídicas presentes na celobiose, liberando glicose e aumentando a eficiência das enzimas hidrolíticas que são inibidas pela celobiose no processo de hidrólise. Dessa forma, o projeto em questão realizou a clonagem, expressão em *Pichia pastoris* X-33, purificação e caracterização da enzima AfBgl1.3 de *A. fumigatus*. A avaliação estrutural da enzima recombinante, revelou a desestruturação da enzima devido ao aumento da temperatura. Na análise por dicroísmo circular (DC), foi possível observar a perda progressiva da estrutura α -hélice e aumento da estrutura folha- β antiparalela, e permitiu determinar o valor de T_m aparente de 48,5 °C. Em adição, foi possível prever a proporção das estruturas secundárias α -hélice (36,3%) e folha- β (12,4%), a 25 °C. A análise por emissão intrínseca do triptofano permitiu determinar a exposição dos resíduos apolares no ambiente externo da proteína, obtendo-se o valor de T_m aparente de 49,3 °C. A caracterização bioquímica sugeriu as condições ótimas para sua atividade sendo de pH 6,0 e temperatura de 40 °C. Nas temperaturas de 30 °C e 40 °C, a enzima apresenta-se estável, retendo cerca de 90 e 50% de atividade, respectivamente, após 24 horas de pré-incubação. A enzima também demonstrou alta estabilidade na faixa de pH 5-8, retendo mais que 65 % de sua atividade após 48 horas de pré-incubação. Como a inibição pelo produto é um dos desafios na utilização industrial de β -glicosidases, principalmente durante a degradação de celulose, avaliou-se a sua tolerância a glicose. A AfBgl1.3 recombinante foi estimulada em uma ampla faixa de concentração de glicose (1,8 – 90 g L⁻¹), aumentando cerca de 1,4 vezes sua atividade, na presença de 45 g L⁻¹ de glicose. A enzima ainda apresentou atividade sobre os substratos salicina (495,0 ± 49,0 U mg⁻¹), pNPG (340,5 ± 18,6 U mg⁻¹), celobiose (89,3 ± 5,1 U mg⁻¹) e lactose (45,1 ± 0,5 U mg⁻¹), podendo ser classificada como de ampla especificidade. Os valores de V_{max} encontrados para a AfBgl1.3, foram de 656,0 ± 17,5 U mg⁻¹, 706,5 ± 23,8 U mg⁻¹ e 132,6 ± 7,1 U mg⁻¹, para os substratos pNPG, Salicina e celobiose, respectivamente. A enzima atuou em sinergia com o coquetel enzimático comercial (Celluclast[®] 1.5L), uma vez que sua adição como suplemento, resultou em aumentos de cerca de 26% na taxa de conversão do substrato CMC em açúcares redutores (g L⁻¹), após 12 horas de incubação na presença de 0,9 FPU/g de coquetel. Além disso a AfBgl1.3 também atuou em sinergia com as outras celulasas do *Aspergillus fumigatus* já caracterizadas por nosso grupo de pesquisa sobre a degradação de CM-Celulose, o que resultou em maior liberação de açúcares redutores em relação ao controle. Os resultados obtidos podem ser importantes no contexto da busca por novas celulasas e na otimização dos coquetéis enzimáticos utilizados durante a sacarificação.

Palavras-chave: β -glicosidase; expressão heteróloga; caracterização enzimática; estimulação por glicose; sinergia.

Abstract

ABSTRACT

Pereira, L. M. S. **Evaluation of the biotechnological potential of a novel β -glucosidase from the fungus *Aspergillus fumigatus***. 2022. 112f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Concern about environmental impacts has stimulated many efforts to replace fossil fuels with biofuels, such as ethanol. However, to make this possible, it is necessary to invest in other production technologies, such as second-generation ethanol (2G), in order to raise the levels of this product and thus meet the growing demand. Currently, this type of production is not yet economically viable, due to the high costs of the enzymatic cocktails used in the saccharification step of lignocellulosic biomass. In order to optimize these cocktails, the search for enzymes with superior activities has been pursued. β -glycosidases act in the final step of enzymatic saccharification, catalyzing the cleavage of glycosidic bonds present in cellobiose, releasing glucose and increasing the efficiency of hydrolytic enzymes that are inhibited by cellobiose in the hydrolysis process. Thus, the project in question carried out the cloning, expression in *Pichia pastoris* X-33, purification and characterization of the AfBgl1.3 enzyme from *A. fumigatus*. The structural evaluation of the recombinant enzyme revealed the destructuring of the enzyme due to the increase in temperature. In the circular dichroism (CD) analysis, it was possible to observe the progressive loss of the α -helix structure and the increase of the antiparallel β -sheet structure, and it was possible to determine the apparent T_m value of 48.5 °C. In addition, it was possible to predict the proportion of α -helix (36.3%) and β -sheet (12.4%) secondary structures at 25 °C. The intrinsic emission analysis of tryptophan allowed to determine the exposure of apolar residues in the external environment of the protein, obtaining the apparent T_m value of 49.3 °C. The biochemical characterization suggested the optimal conditions for its activity being pH 6.0 and temperature of 40 °C. At temperatures of 30 °C and 40 °C, the enzyme is stable, retaining about 90 and 50% of activity, respectively, after 24 hours of pre-incubation. The enzyme also demonstrated high stability in the pH 5-8 range, retaining more than 65% of its activity after 48 hours of pre-incubation. As inhibition by the product is one of the challenges in the use of β -glucosidases industrially, mainly in the degradation of cellulose, its glucose tolerance was evaluated. Recombinant AfBgl1.3 was stimulated over a wide range of glucose concentration (1.8 – 90 g L⁻¹), increasing its activity by about 1.4 times in the presence of 45 g L⁻¹ of glucose. The enzyme also showed activity on the substrates salicin (495.0 \pm 49.0 U mg⁻¹), pNPG (340.5 \pm 18.6 U mg⁻¹), cellobiose (89.3 \pm 5.1 U mg⁻¹) and lactose (45.1 \pm 0.5 U mg⁻¹), which can be classified as having broad specificity. The V_{max} values found for AfBgl1.3 were 656.0 \pm 17.5 U mg⁻¹, 706.5 \pm 23.8 U mg⁻¹ and 132.6 \pm 7.1 U mg⁻¹, for the substrates pNPG, Salicin and cellobiose, respectively. The enzyme acted in synergy with the commercial enzyme cocktail (Celluclast® 1.5L), since its addition as a supplement resulted in increases of about 26% in the conversion rate of the CMC substrate into reducing sugars (g L⁻¹), after 12 hours of incubation in the presence of 0.9 FPU/g of cocktail. In addition, AfBgl1.3 also acted in synergy with other *Aspergillus fumigatus* cellulases already characterized by our research group on the degradation of CM-Cellulose, which resulted in greater release of reducing sugars compared to the control. The results obtained may be important in the context of the search for new cellulases and in the optimization of enzymatic cocktails used during saccharification.

Keywords: β -glucosidase; heterologous expression; enzymatic characterization; glucose stimulation; synergy.

Lista de figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da celulose presente na célula vegetal.....	34
Figura 2 - Ação das enzimas hidrolíticas, endoglucanases (EG), celobiohidrolases (CBH) e β -glicosidases (BGL) sobre a celulose.....	37
Figura 3 - Mecanismo de inversão e retenção das β -glicosidases	40
Figura 4 - Mecanismo de transglicosilação das β -glicosidases	41
Figura 5 - Mapa do vetor pPICZ α A	52
Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) do produto da PCR de colônia para confirmação dos clones positivos de bactérias após transformação com o vetor pPICZ α A recombinante	66
Figura 7 - Sequência do gene Afu1g14710 traduzida	67
Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) dos produtos da PCR de colônia, dos clones positivos de <i>P. pastoris</i> X-33 após transformação com o produto da digestão do vetor recombinante pPICZ α A/Afu1g14710 pela enzima PmeI.....	68
Figura 9 - Fotografia da placa de cultura, representando o teste de atividade enzimática com os 4 clones positivos de <i>P. pastoris</i> X-33 (C1, C2, C3 e C4) e clone controle (Ct)	69
Figura 10 - Fotografia do gel SDS-PAGE 10% das alíquotas de proteínas expressas por <i>P. pastoris</i> X-33	70
Figura 11 - Fotografia do gel SDS-PAGE 10% das alíquotas de proteínas expressas em <i>P. pastoris</i> X-33 em meio BMMY com concentração de 1,5% (v/v) de metanol.....	71
Figura 12 - Atividade relativa da AfBgl1.3 recombinante durante os dias de indução sobre o substrato salicina	72
Figura 13 - Análise por SDS-PAGE 10% da purificação da AfBgl1.3 recombinante..	73
Figura 14 - Alinhamento múltiplo da sequência da AfBgl1.3 de <i>A. fumigatus</i>	75
Figura 15 - Análise estrutural da AfBgl1.3	77
Figura 16 - Análise da AfBgl1.3 recombinante por dicroísmo circular na região do UV distante	78
Figura 17 - Análise da AfBgl1.3 recombinante por emissão intrínseca do triptofano..	80
Figura 18 - Estabilidade e condições ótimas para a atividade da AfBgl1.3 recombinante	82
Figura 19 - Atividade específica ($U\ mg^{-1}$) da AfBgl1.3 recombinante sobre Salicina, pNPG, celobiose e lactose.	87

Figura 20 - Efeito inibitório da presença de glicose na atividade da AfBgl1.3 recombinante durante a hidrólise de pNPG.....	92
Figura 21 - Análise dos produtos liberados na reação da AfBgl1.3 recombinante	94
Figura 22 - Avaliação da suplementação da AfBgl1.3 em coquetel comercial Celluclast® 1.5L durante a degradação de CM-celulose.....	96
Figura 23 - Figura 23 - Otimização da proporção entre as celulasas do <i>A. fumigatus</i> AfBgl1.3, Af-EGL7 e AfCel6A, expressas em <i>P. pastoris</i> , durante a hidrólise de celulose.....	97
Figura 24 - Avaliação do sinergismo entre a AfBgl1.3, Af-EGL7 e AfCel6A durante a hidrólise de celulose	98

Lista de tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências dos primers que serão utilizados na clonagem do gene no vetor pPICZ α A	50
Tabela 2 - Efeito da temperatura na proporção das estruturas secundárias da AfBgl1.3 recombinante.	79
Tabela 3 - Comparação das propriedades bioquímicas de β -glicosidases GH1 de diferentes organismos.....	84
Tabela 4 - Constantes cinéticas para a AfBgl1.3 recombinante	88
Tabela 5 - Efeito de diferentes íons e reagentes, na concentração final de 5 mM, sobre a atividade da AfBgl1.3 recombinante	90

Lista de abreviaturas e siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
μmol	Micromol
1G	Primeira geração
2G	Segunda geração
AOX	Álcool oxidase
BGL	β -glicosidase
BMGY	Buffered Glycerol-complex Medium
BMMY	Buffered Methanol-complex Medium
CAZymes	Carbohydrate-Active Enzymes
CBH	Celobiohidrolase
cDNA	DNA complementar
cm	Centímetro
CMC	Carboximetilcelulose
CPEC	Circular Polymerase Extension Cloning
D.I.T.	Digital Integration Time
D.O.	Densidade Óptica
DC	Dicroísmo circular
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA _g	DNA genômico
DNS	Dinitrosalicílico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
F	Forward
FPU	Filter Paper Unit
g	Gramma
h	Hora
HiFi	Hight Fidelity
His ₆	Cauda de afinidade contendo 6 histidinas
kb	Quilobases
k _{cat}	Número de renovação ou <i>turnover</i>

k_{cat}/K_M	Eficiência catalítica
kDa	Quilodalton
kg	Quilograma
K_M	Constante de Michaelis-Menten
kV	Kilovolt
L	Litro
LB	Luria-Bertani
LPMO	Lytic Polysaccharide Monooxygenase
M	Molar
mdeg	Miligras
Meio TB	Terrific-Broth
mg	Miligrama
min	Minuto
Miniprep	Minipreparação plasmidial
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
MOPS	Ácido 3-morfolinopropano 1-sulfônico
MRM	Massa residual media
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
p/v	Relação peso/volume
P_{AOX1}	Promotor da Álcool Oxidase 1
pb	Pares de base
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDB	Protein Data Bank
pH	Potencial Hidrogeniônico
pNPG	<i>p</i> -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo
R	Reverse
rpm	Rotação por minute
s	Segundo
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS
SLS	Lauril sulfato de sódio

SOB	Super optimal Broth
SOC	Super optimal Broth with Catabolites repression
Solução TB	Transformation Buffer
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina
T _m	Melting temperature
Tris	Tris-(hidroximetil)aminoetano
U	Unidade de atividade enzimática
V	Volt
v/v	Relação volume/volume
V _{max}	Velocidade máxima
YAG	Yeast extract-Agar-Glucose
YPD	Yeast extract-Peptone-Dextrose
YPDS	Yeast extract-Peptone-Dextrose-Sorbitol

Lista de símbolos

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
\$	Símbolo de dólar
°C	Grau Celsius
™	<i>Trademarck</i>
®	Marca registrada
g	Força centrífuga relativa
Ω	Resistência elétrica (ohm)
λ	Comprimento de onda
ε	Coefficiente de extinção molar
θ	Elipticidade
p	Probabilidade de significância

Sumário

Sumário

1 Introdução	31
1.1 Etanol de primeira e segunda geração.....	32
1.2 Composição das biomassas lignocelulósicas.....	33
1.3 Etapas envolvidas na conversão da biomassa em bioetanol	35
1.4 β -glicosidases	39
1.5 Potencial biotecnológico do <i>Aspergillus fumigatus</i>	42
1.6 <i>Pichia pastoris</i> : um sistema eficiente de expressão heteróloga	43
1.7 Análise estrutural de enzimas recombinantes.....	44
1.7.1 Dicroísmo circular	44
1.7.2 Emissão Intrínseca de Fluorescência do Triptofano	44
2 Objetivos.....	46
3 Material e Métodos:.....	48
3.1 Microrganismos e meios de cultivo	49
3.2 Extração de RNA total, quantificação e eletroforese	49
3.3 Síntese de cDNA.....	50
3.4 Desenho dos <i>primers</i> para clonagem no plasmídeo de expressão.....	50
3.5 Reações em cadeia da polimerase (PCR).....	51
3.6 Extração e purificação do fragmento amplificado	51
3.7 Preparo de <i>E. coli</i> DH10 β quimiocompetentes	51
3.8 Clonagem no vetor de expressão pPICZ α A e transformação em DH10 β competente	52
3.9 Confirmação dos clones positivos e preparo de estoques.....	53
3.10 Preparo de estoque e extração plasmidial	53
3.11 Análise da sequência do gene Afu1g14710 clonado.....	54
3.12 Preparo de células de <i>P. pastoris</i> eletrocompetentes	54
3.13 Transformação de <i>P. pastoris</i> por Eletroporação	55
3.14 Teste de atividade em placa	55
3.15 SDS-PAGE	55
3.16 Padronização da expressão da AfBgl1.3 em <i>P. pastoris</i> X-33	56
3.17 Expressão em larga escala da AfBgl1.3 recombinante em <i>P. pastoris</i> X-33.....	57
3.18 Purificação da proteína com resina de Níquel	57
3.19 Determinação da atividade enzimática.....	58

3.20 Caracterização bioquímica da AfBgl1.3 purificada	59
3.20.1 Determinação do efeito do pH e temperatura na atividade da AfBgl1.3 recombinante.....	59
3.20.2 Efeitos de íons e aditivos sobre a atividade enzimática da AfBgl1.3 recombinante	60
3.20.3 Ensaio de inibição a glicose da AfBgl1.3 recombinante	61
3.20.4 Ensaio de especificidade ao substrato	61
3.21 Determinação dos parâmetros cinéticos	61
3.22 Análises de bioinformática.....	61
3.23 Análises da estrutura por Dicroísmo circular e Emissão Intrínseca do triptofano..	62
3.24 Ensaios de sinergismo.....	63
3.24.1 Efeito da associação entre o coquetel comercial Celluclast® 1.5L e a AfBgl1.3 de <i>A. fumigatus</i> produzida em <i>Pichia pastoris</i> sobre a degradação de celulose.....	63
3.24.2 Efeito da associação entre a AfBgl1.3, Af-EGL7 e a AfCel6A de <i>A. fumigatus</i> produzidas em <i>P. pastoris</i> sobre a degradação de celulose	63
3.25 Determinação da atividade de transglicosilação da AfBgl1.3 por cromatografia em camada delgada (CCD)	64
4 Resultados e discussões:	65
4.1 Clonagem, expressão e purificação da AfBgl1.3 recombinante	66
4.2 Análises estruturais da AfBgl1.3 recombinante.....	73
4.2.1 Alinhamento e modelagem da AfBgl1.3 recombinante.....	73
4.2.2 Análise por dicroísmo circular	76
4.2.3 Análise por Emissão intrínseca do triptofano.....	79
4.3 Caracterização bioquímica da AfBgl1.3 recombinante	81
4.4 Ensaio de especificidade ao substrato.....	86
4.5 Determinação dos parâmetros cinéticos	88
4.6 Efeito de diferentes íons e reagentes sobre a atividade da AfBgl1.3 recombinante ...	89
4.7 Efeito da presença de glicose sobre a atividade da AfBgl1.3 recombinante	91
4.8 Determinação da atividade de transglicosilação da AfBgl1.3 por cromatografia em camada delgada (CCD)	93
4.9 Ensaio de sinergismo	95
4.9.1 Efeito da suplementação da AfBgl1.3 junto ao coquetel comercial Celluclast® 1.5L	95

4.9.2 Efeito da associação da AfBgl1.3 junto as celulases Af-EGL7 e AfCel6A do <i>A. fumigatus</i> expressas em <i>P. pastoris</i>.....	97
5 Conclusões	99
Referências	101

1 Introdução

1 Introdução

1.1 Etanol de primeira e segunda geração

A utilização de combustíveis fósseis, tais como a gasolina, tem desencadeado diversas consequências relacionadas às mudanças climáticas e a riscos à saúde pública (SHINDELL; SMITH, 2019). A redução progressiva da utilização dessa fonte de energia pode trazer diversos benefícios, tais como, a diminuição da emissão de gases de efeito estufa e aerossóis, menor taxa de mortalidade relacionada a poluição do ar, maior segurança hídrica e alimentar, além de limitar o aquecimento global a aproximadamente 2 °C (LELIEVELD et al., 2019).

Fontes alternativas de energia como os biocombustíveis, em que se destacam o bioetanol, butanol e biodiesel, são capazes de diminuir a dependência do consumo dos combustíveis de base fóssil (BHATTARAI et al., 2011). Nesse cenário, o bioetanol demonstra ser uma fonte promissora, tanto por sua maior capacidade de produção em nível global, quanto devido ao seu avanço nas políticas governamentais que visam a mistura de biocombustíveis com a gasolina (AYODELE; ALSAFFAR; MUSTAPA, 2020). Ademais, o etanol se destaca pela alta octanagem, não apresenta toxicidade e não provoca a contaminação de recursos hídricos. O alto teor de oxigênio presente, possibilita que uma menor quantidade de aditivo seja utilizada, e permite uma melhor oxidação dos hidrocarbonetos presentes na gasolina, diminuindo a emissão de monóxido de carbono (CO) e compostos aromáticos (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008).

Desde a criação do programa Pró-Álcool, em 1975, o Brasil se destaca, dentre os países em desenvolvimento, na utilização de energias renováveis a partir da cana-de-açúcar (KARP et al., 2021). O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar e junto com o Estados Unidos, lidera a produção de bioetanol mundial (ROBAK; BALCEREK, 2018). De acordo com os dados da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), na safra de 2019/2020, a produção total de cana-de-açúcar no Brasil foi cerca de 642,7 milhões de toneladas, gerando cerca de 34 bilhões de litros de etanol e 29,8 milhões de toneladas de açúcar (CONAB, 2021). Toda essa produção gera uma grande quantidade de resíduos, como as biomassas lignocelulósicas.

Biomassas lignocelulósicas são matérias-primas de baixo custo, preço estável e obtidas em grande quantidade. A cada tonelada de cana-de-açúcar processado para obtenção do caldo, são gerados cerca de 250 kg de bagaço e 140 kg de palha de cana. Em 2020, foram produzidos cerca de 180 milhões de toneladas de bagaço, após o processamento de 643 milhões de toneladas de cana-de-açúcar no Brasil (CONAB, 2021). Todo esse resíduo tem potencial para

gerar eletricidade e produzir etanol por tecnologias de segunda geração, que será discutida mais adiante (PEREIRA et al., 2015; DOS SANTOS et al., 2016).

Estima-se que para cada tonelada de bagaço de cana-de-açúcar, são produzidos cerca de 231 L de etanol de segunda geração. Comparando com o custo de produção do etanol 1G, que no Brasil é de US \$ 0,56 L⁻¹, o etanol celulósico, com um custo de US \$ 1,33 L⁻¹, ainda é uma alternativa economicamente inviável. No entanto, apesar do alto custo, outras vantagens destacam para a utilização desse biocombustível, como a ausência na demanda de áreas de cultivo extra, menor impacto na sustentabilidade alimentar e a diminuição da emissão de CO₂, devido a reciclagem do dióxido de carbono liberado na combustão (BRANCO; SERAFIM; XAVIER, 2019). Nesse sentido, a busca por metodologias que tornem o etanol 2G mais acessível, ou seja, com menor custo de produção, ainda é uma abordagem promissora.

1.2 Composição das biomassas lignocelulósicas

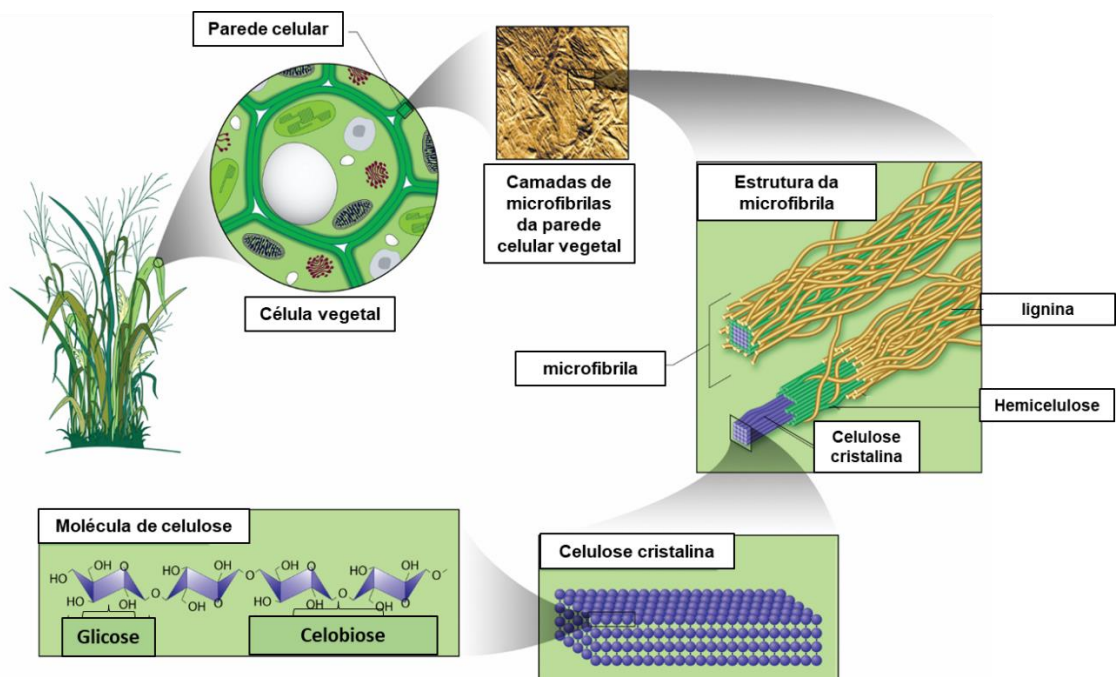
A biomassa lignocelulósica é um recurso abundante e renovável derivado das plantas, com grande potencial para produção de biocombustíveis, produtos químicos e biomateriais, sendo constituído majoritariamente por polissacarídeos (celulose e hemicelulose) e lignina, um polímero aromático (ZOGHLAMI; PAËS, 2019).

O rendimento e a qualidade da conversão da biomassa em bioetanol está diretamente relacionado a composição desse material, que depende da variedade, maturidade, espécie e das condições de crescimento, sendo desejável uma maior fração de celulose e hemicelulose, e uma menor fração de lignina (ROBAK; BALCEREK, 2018). Como exemplo, tem-se que o bagaço de cana-de-açúcar apresenta cerca de 42–48% de celulose, 19–25% de hemicelulose e 20–42% de lignina, a palha de milho apresenta cerca 38–40% de celulose, 19–25% de hemicelulose e 7–19% de lignina e a palha de arroz cerca de 28–36% de celulose, 23–28% de hemicelulose e 12–14% de lignina (ZABED et al., 2017).

A celulose é o polímero natural mais abundante da Terra, sendo encontrada na constituição de plantas e algas, sendo as fibras das plantas sua maior fonte na natureza (Figura 1) (LI et al., 2021). Sua estrutura consiste em unidades de anel de D-glicopirranose, na conformação de menor energia (cadeira ⁴C₁). Tais unidades de β-D-Glicose são unidas por ligações glicosídicas β-D (1→4) que dão origem a sua estrutura homogênea, de fórmula geral (C₆H₁₀O₅)_n, sendo a celobiose considerada sua unidade de repetição (HEINZE, 2015). As microfibrilas de celulose são originadas a partir da junção de microfibrilas de celulose, que são formadas a partir da sobreposição de várias camadas de moléculas lineares de celulose,

estabilizadas pelas ligações de hidrogênio inter e intramoleculares, entre os grupos hidroxilas nas posições axiais, que geram um exterior hidrofóbico e o interior hidrofílico. Essas interações são responsáveis pela estrutura linear da celulose, pela sua resistência à tensão e insolubilidade em água e em diversos solventes orgânicos (LORENCI WOICIECHOWSKI et al., 2020). Além do interesse científico, a grande disponibilidade da celulose atrai atenção para sua aplicação como material renovável e biodegradável, já que sua produção e degradação é comparável à reservas de petróleo e minerais (HEINZE, 2015).

Figura 1 - Estrutura da celulose presente na célula vegetal



Fonte: Adaptado de US DOE 2005.

A hemicelulose é o segundo maior polissacarídeo encontrado na natureza, correspondendo a cerca de 20-35% da lignocelulose. É formada por uma mistura de polissacarídeos constituído por pentoses (xilose, arabinose), hexoses (manose, glicose e galactose) e ácidos metilglucurônico e galacturônico. Os açúcares são unidos por ligações β -1,4- e ocasionalmente β -1,3-glicosídica. Diferente da celulose, a hemicelulose é um polissacarídeo ramificado heterogêneo (PÉREZ et al., 2002; SAHA, 2003). Devido a sua estrutura amorfa e ramificada, e sua baixa massa molecular, a hemicelulose é relativamente fácil de ser hidrolisada. Devido ao fato de as hemiceluloses cobrirem as fibrilas da celulose,

elas devem ser removidas durante o pré-tratamento, para que não limitem a disponibilidade da celulose na hidrólise enzimática (HAGHIGHI MOOD et al., 2013).

A lignina é a fração mais abundante não polissacarídica da lignocelulose (15-40% da massa seca), formada pela polimerização de três monômeros: álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, que são unidos por meio de ligações aril, alquil-alquil e éter aril-aril, formando um complexo heteropolímero amorfo. A lignina é responsável pela hidrofobicidade da lignocelulose, e juntamente com as hemiceluloses, reveste as fibrilas de celulose. Em vista de sua estrutura rígida, é o principal fator que confere resistência mecânica à parede celular das plantas, protegendo contra ataques biológicos de fungos e bactérias (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007; BADIEI et al., 2014). A lignina tem um papel negativo na conversão da celulose em açúcares fermentescíveis, pois atua como uma barreira física, impedindo o acesso das enzimas ao polímero; apresenta capacidade em adsorver irreversivelmente as celulasas e outras enzimas durante a hidrólise enzimática, devido a propriedade hidrofóbica; e é responsável pela inibição irreversível das enzimas durante a sacarificação, devido aos compostos fenólicos derivados de sua estrutura (ZOGHLAMI; PAËS, 2019).

1.3 Etapas envolvidas na conversão da biomassa em bioetanol

Para que o etanol 2G se torne um produto economicamente viável, é necessário que tanto a celulose quanto a hemicelulose, componentes das biomassas lignocelulósicas, sejam eficientemente convertidas em seus açúcares monoméricos (glicose e xilose, respectivamente) para posterior fermentação (DE SOUZA et al., 2011; ROBAK; BALCEREK, 2018). Devido a composição heterogênea desses materiais, e das ligações covalentes e de hidrogênio presentes entre esses componentes da parede celular da planta, a estrutura das biomassas apresenta uma alta recalcitrância, o que dificulta sua degradação. Para isso, são necessárias algumas etapas que envolvem o pré-tratamento, sacarificação enzimática e fermentação.

A etapa de pré-tratamento é uma ferramenta essencial para a conversão dos polímeros de celulose em açúcares fermentescíveis. Nessa etapa, são utilizadas diferentes técnicas, tais como tratamento ácido, tratamento biológico e explosão de vapor, com o objetivo de quebrar a estrutura da lignina e romper a estrutura cristalina da celulose, tornando-a mais acessível a ação das enzimas celulolíticas presentes na etapa de hidrólise enzimática (KUMAR et al., 2009). O pré-tratamento é reconhecido como um dos gargalos tecnológico do processo, pois cerca de

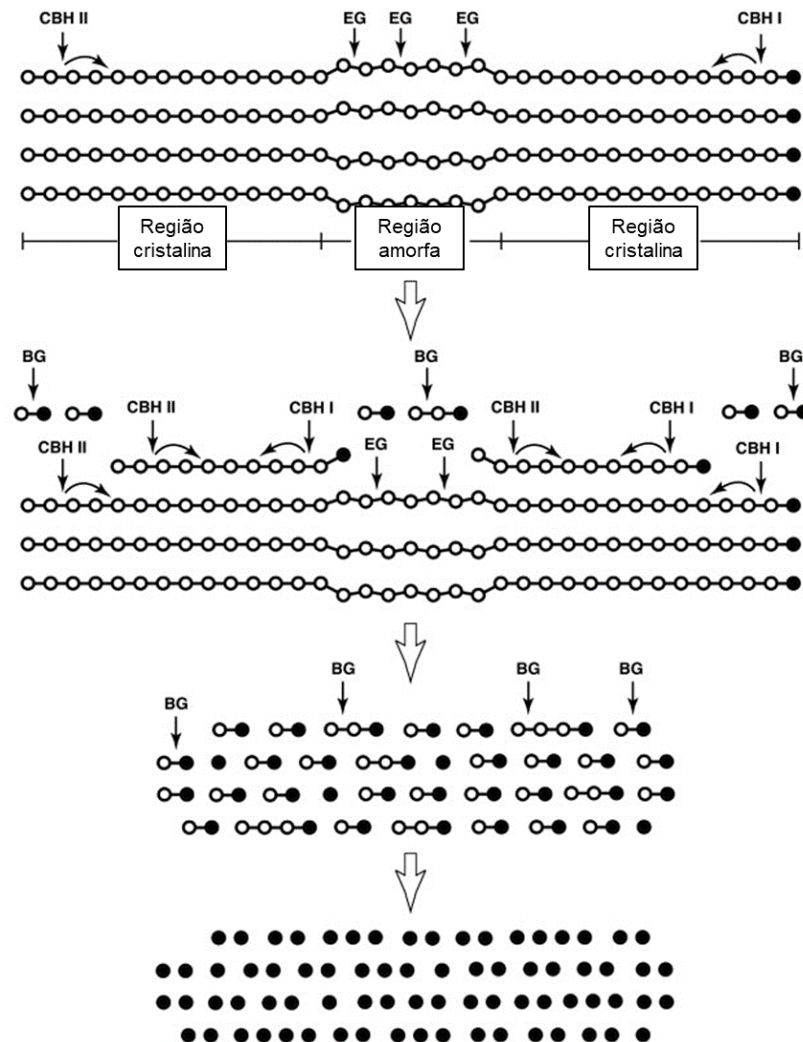
20% do custo total de produção de etanol 2G é representado por essa etapa, caracterizando-se como uma das fases de maior custo na produção (AMIN et al., 2017).

Na etapa de sacarificação, diferentes enzimas que atuam em sinergia são utilizadas para converter a celulose em açúcares fermentescíveis.

Ao menos três enzimas são requeridas no processo: as endoglucanases (E.C. 3.2.1.4) que catalisam a clivagem das ligações internas β -1,4-glicosídicas de forma randômica, gerando oligossacarídeos menores; as exoglucanases ou celobiohidrolases (E.C. 3.2.1.91) que atuam nas extremidades tanto redutoras quanto não redutoras da cadeia, liberando moléculas de celobiose e por fim as β -glicosidases (E.C. 3.2.1.21) que atuam na última etapa da conversão da celulose, convertendo a celobiose em glicose (Figura 2) (BHATIA; MISHRA; BISARIA, 2002; MOSIER, 2005).

Além dessas, as oxidoredutases também apresentam papel importante na sacarificação enzimática da celulose. As monooxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs, EC: 1.14.99.53–56), como as AA9, são enzimas acessórias, dependentes de cobre, que degradam polissacarídeos, como a celulose, por meio de um mecanismo de oxirredução (LO LEGGIO et al., 2015). Atualmente, as LPMOs são adicionadas na formulação de coquetéis enzimáticos empregados industrialmente, devido a sua capacidade de potencializar a ação das celulases, gerando avanços na produção de etanol de segunda geração (LABOUREL et al., 2020).

Figura 2 - Ação das enzimas hidrolíticas, endoglucanases (EG), celobiohidrolases (CBH) e β -glicosidases (BGL) sobre a celulose



Fonte: Adaptado de GUSAKOV (2011).

Nesse contexto, a etapa de hidrólise enzimática é descrita como o principal entrave na produção de bioetanol a partir de matérias-primas lignocelulósicas, devido à baixa eficiência das celulases empregadas e do alto custo dos coquetéis enzimáticos, representando cerca de 36% do custo total da produção de bioetanol (SINGHANIA et al., 2013; HWANGBO; TRAN; CHU, 2019).

Posteriormente, na etapa de fermentação, existem geralmente três processos diferentes que são empregados industrialmente para a conversão dos açúcares fermentescíveis em etanol: hidrólise e fermentação separados (HFS), sacarificação e fermentação simultâneas (SFS), e sacarificação e co-fermentação simultâneas (SCFS) (MOHD AZHAR et al., 2017). Na HFS, a

biomassa pré-tratada é inicialmente degradada em seus açúcares fermentescíveis (glicose e xilose), seguido pela fermentação em etanol. Nessa modalidade, a principal vantagem é que ambos os processos trabalham em suas melhores condições, porém o acúmulo de açúcares como celobiose e glicose na etapa de sacarificação, pode gerar inibição enzimática (RASTOGI; SHRIVASTAVA, 2017).

Na SFS, a hidrólise da celulose e hemicelulose e a fermentação dos açúcares derivados, ocorrem em uma única etapa. Assim, conforme a glicose é liberada pela atividade das celulases, ela é convertida a etanol pelos microrganismos fermentadores. Nessa modalidade, as principais vantagens são: redução de custo do processo, aumento das taxas de hidrólise e diminuição do tempo de fermentação. Além disso, o consumo da glicose reduz a inibição das enzimas pelo produto e diminui o risco de contaminação do meio por microrganismos dependentes de glicose. Destaca-se como desvantagem a diferença na temperatura ótima no processo de sacarificação, crescimento dos microrganismos e da fermentação do etanol (HASUNUMA; KONDO, 2012; JUGWANTH; SEWSYNER-SUKAI; GUEGUIM KANA, 2020).

No processo de SCFS, todos os açúcares liberados anteriormente nas etapas de pré-tratamento e de sacarificação, são assimilados pelos microrganismos utilizados, para isso, podem ser utilizados tanto misturas de culturas de leveduras que são capazes de assimilar pentoses e hexoses, ou um único microrganismo capaz de assimilar de forma otimizada, ambos os tipos de açúcares (RASTOGI; SHRIVASTAVA, 2017).

Atualmente, o bioprocessamento consolidado se destaca como uma abordagem promissora, pois integra todas as etapas necessárias para a transformação do material lignocelulósico em etanol, em apenas um processo. Para isso, um único microrganismo é capaz, tanto de produzir as enzimas que convertem a celulose e hemicelulose em açúcares fermentescíveis, como também é responsável pela fermentação, ou seja, tanto a produção de enzimas, hidrólise enzimática e conversão dos açúcares em etanol, acontecem em uma única etapa. Essa abordagem apresenta diversas vantagens econômicas, pois a solubilização da celulose junto ao processo de fermentação, diminui a necessidade da aquisição de enzimas comerciais para a hidrólise separada, diminuindo a carga de enzima utilizada, levando a um pré-tratamento menos severo e conseqüentemente diminuindo custos operacionais adicionais (RASTOGI; SHRIVASTAVA, 2017; NAGARAJAN; LEE; CHANG, 2019).

1.4 β -glicosidases

As β -glicosidases (β -D-glicosídeo glicohidrolases; E.C. 3.2.1.21), são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas para liberar resíduos glicosil terminais não redutores de dissacarídeos, oligossacarídeos e glicosídeos conjugados (KETUDAT CAIRNS; ESEN, 2010). Algumas β -glicosidases também catalisam a síntese de ligações glicosídicas entre diferentes moléculas, via transglicosilação (BOHLIN et al., 2013).

Essas enzimas são encontradas em todos os domínios, Archaea, Eukarya e Bacteria, desempenhando diversas funções. Em mamíferos, as β -glicosidases atuam no metabolismo de glicolipídios e glicosídeos presentes em sua dieta; em plantas, elas atuam na defesa e interação microbiana, catabolismo e lignificação da parede celular, ativação de fito-hormônios e no metabolismo secundário, e em microrganismos, estão envolvidas na conversão da biomassa vegetal em glicose e na quebra da parede celular para estabelecer relações simbióticas ou patogênicas (KETUDAT CAIRNS; ESEN, 2010).

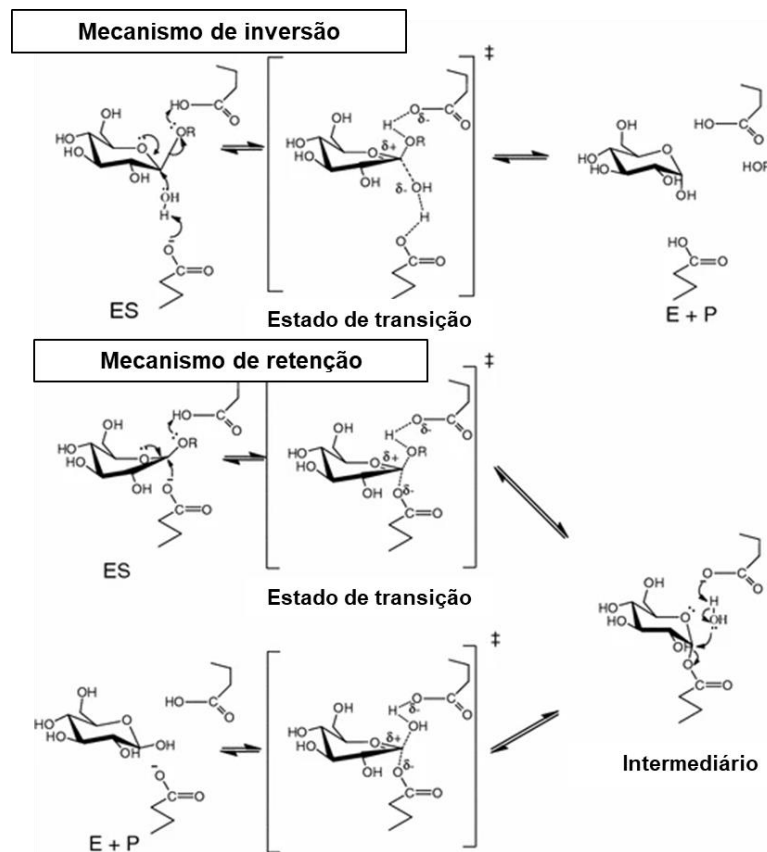
As β -glicosidases geralmente são classificadas de acordo com dois sistemas. O primeiro é baseado na especificidade das enzimas pelo substrato e as subdivide em (1) aril- β -glicosidases, (2) celobiasas e (3) enzimas com ampla especificidade (abrangendo a maior parte delas). O segundo, por sua vez, corresponde à classificação no banco de dados CAZy (<http://www.cazy.org>) e leva em consideração as características estruturais das enzimas, sendo o sistema mais amplamente utilizado. De acordo com esse último, tanto as β -glicosidases como outras CAZymes (*Carbohydrate-active enzymes*) são agrupadas em diferentes classes e subclasses, sendo as primeiras pertencentes principalmente às famílias de glicosil hidrolases GH1 e GH3 (SRIVASTAVA et al., 2019).

Apesar desses dois sistemas serem largamente utilizados, eles não levam em consideração características importantes das β -glicosidases, como tolerância e estimulação à glicose (inibidor competitivo dessas enzimas). Sendo assim, uma forma mais funcional de se categorizar essas enzimas, é com relação ao efeito da glicose sobre sua atividade enzimática. Nesse sistema, as β -glicosidases podem ser classificadas em 4 classes diferentes: β -glicosidases inibidas por baixas concentrações de glicose; β -glicosidases tolerantes à glicose; β -glicosidases estimuladas por baixas concentrações de glicose e inibidas por altas concentrações de glicose; e β -glicosidases não inibidas por altas concentrações de glicose (SALGADO et al., 2018).

Essas enzimas catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas entre o carbono anomérico (C1) e o oxigênio glicosídico através de dois mecanismos de catálise que utilizam um par de resíduos nucleofílicos e ácidos: uma envolvendo a inversão e a outra a retenção da quiralidade

do carbono anomérico. No mecanismo de inversão, uma molécula de água ativada pela região catalítica básica da enzima, realiza um ataque nucleofílico direto no carbono anomérico para liberar a aglicona do substrato em uma única etapa. A maioria das β -glicosidases descritas na literatura, como as GH1, apresentam o mecanismo de retenção, que desempenha a catálise em duas etapas: glicosilação e deglicosilação. Durante a glicosilação, os resíduos nucleofílicos realizam um ataque no carbono anomérico no centro do substrato glicosídico, levando a formação de um intermediário enzima-glicosídeo, por meio de uma ligação covalente α -glicosil. O outro resíduo ácido/básico catalítico da enzima age doando um próton ao oxigênio glicosídico, facilitando a saída da aglicona. Na etapa de deglicosilação, o intermediário enzima-glicosídeo sofre o processo de hidrólise pelo ataque de uma molécula aceptora de água, ativada pela região catalítica básica, liberando moléculas de glicose. Tanto a etapa de formação do intermediário enzima-glicosídeo, quanto à etapa de sua hidrólise passam por um estado de transição com formação do íon oxocarbênio (Figura 3) (BHATIA; MISHRA; BISARIA, 2002; MORANT et al., 2008; KETUDAT CAIRNS; ESEN, 2010).

Figura 3 - Mecanismo de inversão e retenção das β -glicosidases



Fonte: Adaptado de KETUDAT CAIRNS e ESEN (2010).

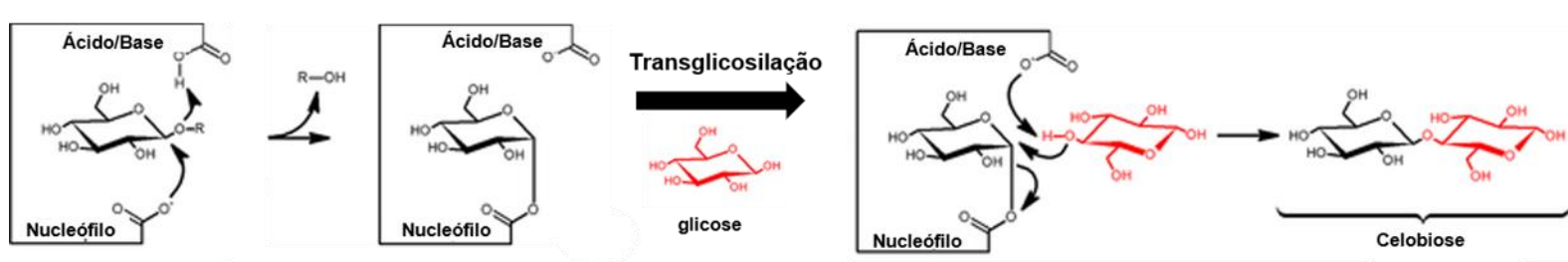
Como as β -glicosidases atuam na última etapa de hidrólise da celulose, degradando a celobiose e convertendo em glicose, é a enzima responsável por ditar a eficiência da sacarificação. O fungo *Trichoderma reesei*, além de produzir uma quantidade baixa dessas enzimas, expressa β -glicosidases que são facilmente inibidas por glicose, assim, durante a sacarificação, devido à baixa quantidade de β -glicosidase disponível e pela inibição por produto, é gerado um acúmulo de celobiose, forte inibidor tanto das endoglucanases quanto das celobiohidrolases (ZHANG et al., 2020).

Ademais, apesar das celulases dos coquetéis comerciais Viscozyme L e o Celluclast 1.5L apresentarem alta atividade (33 FPU/mL e 95,2 FPU/mL, respectivamente), a atividade catalítica das β -glicosidases presentes nessas preparações são notavelmente baixas (0,2 e 0,3 U/mL, respectivamente), o que demonstra a necessidade da suplementação desses coquetéis com β -glicosidases heterólogas (RANI et al., 2014).

Portanto, um dos maiores desafios na produção de biocombustíveis, a partir de biomassas lignocelulósicas, é a disponibilidade de β -glicosidases com maior eficiência catalítica e com maior tolerância a glicose (SINGHANIA et al., 2013).

Em certas condições, as β -glicosidases que apresentam mecanismo de retenção, podem utilizar outros aceptores além da molécula de água durante a etapa de deglicosilação, como por exemplo um monossacarídeo, e além da hidrólise, essas enzimas catalisam a síntese de ligações glicosídicas por um mecanismo cineticamente controlado, denominado de transglicosilação (Figura 4) (SALGADO et al., 2018).

Figura 4 - Mecanismo de transglicosilação das β -glicosidases



Fonte: Adaptado de MELEIRO et al., 2017.

A capacidade de catalisar a síntese de ligações glicosídicas via transglicosilação é interessante no ponto de vista industrial pois a produção enzimática de oligossacarídeos é uma reação estereoespecífica, diferente das reações por rotas sintéticas, e permite a produção de

surfactantes não iônicos, largamente empregados na indústria farmacêutica (FLORINDO et al., 2018; GODSE et al., 2021). Além disso, a atividade de transglicosilação está relacionada a tolerância e estimulação por glicose de algumas β -glicosidases da família GH1, como a Td2F2, que é capaz de sintetizar laminaribiose, celobiose, gentiobiose e soforose, por transglicosilação, em altas concentrações de glicose (UCHIYAMA; MIYAZAKI; YAOI, 2013; SALGADO et al., 2018).

1.5 Potencial biotecnológico do *Aspergillus fumigatus*

O *A. fumigatus* é um fungo saprofítico, distribuído globalmente em diferentes ambientes, como no solo, no ar, em material em decomposição, devido a sua aptidão em crescer e se desenvolver em uma grande faixa de temperatura e pH, sendo classificado como um organismo termotolerante (VAN DE VEERDONK et al., 2017).

A capacidade de crescer em temperaturas elevadas, e de utilizar diversas fontes de carbono e nitrogênio, torna o *A. fumigatus* um importante fungo patogênico oportunista em humanos e um organismo essencial na reciclagem de nutrientes no meio ambiente (RHODES, 2006).

Os fungos filamentosos, incluindo o *Aspergillus*, podem degradar eficientemente polissacarídeos complexos, produzindo um grande repertório de enzimas hidrolíticas e oxidativas extracelulares (BENNETT, 1998). Nesse sentido, estudos realizados em nosso laboratório analisando o secretoma e o transcriptoma de *A. fumigatus*, quando cultivado na presença de bagaço de cana-de-açúcar explodido, permitiu a identificação de diversas proteínas hidrolíticas secretadas, dentre elas 65 foram classificadas como Carbohydrate-Active enzymes (CAZy enzymes) associadas à degradação de parede celular vegetal, incluindo uma β -glicosidase GH1, denominada AfBg11.3 (DE GOUVÊA et al., 2018).

A partir dos resultados obtidos, foram caracterizadas quatro enzimas, a endo-1,4- β -glucanase GH7 (*Af-EGL7*), a LPMO da família AA9 (*AfAA9_B*), a xilanase GH10 (*Af-XYLA*) e a celobiohidrolase GH6 (*AfCel6A*), as quais se encontravam superexpressas nos dados de RNAseq e presentes no secretoma. Todas essas enzimas apresentam um grande potencial hidrolítico e biotecnológico, destacando as enzimas produzidas pelo *A. fumigatus* promissoras no cenário de hidrólise de biomassas (DE GOUVÊA et al., 2019; BERNARDI et al., 2020, 2021).

Ademais, com relação a inibição pelo produto, algumas β -glicosidases caracterizadas de diferentes espécies de *Aspergillus*, demonstraram ser tolerantes a glicose, assim como

estimuladas por esse produto da sacarificação (RAJASREE et al., 2013; DODDA et al., 2018; KOOLOTH VALAPPIL et al., 2019; HUANG et al., 2021).

1.6 *Pichia pastoris*: um sistema eficiente de expressão heteróloga

Uma das áreas mais importantes na engenharia genética é a utilização de sistemas biológicos de expressão para a produção de proteínas recombinantes. Atualmente, existem diferentes sistemas, como bactérias, leveduras, plantas, insetos e células de mamíferos (KARBALAEI; REZAEI; FARSIANI, 2020). A utilização de leveduras é a mais popular e vem mostrando ser uma estratégia eficiente e econômica para a produção de proteínas de interesse industrial em larga escala (RABERT et al., 2013).

A levedura *Pichia pastoris* é um sistema eucariótico exemplar, devido as suas vantagens como: cultivo de alta densidade celular, manipulação genética relativamente simples, capacidade de produzir grandes quantidades de proteína (mg até grama), não requer meios complexos para crescimento e apresenta sistema de modificação pós-traducional capaz de realizar glicosilação, processamento proteolítico e formar pontes dissulfeto (MACAULEY-PATRICK et al., 2005).

Por ser um organismo metilotrófico, a *P. pastoris* é capaz de utilizar metanol como única fonte de carbono. A enzima álcool oxidase (AOX) catalisa a primeira etapa no metabolismo do metanol, oxidando o metanol em formaldeído e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio é então degradado em oxigênio e água no peroxissomo. Enquanto uma parte do formaldeído formado é oxidado em formato e CO₂ por duas desidrogenases citoplasmáticas (reação que é a fonte de energia para o crescimento das células na presença de metanol), o restante do formaldeído é assimilado para a formação de constituintes celulares (CEREGHINO; CREGG, 2000).

A cepa selvagem *P. pastoris* X-33 apresenta dois genes (*AOX1* e *AOX2*) que codificam a álcool oxidase. Na presença de metanol, a transcrição de ambos os genes é induzida, o que leva a produção de grandes quantidades da enzima AOX. Embora os dois genes estejam envolvidos na codificação da enzima, o gene *AOX1* é responsável por produzir a proteína em maior quantidade (KARBALAEI; REZAEI; FARSIANI, 2020).

O promotor do gene *AOX1* (P_{AOX1}) é reprimido na presença de glicose ou glicerol, mas é fortemente regulado e induzido por metanol, sendo assim, este locus é estrategicamente utilizado para a inserção e expressão de genes de interesse (WEIDNER; TAUPP; HALLAM, 2010; BYRNE, 2015).

Diversas β -glicosidasas foram expressas com sucesso utilizando *P. pastoris* como sistema de expressão (CHEN, et al., 2011; LIU, et al., 2012; TANG et al., 2014; KAMARUDDIN et al., 2015; XIA; YANG; XIA, 2018; SHIM et al., 2022).

1.7 Análise estrutural de enzimas recombinantes

1.7.1 Dicroísmo circular

A espectroscopia por dicroísmo circular (DC) é uma técnica clássica na determinação da estrutura secundária de cadeias polipeptídicas em solução, tais como α -hélice e folha- β . Algumas vantagens quanto ao seu emprego inclui o fato de ser uma técnica não destrutiva, rápida, de baixo custo, e que permite fácil tratamento de dados. Além disso, ela possibilita a avaliação do efeito de diferentes condições do meio na estrutura da proteína, como mudanças de pH e temperatura, assim como a análise do correto enovelamento de proteínas recombinantes (MICSONAI; BULYÁKI; KARDOS, 2021).

O espectro por DC é obtido a partir da diferença da absorção da luz polarizada, tanto no sentido horário quanto no sentido anti-horário, por estruturas com características quirais, tais como proteínas (KELLY; JESS; PRICE, 2005). Na região entre 170-250 nm (UV distante), a maioria das transições eletrônicas que ocorrem nas ligações peptídicas, participam da construção do espectro para a estrutura secundária da proteína. Dependendo do ambiente onde a proteína se encontra, da geometria local e das ligações de hidrogênio que participam das ligações peptídicas, perfis espectroscópicos característicos são obtidos, o que permite obter a estimativa dessas estruturas secundárias em diferentes classes de proteínas (MICSONAI; BULYÁKI; KARDOS, 2021).

1.7.2 Emissão Intrínseca de Fluorescência do Triptofano

A espectroscopia de fluorescência é caracterizada pelo processo de absorção de luz, que promove um elétron do estado fundamental para o estado excitado, e a posterior emissão de luz, após retorno do elétron para o estado fundamental. Sendo uma das ferramentas mais utilizadas para o estudo de moléculas biológicas, a espectroscopia de fluorescência apresenta

diversas vantagens, como a necessidade de pequena quantidade de amostras (na ordem de 10^{-9} mol) e o sinal altamente sensível ao ambiente na qual a amostra se encontra (EFTINK, 2000).

Em particular, a emissão intrínseca de fluorescência das proteínas, permite uma análise estrutural e funcional das mesmas, sem a necessidade de modificações estruturais, como a ligação covalente de fluoróforos, devido à presença natural e abundante de três resíduos de aminoácidos aromáticos: tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe) e triptofano (Trp) (HELLMANN; SCHNEIDER, 2019).

Apesar da tirosina e fenilalanina serem fluoróforos, o resíduo de triptofano é a fonte predominante da emissão intrínseca de fluorescência em proteínas, pois o rendimento quântico, isto é, a fração de moléculas excitadas que emitem fluorescência da fenilalanina, ($\Phi_F = 0,04$), é inferior ao rendimento do triptofano livre ($\Phi_F = 0,2$) e, embora a tirosina apresente rendimento quântico próximo ao do triptofano livre ($\Phi_F = 0,14$), seu coeficiente de extinção é significativamente menor ($\epsilon_{Tyr} = 1400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\epsilon_{Trp} = 5600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), ademais, em proteínas nativas, a emissão da tirosina é em geral extinta, devido a sua interação com a cadeia polipeptídica ou pela transferência de energia ao triptofano (GHISAIDOOBE; CHUNG, 2014).

O espectro de emissão do triptofano é altamente sensível ao ambiente na qual o resíduo se encontra, o que permite uma análise indireta da posição do resíduo na proteína, ou seja, sua estrutura secundária, terciária e até quaternária. Além disso, a técnica permite avaliar as mudanças estruturais, como a interação da proteína com ligantes e a transição da conformação nativa para a desnaturada, ao submetê-la em diferentes temperaturas (HELLMANN; SCHNEIDER, 2019).

2 Objetivos

2 Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo a clonagem, expressão e caracterização de uma nova enzima hidrolítica AfBgl1.3 do fungo *A. fumigatus* Af293. Para tanto, os objetivos específicos incluem:

- Clonagem do gene Afu1g14710 no vetor pPICZ α A e expressão heteróloga na cepa *Pichia pastoris* X-33;
- Purificação da enzima recombinante por cromatografia de afinidade em resina de níquel Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare);
- Determinação da atividade da AfBgl1.3 purificada sobre os substratos específicos D-(-)-Salicina, Celobiose e *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo;
- Análises de sequência e estrutura da AfBgl1.3 através de ferramentas de bioinformática;
- Caracterização bioquímica da AfBgl1.3;
- Análise estrutural da AfBgl1.3;
- Determinação da atividade de transglicosilação;
- Avaliação do sinergismo da AfBgl1.3 junto com o coquetel comercial e com as celulases do *A. fumigatus* já caracterizadas por nosso grupo de pesquisa.

3 Material e Métodos

3 Material e Métodos:

3.1 Microrganismos e meios de cultivo

O cultivo da cepa *A. fumigatus* Af293 foi realizado em meio sólido YAG [0,5% (p/v) extrato de levedura, 2% (p/v) dextrose; 1% (p/v) suplemento de vitaminas; 1,8% (p/v) ágar e 0,1% (v/v) solução de elementos traços] durante 3 dias a 37 °C. Logo após, realizou-se a raspagem da placa, utilizando-se tampão PBS + 1% Tween 20. Para a separação dos conídios de impurezas do processo, a suspensão aquosa obtida foi filtrada utilizando-se lã de vidro, previamente esterilizada, e em seguida foi realizada a contagem dos conídios em microscópio eletrônico. A amostra foi armazenada a 4 °C.

Posteriormente, foi feito um pré-inóculo de 10⁸ conídios dessa suspensão em 50 mL de meio líquido YNB [0,05% (p/v) extrato de levedura; 0,1% (v/v) solução de elementos traços e 5% (v/v) solução de sais 20X] com adição de 1% (p/v) frutose e a cultura foi incubada a 37 °C e 200 rpm por 16 horas. Posteriormente, os micélios foram lavados e transferidos para 50 mL de meio líquido YNB, adicionado de 1% (p/v) SEB (bagaço de cana-de-açúcar explodido) e incubados a 37 °C e 200 rpm por 24 horas.

A cepa *E. coli* DH10β foi utilizada para propagação do vetor de expressão pPICZαA (Invitrogen) recombinante (contendo a sequência do gene Afu1g14710). Após transformação com o plasmídeo recombinante, as bactérias foram cultivadas por 16 horas a 37 °C em meio sólido LB *Low Salt* [1,5% (p/v) ágar; 1% (p/v) triptona; 0,5% (p/v) NaCl; 0,5% (p/v) extrato de levedura] contendo zeocina 100 µg mL⁻¹ para seleção dos clones positivos.

A cepa *P. pastoris* X-33 foi transformada com o vetor de expressão pPICZαA recombinante e, em seguida, cultivadas em meio de seleção YPDS [1M sorbitol; 2% (p/v) peptona; 2% (p/v) dextrose; 2% (p/v) ágar; 1% (p/v) extrato de levedura] contendo zeocina 100 µg mL⁻¹ durante 3 dias a 30 °C.

3.2 Extração de RNA total, quantificação e eletroforese

Para a extração do RNA, as culturas de *A. fumigatus* foram crescidas em YNB + SEB, conforme descrito no item 3.1. Após o período de incubação, as culturas foram centrifugadas a 2.050 x g, por 20 minutos, para separação do sobrenadante. O micélio precipitado foi congelado, utilizando-se nitrogênio líquido, para a maceração, e posteriormente, homogeneizado com a adição de 1 mL de reagente Trizol® (Life Technologies). Após 5 minutos

de incubação a 25 °C, foram adicionados 200 µL de clorofórmio no homogenato e a mistura foi novamente homogeneizada. A solução foi centrifugada a 12.000 x g por 10 minutos a 4 °C, e a fase superior foi transferida para outro tubo e misturada com 500 µL de isopropanol. A mistura foi incubada a 25 °C por 10 minutos e novamente centrifugada, da mesma forma descrita anteriormente, para separação do sobrenadante. O sólido formado foi lavado com etanol 75% (p/v), incubado a temperatura ambiente para secagem e em seguida ressuspensionado em água-DEPC. Posteriormente, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) e tratadas com RQ1 RNase-free DNase (Promega). A integridade do RNA foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 1%. Para tanto, foram aplicadas de 500 a 1000 ng de amostra preparadas com tampão de carregamento para RNA (5X) e GelRed 1:500. A corrida eletroforética ocorreu em cubeta contendo tampão MOPS 1X, com voltagem de 90V por cerca de 90 minutos.

3.3 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada a partir do RNA previamente extraído (item 3.2), empregando a enzima transcriptase reversa (SuperScript® II Reverse Transcriptase, Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante.

3.4 Desenho dos *primers* para clonagem no plasmídeo de expressão

Os *primers* foram construídos, de modo a inserir regiões de sobreposição no gene Afu1g14710, com o vetor pPICZαA, para posterior clonagem, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 - Sequências dos primers que serão utilizados na clonagem do gene no vetor pPICZαA

Nome	Enzima	Sequência (5'-3')*	Tamanho (pb)
Afu1g14710 F	<i>EcoRI</i>	<u>GAGAAAAGAGAGGCTGA</u> <u>AGCTGAATTCATGGGCTC</u> CACAACT	42
Afu1g14710 R	<i>XbaI</i>	<u>ATCCTCTTCTGAGATGAG</u> <u>TTTTTGTTCTAGAGCCTT</u> CTCGATGTATTG	48

Fonte: autoria própria.

*As regiões de *overlapping* estão sublinhadas

3.5 Reações em cadeia da polimerase (PCR)

A sequência codificadora do gene de interesse (Afu1g14710 sem o códon de parada) foi amplificada a partir do cDNA sintetizado (item 3.3) através de reações em cadeia da polimerase (PCR) realizadas em termociclador (Eppendorf) com a enzima polimerase *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific). Para isso, o cDNA (item 3.3) foi adicionado em uma mistura contendo: 1 U da enzima Phusion HiFi, tampão HF 1X; mix de dNTPs 0,2 mM; DMSO 3% (v/v); e *primers* F e R 0,5 μ M (volume final de 50 μ L). As condições de termociclagem empregadas foram: 98 °C por 30 segundos; 30 ciclos a 98 °C por 10 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto; 72 °C por 10 minutos e 4 °C - ∞ .

3.6 Extração e purificação do fragmento amplificado

O gene Afu1g14710 amplificado, foi preparado com tampão de carregamento 6X para DNA (Thermo Fisher Scientific) e Gel Red 1:500 (Biotium) e aplicados em gel de agarose 1% (1 g de agarose para cada 100 mL de tampão TAE 1X). Em uma cuba contendo tampão TAE 1X, foi realizada a corrida eletroforética, com voltagem de 90 V por cerca de 90 min. Ao final da eletroforese, foi possível observar as bandas correspondentes ao gene, através de um transiluminador ultravioleta. As bandas foram recortadas, purificadas e eluídas, utilizando-se o kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen), e seguiu-se com a quantificação do DNA no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA).

3.7 Preparo de *E. coli* DH10 β quimiocompetentes

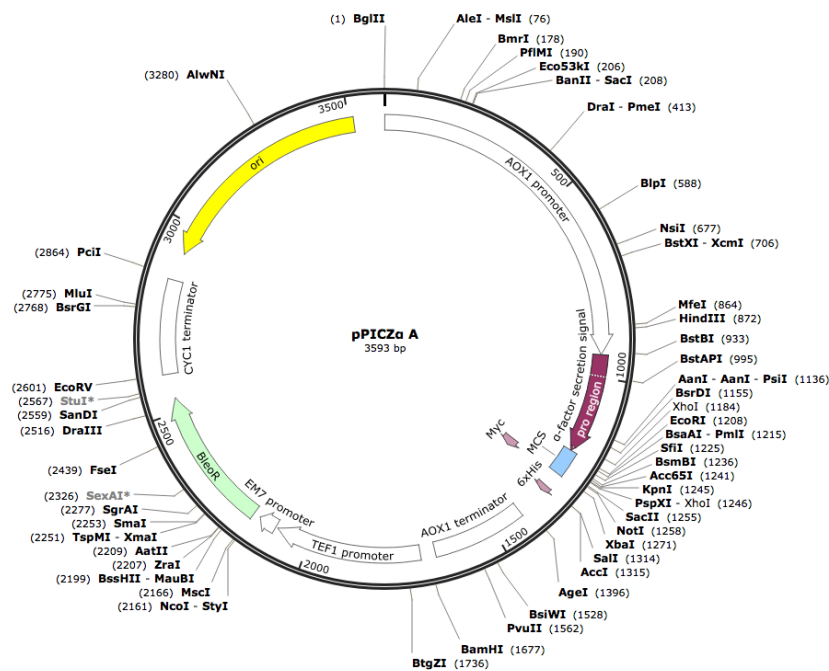
Em 10 mL de meio LB líquido, inoculou-se uma colônia de *E. coli* DH10 β e incubou-se por 16 horas, a 37 °C e rotação de 200 rpm. Posteriormente, transferiu-se 2 mL do inóculo em 50 mL de meio SOB. A cultura foi incubada nas mesmas condições até atingir um DO_{600nm} (densidade ótica em $\lambda = 600$ nm) de 0,6. Em seguida, transferiu-se todo o volume do meio para tubos do tipo Falcon de 50 mL, que foram mantidos em gelo por 10 minutos, e posteriormente, centrifugados a 2.500 x g, por 10 minutos a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e o pellet restante foi ressuscitado com 16 mL de solução TB resfriada, sendo mantido novamente no gelo por 10 minutos. Após nova centrifugação nas mesmas condições, o sobrenadante foi descartado, e o pellet ressuscitado em 4 mL de solução TB resfriada, com adição de 300 μ L de DMSO.

Após 10 minutos no gelo, foram feitos estoques de 200 μ L da suspensão para armazenamento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.8 Clonagem no vetor de expressão pPICZ α A e transformação em DH10 β competente

O fragmento obtido por PCR (item 3.5) foi clonado no vetor pPICZ α A (Figura 5) (previamente digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XbaI*) através do método CPEC (*Circular polymerase extension cloning*), de acordo com o protocolo descrito por QUAN e TIAN, (2011). Para isso, o fragmento preparado foi adicionado a uma mistura contendo: vetor digerido na proporção 2:1; 1 U da enzima Phusion HiFi; tampão HF 1X; DMSO 3% (v/v); e mix de dNTPs 0,4 mM, para um volume final de 25 μ L. As condições de termociclagem empregadas foram: 98 $^{\circ}\text{C}$ por 30 segundos; 35 ciclos de 98 $^{\circ}\text{C}$ por 10 segundos, 55 $^{\circ}\text{C}$ por 30 segundos e 72 $^{\circ}\text{C}$ por 2 minutos, 72 $^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos e 4 $^{\circ}\text{C}$ - ∞ .

Figura 5 - Mapa do vetor pPICZ α A



Fonte: Invitrogen.

Após a reação de clonagem, o produto reacional foi transformado por choque térmico, em *E. coli* DH10 β competente previamente preparada (item 3.7), da maneira descrita a seguir:

Foram adicionados 5 μ L da ligação a 100 μ L de suspensão de bactéria competente. Após cuidadosa mistura, a suspensão foi mantida no gelo por 30 minutos. Imediatamente após esse

período, foram transferidas para um banho seco a 42 °C por 45 segundos e rapidamente transferidas para o gelo, por 3 minutos, para que fosse realizado o choque térmico, tornando possível que as bactérias incorporassem os plasmídeos recombinantes.

Após essa etapa, foram adicionados 600 µL de meio SOC sob a suspensão e incubou-se as bactérias a 37 °C, por 1 hora, com rotação de 200 rpm. Posteriormente, foram semeados 100 µL da cultura em 20 mL de meio LB low salt sólido contendo zeocina na concentração final de 100 µg mL⁻¹. Incubou-se em estufa à 37 °C por 16 horas.

3.9 Confirmação dos clones positivos e preparo de estoques

Após o período de incubação, foi possível observar o crescimento de algumas colônias na placa, as quais foram selecionadas e inoculadas em 1 mL de meio LB low salt líquido, suplementado com 1 µL de zeocina 100 mg mL⁻¹ e incubadas durante 16 horas, a 37 °C, a 200 rpm. Posteriormente, essas culturas foram centrifugadas a 956 x g, por 5 minutos a 25 °C. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi homogeneizado no volume final remanescente de cerca de 50 µL. Essa solução foi utilizada como molde para a reação de PCR de colônia para confirmação dos clones positivos.

Os 2 µL dos clones positivos foram adicionados em misturas contendo 0,5 µM dos primers desenhados do item 3.4, dNTPs 0,2 mmol L⁻¹, tampão 1X e 1,0 U da enzima Taq Polymerase (Sinapse), para um volume final de 25 µL. As condições de termociclagem empregadas foram: 94 °C por 5 minutos; 30 ciclos 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos e 30 segundos; 72 °C por 10 minutos e 4 °C -∞. Após a reação, as amostras foram preparadas e aplicadas em gel de agarose 1%, de acordo com o item 3.6.

3.10 Preparo de estoque e extração plasmidial

Após a confirmação dos clones positivos, as colônias foram inoculadas em 10 mL de meio LB low salt, suplementado com 10 µL de zeocina (100 µg mL⁻¹), a 37 °C por 16 horas a 200 rpm. Dado o tempo, 5 mL do inóculo de cada colônia positiva, foram utilizados para estocagem a -80 °C (714 µL suspensão + 286 µL glicerol 70%) e os 5 mL restantes foram utilizados para extração dos vetores recombinantes utilizando o Kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) para posterior sequenciamento.

3.11 Análise da sequência do gene Afu1g14710 clonado

Para avaliar se a sequência foi inserida no vetor “in frame” com o peptídeo sinal fator α , e confirmar a ausência de mutações, foi realizado sequenciamento segundo Sanger, 1977 (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977). Para isso, as amostras foram preparadas para a reação de sequenciamento, de acordo com as instruções do kit Big Dye[®] Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems). O sequenciamento foi realizado no Laboratório de Sequenciamento de Ácidos Nucleicos (Facility de Pesquisa da FCFRP-USP), no equipamento 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As análises de mutações na sequência obtida foram realizadas a partir do alinhamento, com a sequência do gene Afu1g14710 dada pelo banco de dados do genoma de *A. fumigatus*, AspGD (<http://www.aspgd.org/>), realizado pela ferramenta Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

3.12 Preparo de células de *P. pastoris* eletrocompetentes

O preparo de células de *P. pastoris* foi realizado conforme o manual EasySelect[™] *Pichia* Expression Kit (Invitrogen), para isso, uma colônia de *Pichia pastoris* X-33 foi transferida para 5 mL de meio YPD líquido [1% (p/v) extrato de levedura; 2% (p/v) peptona; 2% (p/v) dextrose] e incubada *overnight* em temperatura de 30 °C e rotação de 200 rpm. Posteriormente, 80 μ L desse inóculo foram transferidos para 100 mL de meio YPD líquido, e incubado nas mesmas condições descritas anteriormente, até atingir um valor de D.O₆₀₀ entre 1,3 e 1,5. Em seguida, foram realizadas diferentes etapas de centrifugação, todas com rotação de 1500 x g, por 5 minutos, na temperatura de 4 °C. Logo depois da primeira centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas, cuidadosamente com a pipeta, com 100 mL de água destilada estéril gelada. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas com 50 mL de água destilada estéril gelada. Após a terceira centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e as células foram ressuspensas em 4 mL de sorbitol 1 M estéril e gelado. Por fim, depois da última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200 μ L de sorbitol 1 M gelado e mantidas no gelo, para serem usadas imediatamente.

3.13 Transformação de *P. pastoris* por Eletroporação

Para a transformação, foram adicionados, 10 µg do vetor recombinante pPICZαA linearizado com a enzima de restrição *PmeI*, em 80 µL de células competentes de *Pichia pastoris* X-33. A suspensão foi transferida para uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm gelada, previamente esterilizada, e incubada por 5 minutos no gelo. Aplicaram-se pulsos sobre a mistura de células de levedura e o vetor recombinante linear, de acordo com as recomendações do fabricante do dispositivo de eletroporação que foi utilizado (2 kV, 25 µF, 200 Ω). Rapidamente, adicionou-se 1 mL de sorbitol 1 M gelado na cubeta e a mistura foi cuidadosamente transferida para um tubo do tipo Falcon de 15 mL estéril e incubada a 30 °C sem agitação por 1 hora. Após a incubação, 200 µL da solução da transformação foram transferidos para placa com meio YPDS sólido, contendo zeocina, na concentração final de 100 µg mL⁻¹, sendo em seguida, incubado por 3 dias a 30 °C. Os clones positivos foram selecionados por PCR de colônia, de acordo com MIRHENDI et al., (2007), com algumas modificações: uma pequena quantidade dos possíveis clones positivos foi ressuspensa em 20 µL de solução 0,2% (v/v) de SDS e aquecido a 90 °C durante 5 minutos. As amostras foram transferidas para tubo de 1,5 mL e centrifugadas por 30 segundos a 17949 x g. Após essas etapas, 5 µL do sobrenadante de cada amostra foi utilizado como molde na reação de PCR, de acordo com o item 3.5, com os primers da CPEC (item 3.4).

3.14 Teste de atividade em placa

Após confirmação da integração do vetor recombinante linearizado, no genoma da *Pichia pastoris* X-33, foi realizado um teste de atividade em placa para avaliar se a enzima estava sendo expressa corretamente, e se apresentava atividade enzimática sobre o substrato presente no meio. Para isso, foram plaqueadas as 4 colônias positivas, em meio YPDS contendo 1% (v/v) de metanol para indução da proteína, 1% (p/v) de Celobiose como substrato e zeocina 100 µg mL⁻¹. Após 3 dias de incubação a 30 °C, a placa foi corada com Congo Red e descorada com NaCl 1M, até que os halos de degradação aparecessem envolta das colônias.

3.15 SDS-PAGE

A expressão proteica foi avaliada por SDS-PAGE de acordo com LAEMMLI, (1970). Para isso, 5 µL de tampão de amostra 5X foram adicionados a 20 µL de amostra e aquecidos a

98 °C por 5 minutos. Um volume de 15 µL de amostra foram aplicadas em gel SDS-PAGE, preparados da seguinte forma:

Gel de empacotamento 5%

Acrilamida/bis-acrilamida (Bio-Rad).....	13,0% (v/v)
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	10% (v/v)
SDS 10% (p/v).....	0,8% (v/v)
Persulfato de amônio 10% (p/v).....	0,8% (v/v)
TEMED (Bio-Rad)	0,1% (v/v)
Volume ajustado com água ultrapura	

Gel de corrida 10%

Acrilamida/bis-acrilamida (Bio-Rad).....	33,5% (v/v)
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	25,0 % (v/v)
SDS 10% (p/v).....	1% (v/v)
Persulfato de amônio 10% (p/v).....	1% (v/v)
TEMED (Bio-Rad)	0,05% (v/v)
Volume ajustado com água ultrapura	

3.16 Padronização da expressão da AfBgl1.3 em *P. pastoris* X-33

Uma das colônias positivas obtida no item 3.13 e que apresentou atividade no item 3.14 foi selecionada para realizar a otimização da expressão da β-glicosidase. Para isso, foram testados dois meios de indução, o meio BMM [2% peptona; 1,34% base de nitrogênio para levedura; 4 10⁻⁵% biotina; e tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 6,0] e o meio BMMY [1% extrato de levedura; 2% peptona; 1,34% base de nitrogênio para levedura; 4 10⁻⁵% biotina; e tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 6,0]. Em ambos os meios de indução foram suplementados com três concentrações diferentes do indutor metanol (0,5; 1,0 ou 1,5 % (v/v)). Após a padronização do meio de indução e da concentração de metanol, foi avaliado o melhor tempo de indução. Para tanto, durante 10 dias, retirou-se a cada 24 horas de indução, alíquotas de 1 mL, as quais foram centrifugadas por 3000 x g, 5 minutos a 4 °C. Para avaliação da expressão proteica, as amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE, de acordo com o item 3.15. Avaliou-se também a atividade relativa da enzima nos mesmos intervalos de tempo. Dessa forma, 20 µL do sobrenadante de cada alíquota foram incubados em meio reacional contendo

50 mM de tampão fosfato de sódio pH 6,0 e 1% (p/v) de salicina, em um volume final de 100 μ L de reação, por 30 minutos a 40 °C. A reação foi interrompida com a adição de 100 μ L do reagente DNS. Após aquecimento a 98 °C por 5 minutos, transferiu-se 150 μ L da reação para placa de 96 poços, e a leitura da absorbância foi determinada em espectrofotômetro, no comprimento de onda $\lambda = 540$ nm.

3.17 Expressão em larga escala da AfBgl1.3 recombinante em *P. pastoris* X-33

Para a expressão em larga escala da AfBgl1.3, uma das colônias positivas foi pré-inoculada em 25 mL de meio líquido BMGY [1% extrato de levedura; 2% peptona; 1% glicerol; 4 10^{-5} % biotina; 1,34% base de nitrogênio para levedura; e tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 6,0] e incubada por 16 horas a 30 °C e rotação de 200 rpm. Após esse período, 2 mL do pré-inóculo foram transferidos para 50 mL de meio líquido BMGY e incubada novamente a 30 °C e rotação de 200 rpm até atingir uma $D.O_{600}$ entre 2 e 6. Assim, as células foram transferidas para tubo Falcon de 50 mL estéril (volume suficiente para obter uma $D.O_{600} = 1$ em 100 mL) e centrifugadas a 3000 x g por 5 minutos a 25 °C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 100 mL de meio líquido BMMY [1% extrato de levedura; 2% peptona; 1,5% metanol; 1,34% base de nitrogênio para levedura; 4 10^{-5} % biotina; e tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 6,0] para induzir a expressão. A cultura foi incubada a 30 °C e rotação de 220 rpm e a cada 24 horas, durante 7 dias, foi adicionado metanol 100% para uma concentração final de 1,5%, para manter a indução. Após o tempo de indução, a cultura foi centrifugada a 3000 x g por 5 minutos a 4 °C para separação do sobrenadante, uma vez que a AfBgl1.3 foi secretada para o meio extracelular. Em seguida, o sobrenadante foi concentrado cerca de 10 vezes utilizando Amicon Ultra-15 com limite de corte de 10 kDa (Millipore), a 4 °C, a 5000 x g. Após a centrifugação, o concentrado foi transferido para 10 mL de tampão de ligação fosfato de sódio 20 mM + NaCl 500 mM pH 7,4 e guardado a 4 °C para purificação.

3.18 Purificação da proteína com resina de Níquel

A purificação da AfBgl1.3 recombinante foi realizada utilizando-se 2 mL da resina Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE). A resina foi preparada para uso a partir de uma centrifugação a 1.500 x g por 2 minutos, para retirada do etanol e posteriormente realizou-se 5 etapas de lavagem com 2 mL de água ultrapura para completa remoção do etanol. A fim de equilibrar seu

pH, foram adicionados 2 mL de tampão de ligação (fosfato de sódio 20 mM + NaCl 500 mM pH 7,4), seguido de centrifugação, descarte e reposição do tampão, repetidas 5 vezes.

O extrato de proteínas foi incubado com a resina de Ni-Sepharose por cerca de 1,5 hora sob leve agitação a 4 °C, para garantir a ligação da AfBgl1.3 fusionada com a calda de histidina (His₆) na resina. Após esse período, a mistura foi transferida para uma coluna de 10 mL e deixada incubando por 40 minutos para seu empacotamento.

Após o período de empacotamento da resina, prosseguiu-se com a eluição da proteína. Inicialmente, coletou-se o flow-through da coluna e em seguida, realizou-se 5 lavagens consecutivas, adicionando 2 mL de tampão de ligação em cada lavagem, para garantir que os resíduos do meio e proteínas endógenas da levedura fossem eluídos da coluna. Após as lavagens, prosseguiu-se com a eluição da AfBgl1.3 recombinante. Para isso, foram adicionados sobre a resina, tampão de ligação suplementado com concentrações crescentes de imidazol (5; 10; 20; 40; 80; 160; 250 e 500 mM). Para verificar a qualidade da eluição da AfBgl1.3 recombinante, foram coletados 20 µL de cada fração, que foram analisados por SDS-PAGE 10%, de acordo com o item 3.15.

Todas as frações contendo a proteína pura foram submetidas a troca de tampão de ligação, para remoção do excesso de imidazol. Para isso, as frações foram transferidas para filtro Amicon Ultra-15 e concentradas na temperatura de 4 °C, a 5000 x g, até aproximadamente 500 µL. Em seguida, o filtro foi completado com tampão de ligação sem imidazol e foi novamente concentrado na centrifuga, nas mesmas condições descritas anteriormente. A quantificação proteica foi realizada pelo método de Greenberg (GREENBERG, 1929).

3.19 Determinação da atividade enzimática

A atividade da AfBgl1.3 purificada foi determinada por diferentes métodos de acordo com os substratos utilizados. Utilizando o substrato não redutor, D-(-)-Salicina (Sigma-Aldrich), a atividade enzimática foi calculada a partir da quantificação de glicose liberada na reação, através do método DNS (Miller, 1959). A reação foi interrompida com a adição de 100 µL do reagente DNS. Após aquecimento a 98 °C por 5 minutos, transferiu-se 150 µL da reação para placa de 96 poços, e realizou-se a leitura da absorbância no espectrofotômetro, no comprimento de onda $\lambda = 540$ nm.

Para o substrato colorimétrico *p*-Nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (Sigma-Aldrich), a determinação da atividade enzimática foi realizada através da quantificação do produto *p*-nitrofenol liberado na reação. Para tanto, foi construída uma curva de calibração de *p*-nitrofenol

nas mesmas condições da reação. A reação foi interrompida pela adição de 100 μL de Na_2CO_3 2M no meio reacional. Transferiu-se 150 μL da reação para placa de 96 poços, e foi realizado a leitura da absorbância no espectrofotômetro, no comprimento de onda $\lambda = 405 \text{ nm}$.

Quando foram utilizados os substratos redutores, Celbiose (Sigma-Aldrich) e Lactose (Sigma-Aldrich), a atividade enzimática foi determinada pela liberação de glicose na reação, através do kit Glicose GOD-PAP Liquid Stable (LABORLAB), seguindo as recomendações do fabricante. A reação foi interrompida a partir da fervura a 98 °C durante 5 minutos, levando a completa desnaturação da enzima, e posteriormente foram adicionados 180 μL do reagente A, em 20 μL da reação, convenientemente diluída. Após 5 minutos de incubação a 37 °C, 150 μL da reação foram transferidos para placa de 96 poços, para leitura no espectrofotômetro, no comprimento de onda $\lambda = 505 \text{ nm}$.

Todas as reações foram realizadas em volume final 100 μL de reação, em tampão fosfato de sódio 50 mM, (pH 6,0), contendo 1% (p/v) de cada substrato, na temperatura de 40 °C e tempo de 30 minutos.

Uma unidade (U) de AfBgl1.3 foi considerada como a quantidade de enzima necessária para a hidrólise de 1 μmol de cada substrato, por minuto, sob cada uma das condições descritas acima.

3.20 Caracterização bioquímica da AfBgl1.3 purificada

3.20.1 Determinação do efeito do pH e temperatura na atividade da AfBgl1.3 recombinante.

Para caracterização do pH e temperatura ótimos da enzima, foi utilizado o substrato D-(-)-Salicina, de acordo com protocolo descrito no item 3.19. As dosagens da atividade enzimática foram realizadas através do método DNS.

O pH ótimo para a atividade da enzima foi determinado em uma faixa de pH de 3,0-8,0. Para isso, o meio reacional consistiu em 50 μL de tampão McIlvaine (ácido cítrico- Na_2HPO_4) nos diferentes pH avaliados, 1% (p/v) de D-(-)-Salicina, 10 μL da AfBgl1.3 recombinante purificada, na concentração de 0,01 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ e 40 μL de água ultrapura. A reação foi incubada por 30 minutos a 40 °C.

A temperatura ótima foi determinada em uma faixa de 20-60 °C, em meio reacional contendo 50 μL de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,0), 1% (p/v) de D-(-)-Salicina, 10

μL da AfBgl1.3 recombinante purificada, na concentração de $0,01 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ e $40 \mu\text{L}$ de água ultrapura. A reação foi incubada nas diferentes temperaturas, por 30 minutos.

A estabilidade ao pH foi estimada medindo-se a atividade enzimática residual, nas condições ótimas da AfBgl1.3 purificada (pH 6,0 e temperatura de $40 \text{ }^\circ\text{C}$), após a pré-incubação da enzima, na ausência de substrato, em uma faixa de pH de 3,0-8,0, em tampão McIlvaine, por 24 e 48 horas. A atividade sem a pré-incubação foi considerada 100%.

A estabilidade térmica foi estimada medindo-se a atividade enzimática residual em pH 6,0 e temperatura de $40 \text{ }^\circ\text{C}$, após a pré-incubação da enzima, na ausência de seu substrato, nos tempos de 1, 3, 6, 15 e 24 horas, em temperaturas de 30, 40, 45 e $50 \text{ }^\circ\text{C}$. A atividade sem pré-incubação foi considerada 100%.

Para avaliar a estabilidade da AfBgl1.3 recombinante na temperatura de geladeira ($4 \text{ }^\circ\text{C}$), armazenou-se a enzima em tampão de ligação fosfato de sódio 20 mM + NaCl 500 mM (pH 7,4) por um intervalo de tempo de até 4 meses. Para tanto, determinou-se a atividade relativa. Alíquotas de $10 \mu\text{L}$ da AfBgl1.3 ($0,01 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) foram recolhidas em diferentes intervalos de tempo, durante aproximadamente 4 meses. A reação enzimática foi determinada em meio contendo 1% (p/v) de D-Salicina, $50 \mu\text{L}$ de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 6,0 e $40 \mu\text{L}$ de água ultrapura. A reação foi incubada por 30 minutos a $40 \text{ }^\circ\text{C}$. A atividade da AfBgl1.3 recombinante no primeiro dia após a purificação, foi considerada como 100%.

3.20.2 Efeitos de íons e aditivos sobre a atividade enzimática da AfBgl1.3 recombinante

Para determinar o efeito de íons metálicos e reagentes químicos (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ag^+ , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Na^+ , K^+ , NH_4^+ , β -mercaptoetanol, EDTA, SDS, DTT, DMSO, Tween 20), $10 \mu\text{L}$ da AfBgl1.3 ($0,01 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$), foram adicionados ao meio reacional contendo 1% (p/v) de D-(-)-salicina, $50 \mu\text{l}$ de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,0), $10 \mu\text{L}$ de cada aditivo, na concentração de 50 mM e $30 \mu\text{L}$ de água ultrapura, para um volume final de $100 \mu\text{L}$ de reação. As reações foram incubadas por 30 minutos a $40 \text{ }^\circ\text{C}$. A atividade enzimática sem adição de aditivo foi considerada 100%.

3.20.3 Ensaio de inibição a glicose da AfBgl1.3 recombinante

O efeito da inibição por produto sobre a atividade da β -glicosidase foi determinado na presença de concentrações crescentes de glicose (Sigma-Aldrich) ($0-540 \text{ g L}^{-1}$). Para isso, o meio reacional foi constituído com $10 \mu\text{L}$ da AfBgl1.3 ($0,01 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$), 1% (p/v) do substrato cromogênico *p*-Nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (Sigma-Aldrich), tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0), e concentrações distintas de glicose por 30 minutos a $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Água ultrapura foi adicionado para ajustar para um volume final de $100 \mu\text{L}$ de reação. A atividade enzimática sem adição de glicose foi considerada 100%.

3.20.4 Ensaio de especificidade ao substrato

Para o ensaio de especificidade ao substrato, foram adicionados $10 \mu\text{L}$ da enzima ($0,01 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) ao meio reacional contendo individualmente 1% (p/v) de cada substrato (Salicina, pNPG, Celobiose e Lactose), $50 \mu\text{L}$ de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,0), e $40 \mu\text{L}$ de água ultrapura, para um volume final de $100 \mu\text{L}$ de reação. As reações foram incubadas por 30 minutos a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ e a atividade específica foi mensurada de acordo com o método proposto para cada substrato (item 3.19)

3.21 Determinação dos parâmetros cinéticos

Os valores de K_M e V_{\max} para a enzima AfBgl1.3 foram determinadas utilizando-se concentrações crescentes dos substratos D-(-)-Salicina, *p*-Nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo e celobiose ($0-30 \text{ mg mL}^{-1}$). As reações foram realizadas conforme descrito no item 3.19 e a atividade foi mensurada de acordo com o método proposto para cada substrato. Os parâmetros cinéticos foram determinados por regressão não-linear, utilizando o programa Origin 9.0.

3.22 Análises de bioinformática

Análises da sequência proteica foram realizadas utilizando-se ferramentas de bioinformática, tais como os servidores SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) para determinação dos peptídeos sinais e NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) para predição de possíveis sítios de glicosilação. A predição da estrutura tridimensional da proteína foi realizada através do programa Phyre2

(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>). Informações sobre os possíveis resíduos catalíticos foram investigadas através do alinhamento múltiplo com sequências proteicas de alta homologia, utilizando-se a ferramenta Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). A identificação de motivos conservados foi realizada pela análise da sequência da proteína no servidor ExPASy-PROSITE (<https://www.expasy.org/resources/prosite>).

3.23 Análises da estrutura por Dicroísmo circular e Emissão Intrínseca do triptofano

As análises de estrutura secundária via dicroísmo circular foram realizadas utilizando o espectropolarímetro JASCO-810. A AfBgl1.3, após diluição em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7,4), foi incubada por períodos de 30 minutos sob diferentes temperaturas (25-80 °C), na concentração final de 0,05 mg mL⁻¹, em volume de 0,2 mL. As leituras foram realizadas em cubeta de quartzo de 1 mm de espessura e repetidas em quadruplicata cobrindo a faixa de 190-250 nm (UV distante), para a obtenção de um espectro médio, o qual também foi descontado do espectro do tampão sem proteína (branco). Os parâmetros utilizados na análise foram: *scanning speed* de 50 nm min⁻¹, *band width* de 3 nm e *D.I.T* de 1s. O espectro obtido foi convertido de *Millidegress* (mdeg) para $\Delta\epsilon$ (M⁻¹ cm⁻¹), de acordo com a seguinte equação: $\Delta\epsilon = \theta[(0,1 \cdot \text{MRM}) / (d \cdot c \cdot 3298)]$, onde θ é o valor de elipticidade dado pelo equipamento, MRM é a massa residual média da AfBgl1.3, *c* é a concentração de enzima (mg mL⁻¹) e *d* é o caminho óptico (cm). Todos os percentuais de estruturas secundárias foram determinados com auxílio do programa gratuito BeStSel (MICSONAI et al., 2018) e o resultado obtido foi comparado com a estrutura modelada no servidor Phyre2 (KELLEY et al., 2016) e no programa Biovia Discovery Studio Visualizer, versão 20.1.0 (Dassault Systèmes, São Diego, EUA).

A análise da emissão intrínseca do triptofano, foi realizado no espectrofluorímetro HITACHI-F4500. As medidas de fluorescência de triptofano foram realizadas aplicando-se 1 mL das mesmas amostras em cubetas de quartzo de 1 cm de espessura. Foram utilizados os comprimentos de onda de 295 nm para excitação e de 300 a 450 nm para detecção da emissão fluorescente. As leituras foram feitas em uma taxa de 240 nm min⁻¹, em um intervalo de 0,2 nm. A correção dos espectros médios (obtidos em quadruplicata) também foi corrigida descontando-se o espectro do branco.

Para determinar o T_m aparente, foi obtido a primeira derivada da curva de elipticidade em 230 nm versus temperatura (no caso do dicroísmo circular) e máximo comprimento de onda versus temperatura (no caso da emissão intrínseca do triptofano), pelo programa Origin 9.0.

Todos os gráficos analisados do dicróismo circular e emissão intrínseca do triptofano foram previamente suavizadas com o filtro Savitzky-Golav (SAVITZKY, A.; GOLAY, 1964) e ajustadas com a função de Boltzmann.

3.24 Ensaios de sinergismo

3.24.1 Efeito da associação entre o coquetel comercial Celluclast® 1.5L e a AfBgl1.3 de *A. fumigatus* produzida em *Pichia pastoris* sobre a degradação de celulose

A hidrólise enzimática do carboximetilcelulose de sódio (CMC) (Sigma-Aldrich) foi realizada em meio reacional contendo tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0), 1% (p/v) do substrato e 2,5 µg da AfBgl1.3 recombinante/g de CMC. A hidrólise foi realizada com a suplementação do coquetel comercial Celluclast® 1.5L (Sigma-Aldrich) em duas concentrações diferentes: 0,1 e 0,9 FPU/g de substrato. A reação foi realizada em um volume final de 1 mL, incubada a 40 °C, em rotação de 1000 rpm, por 6 e 12 horas, no ThermoMixer (Eppendorf). O controle do experimento foi preparado nas mesmas condições sem a adição da AfBgl1.3 recombinante. Dado o tempo de reação, a concentração de açúcares redutores liberados na reação foi determinada pelo método DNS, em 540 nm. Todos os experimentos foram replicados pelo menos 4 vezes.

3.24.2 Efeito da associação entre a AfBgl1.3, Af-EGL7 e a AfCel6A de *A. fumigatus* produzidas em *P. pastoris* sobre a degradação de celulose

Avaliou-se a associação entre a AfBgl1.3 e as celulasas Af-EGL7 e AfCel6A, ambas já caracterizadas por nosso grupo de pesquisa (BERNARDI et al., 2019; BERNARDI et al., 2020), sobre a sacarificação de celulose. Os ensaios foram realizados com diferentes proporções das enzimas Af-EGL7, AfCel6A e AfBgl1.3 (1:10:1, 1:10:10, 1:10:25 e 1 :10:50); a quantidade de AfBgl1.3 adicionada por grama de celulose variou (1, 10, 25 ou 50 µg), enquanto as quantidades de Af-EGL7 e AfCel6A foram fixadas em 1 e 10 µg por grama de substrato. Os ensaios foram realizados em 50 mM do tampão fosfato de sódio pH 6,0 contendo 1% (p/v) de CM-Celulose, em um volume final de 1 mL. As reações foram realizadas por 24 horas a 40 °C e 1000 rpm. Dado o tempo de reação, a concentração de açúcares redutores liberados na reação foi determinada pelo método DNS, em 540 nm. Todos os experimentos foram replicados pelo menos 4 vezes.

3.25 Determinação da atividade de transglicosilação da AfBgl1.3 por cromatografia em camada delgada (CCD)

Para determinar a atividade de transglicosilação da AfBgl1.3, 0,1 µg de enzima foi adicionada em meios reacionais contendo 1% (p/v) de celobiose e 50 mM de tampão fosfato de sódio (pH 6), junto de 0, 10, 20 e 45 g L⁻¹ de glicose. As reações foram incubadas a 40 °C por 30 e 60 minutos. A reação foi interrompida deixando as reações por 5 minutos a 98 °C. O mesmo experimento foi realizado na ausência de celobiose, por 30 minutos.

Para a realização da cromatografia, foi utilizada placa de sílica gel Kieselgel 60 (Merck) (20cm x 20cm), de acordo com a metodologia descrita por Fontana et al., (1988). Após as reações, 5 µL de cada amostra foram aplicados na placa. Para a separação dos componentes da reação, a placa foi submetida a duas corridas cromatográfica. Em ambas as corridas, foram utilizadas como fase móvel acetato de etila/ácido acético/ácido fórmico/água (9:3:1:4, v/v/v/v). Após cada corrida, a placa foi seca em temperatura ambiente por 24 horas, e após a segunda corrida, a placa foi revelada com a adição da solução reveladora, composta por 0,4% de orcinol (Sigma-Aldrich) em uma mistura de etanol e H₂SO₄ concentrado (9:1, v/v). Após secagem da placa em temperatura ambiente, a placa foi incubada a 70 °C em estufa, até o aparecimento de manchas de coloração avermelhada, correspondente aos diferentes produtos.

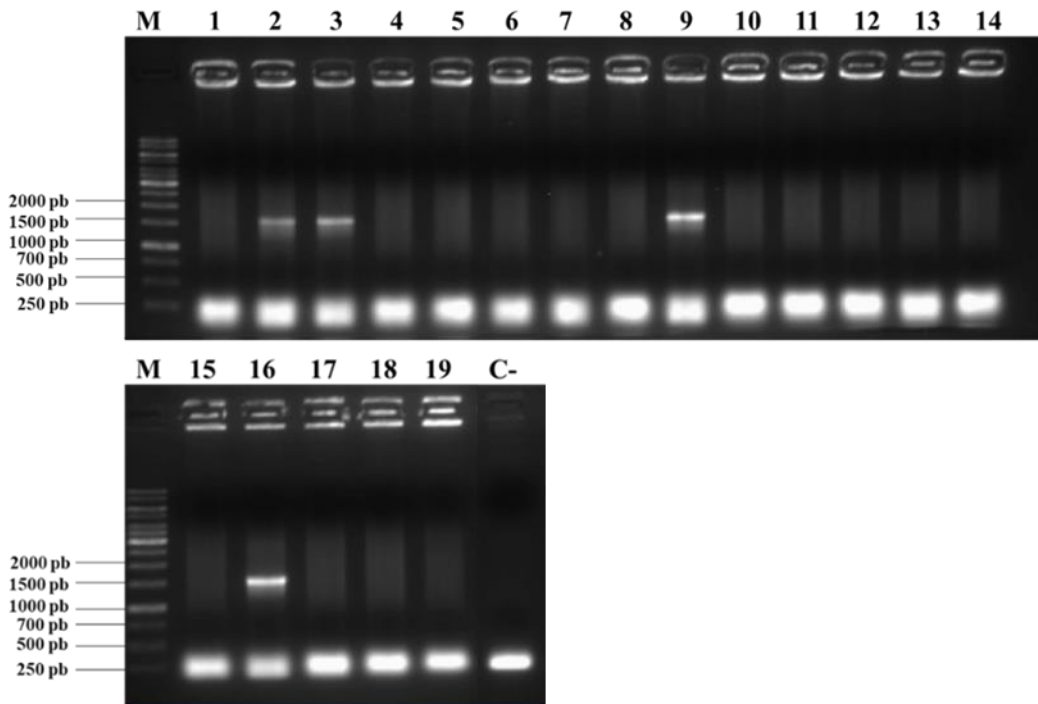
4 Resultados e Discussões

4 Resultados e discussões:

4.1 Clonagem, expressão e purificação da AfBgl1.3 recombinante

De modo a caracterizar estrutural e bioquimicamente a β -glicosidase AfBgl1.3, foi realizada a clonagem do gene Afu1g14710 no vetor de expressão pPICZ α A, pelo método *Circular Polymerase Extension Cloning* (QUAN; TIAN, 2011). Após a reação de PCR, células de *E. coli* DH10 β foram transformadas e as colônias crescidas na placa da transformação foram selecionadas para realização de PCR de colônia para confirmar a presença do inserto no vetor, de acordo com a Figura 6.

Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) do produto da PCR de colônia para confirmação dos clones positivos de bactérias após transformação com o vetor pPICZ α A recombinante. M: Marcador de massa molecular (GeneRuler 1kb); 1 a 19: Colunas contendo o gene Afu1g14710 clonado em pPICZ α A; C-: controle negativo



Fonte: autoria própria.

Observa-se que os clones das colunas 2, 3, 9 e 16 apresentaram bandas de tamanho próximo ao tamanho do gene Afu1g14710 (1449 pb). De modo a confirmar se a sequência clonada estava correta e livre de mutações, o vetor recombinante pPICZ α A/Afu1g14710 foi sequenciado na Facility de Sequenciamento da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de

Ribeirão Preto pelo método de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977). Após análise da sequência do gene Afu1g14710 clonado no vetor pPICZ α A (Figura 7), pode-se constatar a ausência de mutações e que o mesmo encontra-se “in frame” com o peptídeo sinal da levedura, o fator α .

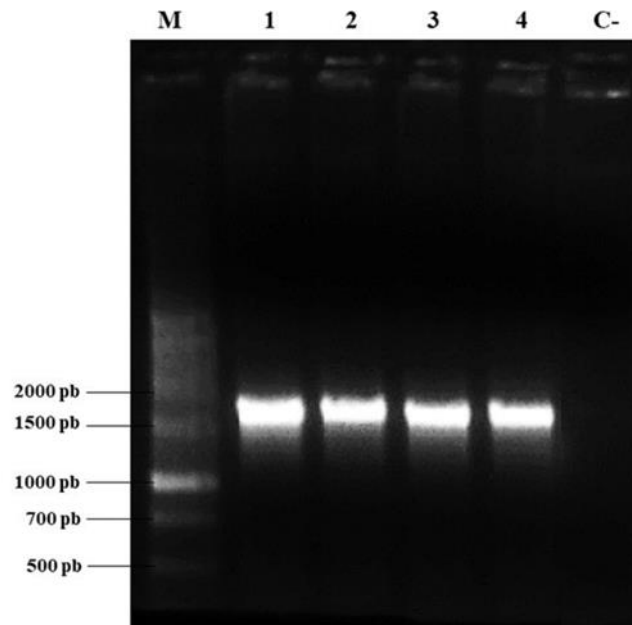
Figura 7 - Sequência do gene Afu1g14710 traduzida

atg	ggc	tcc	aca	act	acc	tcg	aca	ctt	cct	cca	gac	ttt	ctt	tgg	gga	ttc	gca	act	gcg
M	G	S	T	T	T	S	T	L	P	P	D	F	L	W	G	F	A	T	A
agc	tac	caa	att	gag	gga	gct	gtg	gat	gaa	gac	ggg	cga	ggc	ccg	tct	att	tgg	gat	aca
S	Y	Q	I	E	G	A	V	D	E	D	G	R	G	P	S	I	W	D	T
ttt	tgc	aaa	atc	ccc	ggc	aaa	att	gcc	ggt	gga	gcc	tct	ggc	gag	gtg	gct	tgc	gac	tcc
F	C	K	I	P	G	K	I	A	G	G	A	S	G	E	V	A	C	D	S
tac	cac	cgc	acc	cat	gag	gat	att	gcc	ctg	ctc	aag	gag	tgt	ggt	gca	aag	gca	tac	cgt
Y	H	R	T	H	E	D	I	A	L	L	K	E	C	G	A	K	A	Y	R
ttt	tct	atc	tca	tgg	tct	cgt	gtc	atc	cct	ctg	ggt	ggc	cgg	aat	gac	cct	gtc	aat	gaa
F	S	I	S	W	S	R	V	I	P	L	G	G	R	N	D	P	V	N	E
aag	ggt	ctc	cag	cac	tat	gtc	aag	ttc	gtc	gac	gac	ttg	ctc	gcg	gcg	ggt	att	act	cct
K	G	L	Q	H	Y	V	K	F	V	D	D	L	L	A	A	G	I	T	P
ctc	ggt	acc	ctc	ttc	cac	tgg	gat	ctt	ccc	gac	gcc	ctc	gac	aag	cgg	tac	ggt	ggt	ctt
L	V	T	L	F	H	W	D	L	P	D	A	L	D	K	R	Y	G	G	L
ctg	aac	aag	gaa	gaa	ttt	gtc	gcc	gat	ttt	gcc	aac	tat	gct	cgc	gta	atg	ttc	aat	gct
L	N	K	E	E	F	V	A	D	F	A	N	Y	A	R	V	M	F	N	A
ttc	ggc	tca	aaa	gtg	aag	tac	tgg	att	act	ttc	aat	gag	ccc	tgg	tgc	agc	agt	gtg	ctt
F	G	S	K	V	K	Y	W	I	T	F	N	E	P	W	C	S	S	V	L
ggg	tac	aat	gtc	ggc	cag	ttc	gcc	cct	ggc	agg	acc	agc	gac	cgt	acc	aag	agc	ccc	gtc
G	Y	N	V	G	Q	F	A	P	G	R	T	S	D	R	T	K	S	P	V
ggc	gac	ggt	tcg	cgc	gag	ccc	tgg	atc	gtc	ggc	cac	aac	atc	ctt	ggt	gct	cat	gga	gcg
G	D	G	S	R	E	P	W	I	V	G	H	N	I	L	V	A	H	G	A
gca	gtg	aag	att	tac	aga	gaa	gaa	ttc	aag	ccc	aga	gac	ggt	ggt	gag	att	ggc	att	acc
A	V	K	I	Y	R	E	E	F	K	P	R	D	G	G	E	I	G	I	T
ttg	aat	ggt	gac	tgg	gct	gag	ccg	tgg	gac	ccc	gag	aac	cct	gcg	gac	gtc	gaa	gcc	tct
L	N	G	D	W	A	E	P	W	D	P	E	N	P	A	D	V	E	A	C
gat	cgc	aaa	att	gag	ttc	gct	atc	tcc	tgg	ttc	gct	gac	ccc	atc	tat	cac	ggc	aag	tac
D	R	K	I	E	F	A	I	S	W	F	A	D	P	I	Y	H	G	K	Y
cca	gac	agc	atg	gtc	aaa	caa	ttg	ggg	gac	cgc	ctg	ccc	acc	tgg	acc	cct	gaa	gat	atc
P	D	S	M	V	K	Q	L	G	D	R	L	P	T	W	T	P	E	D	I
gcc	ctc	gtc	cac	ggc	agc	aac	gat	ttc	tac	ggc	atg	aac	cac	tac	tgc	gcc	aac	tac	atc
A	L	V	H	G	S	N	D	F	Y	G	M	N	H	Y	C	A	N	Y	I
aag	gcc	aag	acg	ggc	gaa	ccg	gac	ccc	aat	gac	gtc	gcc	ggc	aac	ctg	gag	atc	ctc	ctg
K	A	K	T	G	E	P	D	P	N	D	V	A	G	N	L	E	I	L	L
cag	aac	aag	aac	ggc	gaa	tgg	atc	ggt	ccc	gag	aca	cag	tca	ccc	tgg	ctg	cgt	ccc	cac
Q	N	K	N	G	E	W	I	G	P	E	T	Q	S	P	W	L	R	P	H
ccc	atc	ggg	ttc	cgg	aag	ctg	ctg	aag	tgg	ctc	agc	gat	cgc	tac	aac	cag	ccc	aag	att
P	I	G	F	R	K	L	L	K	W	L	S	D	R	Y	N	Q	P	K	I
tac	gta	acc	gag	aac	ggg	acc	agt	ctc	aag	ggc	gag	agt	gac	ctc	ccc	gtg	gac	cag	atc
Y	V	T	E	N	G	T	S	L	K	G	E	S	D	L	P	V	D	Q	I
gtg	aac	gac	gac	ttc	cgt	gtg	caa	tat	ttc	cgc	gag	tat	atc	gct	gcc	atg	gcg	gac	gct
V	N	D	D	F	R	V	Q	Y	F	R	E	Y	I	A	A	M	A	D	A
tac	acg	ctg	gac	ggt	gtg	aat	gtc	cgc	gct	tac	atg	gcg	tgg	agc	ttg	atg	gat	aac	ttc
Y	T	L	D	G	V	N	V	R	A	Y	M	A	W	S	L	M	D	N	F
gaa	tgg	gcc	gaa	ggc	tac	gag	acc	aga	ttt	ggc	gtc	acc	ttc	gtc	gac	tac	gca	aac	aac
E	W	A	E	G	Y	E	T	R	F	G	V	T	F	V	D	Y	A	N	N
caa	agg	aga	ata	ccc	aag	aag	agc	gcc	aag	gtc	ctc	cgc	gag	att	ttc	gat	caa	tac	atc
Q	R	R	I	P	K	K	S	A	K	V	L	R	E	I	F	D	Q	Y	I
gag	aag	gct	taa																
E	K	A	-																

Fonte: <https://web.expasy.org/translate>

O clone 2 foi selecionado para dar continuidade aos experimentos. O vetor recombinante pPICZ α A/Afu1g14710 foi linearizado com a enzima de restrição PmeI, para permitir a integração do vetor recombinante no genoma da *P. pastoris* X-33 por recombinação homóloga, e foi transformado na levedura, pela técnica de eletroporação. As células transformadas foram plaquedas em meio YPDS suplementado com zeocina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) para seleção dos clones positivos. Após o período de 3 dias de incubação na estufa a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 4 clones positivos de *P. pastoris* foram selecionados e confirmados por PCR de colônia, de acordo com a Figura 8.

Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) dos produtos da PCR de colônia, dos clones positivos de *P. pastoris* X-33 após transformação com o produto da digestão do vetor recombinante pPICZ α A/Afu1g14710 pela enzima PmeI. M: Marcador de massa molecular (GeneRuler 1kb); Colunas 1, 2, 3 e 4: Clones positivos; C- Controle negativo

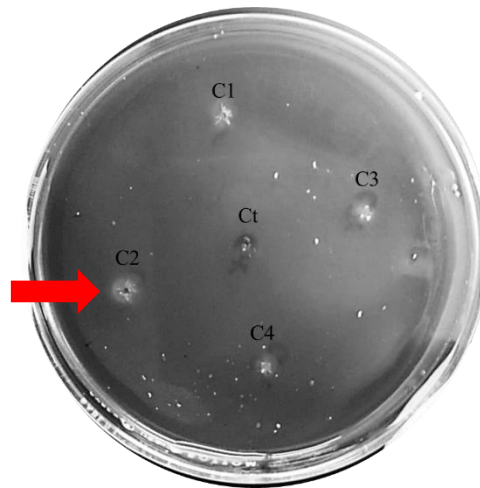


Fonte: autoria própria.

A fim de avaliar se os clones selecionados eram capazes de expressar e secretar a β -glicosidase de forma ativa, os quatro clones positivos foram incubados em meio sólido YPD contendo metanol e celobiose. O metanol é o indutor do promotor AOX1 presente no vetor pPICZ α A, e dessa forma, induz a expressão do gene da β -glicosidase. A celobiose é um dissacarídeo formado por duas moléculas de glicose ligadas por uma ligação β -(1,4)-D-glicosídica na qual as β -glicosidases atuam, catalisando a hidrólise em duas moléculas de glicose.

Como pode ser observado na Figura 9, os 4 clones testados apresentaram halos de degradação do substrato maiores que o do controle (Ct), o que indica que a β -glicosidase foi expressa com sucesso e que apresenta atividade enzimática sobre a celobiose presente no meio.

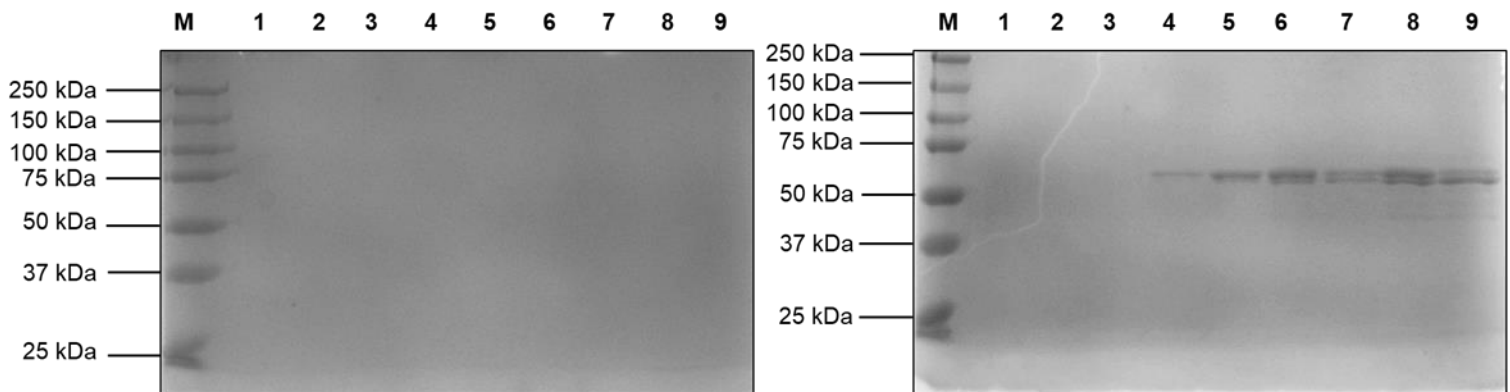
Figura 9 - Fotografia da placa de cultura, representando o teste de atividade enzimática com os 4 clones positivos de *P. pastoris* X-33 (C1, C2, C3 e C4) e clone controle (Ct)



Fonte: autoria própria

A colônia 2 foi selecionada para os ensaios de expressão heteróloga da AfBgl1.3. Para caracterizarmos as melhores condições de expressão, foram testados dois meios de cultura o BMM e BMMY e verificou-se que a AfBgl1.3 foi somente expressa em meio BMMY. Além disso, variaram-se as concentrações do indutor metanol: 0,5% (v/v); 1,0% (v/v) e 1,5 % (v/v), e foi possível observar, a partir da intensidade da banda no gel SDS-PAGE, que a enzima foi expressa em maior quantidade em meio contendo 1,5% de metanol, de acordo com a Figura 10. Todos os ensaios foram realizados a 30 °C, 220 rpm, durante 240 h.

Figura 10 - Fotografia do gel SDS-PAGE 10% das alíquotas de proteínas expressas por *P. pastoris* X-33 em meio: A) Meio BMM e B) Meio BMMY; M: Marcador de massa molecular (Precision™ Protein Standards Dual Color - BioRad); Colunas 1, 2 e 3: 0,5; 1,0 e 1,5% (v/v) de metanol, respectivamente, correspondente a 0h de indução; colunas 4, 5 e 6: 0,5; 1,0 e 1,5% (v/v) de metanol, respectivamente, correspondente a 120h de indução e colunas 7, 8 e 9: 0,5; 1,0 e 1,5% (v/v) de metanol, respectivamente, correspondente a 240h de indução. As bandas proteicas foram reveladas com Coomassie Brilliant Blue G-250

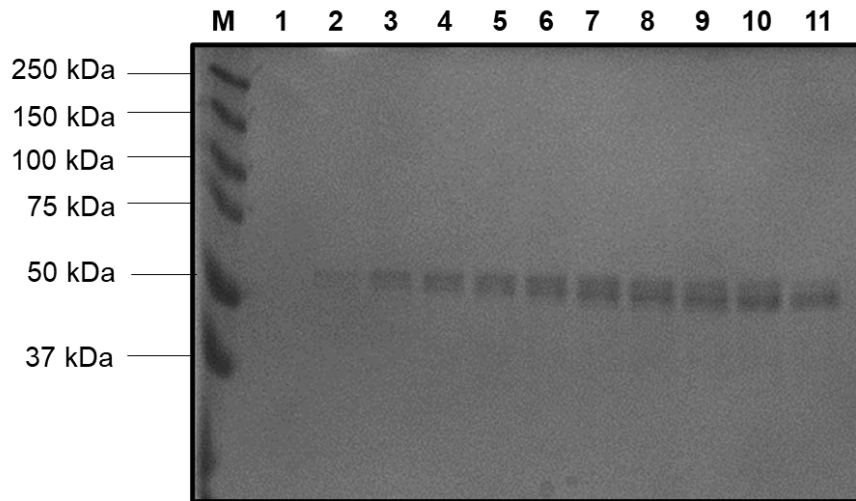


Fonte: autoria própria.

Posteriormente foi determinado o melhor tempo de indução. Para isso, foram retiradas alíquotas de 1 mL a cada 24 horas de indução, em meio BMMY contendo 1,5% (v/v) de metanol. As alíquotas foram analisadas por SDS-PAGE e foi observado, a partir da intensidade da banda (Figura 11), que a partir de 24 horas (T2) a enzima já se encontra expressa e essa expressão aumenta ao longo do tempo de incubação. No entanto, após 168 horas de indução (T7) não houve aumento significativo na expressão da β -glicosidase.

Figura 11 - Fotografia do gel SDS-PAGE 10% das alíquotas de proteínas expressas em *P. pastoris* X-33 em meio BMMY com concentração de 1,5% (v/v) de metanol.

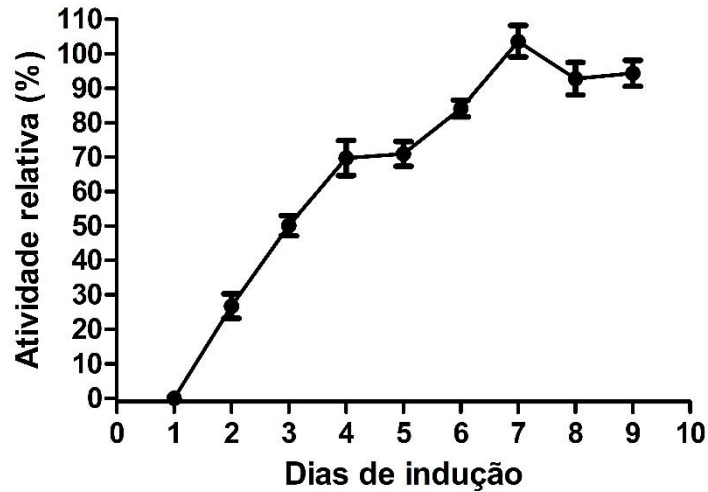
M: Marcador de massa molecular (Precision™ Protein Standards Dual Color - BioRad); coluna 1: 0h; coluna 2: 24h; coluna 3: 48h; coluna 4: 72h; coluna 5: 96h; coluna 6: 120h; coluna 7: 144h; coluna 8: 168h; coluna 9: 192h; coluna 10: 216h; coluna 11: 240h. As bandas proteicas foram reveladas com Coomassie Brilliant Blue G-250



Fonte: autoria própria.

Uma vez expressa, foi avaliada a atividade relativa da enzima presente no sobrenadante do meio de indução, sobre o substrato salicina. Corroborando os resultados da expressão proteica por SDS-PAGE, a atividade da AfBgl1.3 já foi detectada no tempo T2 (24 horas) e essa atividade aumenta ao longo do tempo, até chegar no tempo de indução com maior atividade (T7 = 168 horas) dada como 100%. Portanto, este tempo foi selecionado para a indução em larga escala da enzima (Figura 12).

Figura 12 - Atividade relativa da AfBgl1.3 recombinante durante os dias de indução sobre o substrato salicina



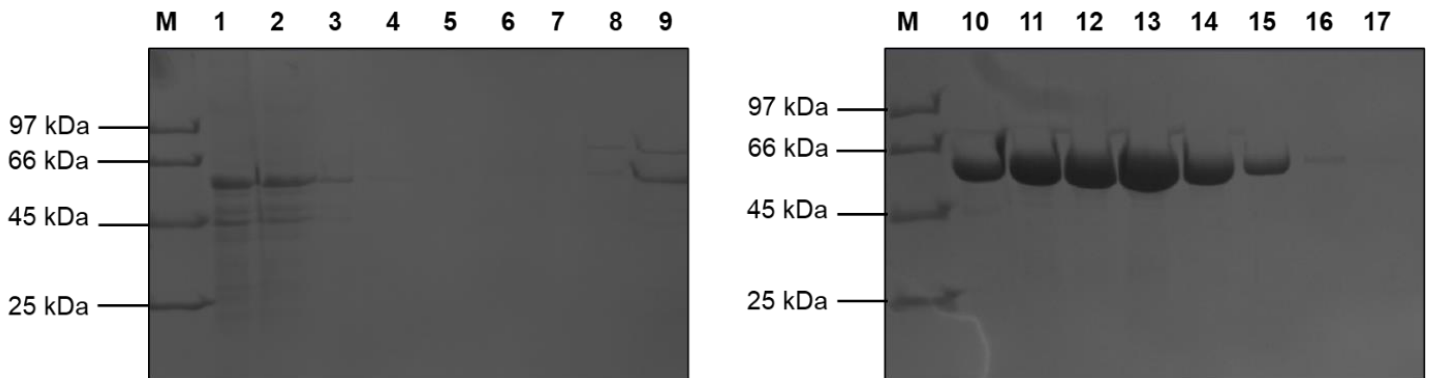
Fonte: autoria própria.

A partir dos resultados obtidos, definiu-se como as melhores condições para expressão da AfBgl1.3 recombinante o meio de indução BMMY, contendo 1,5% (v/v) de metanol, durante 168 horas de incubação, a 30 °C e 220 rpm.

Após os 7 dias de indução nas melhores condições, o sobrenadante da cultura contendo a AfBgl1.3 recombinante foi separado por centrifugação, concentrado em filtro Amicon® e purificado por cromatografia de afinidade em resina de níquel, conforme descrito nos itens 3.17 e 3.18. A cauda de histidina (6xHis) fusionada na extremidade C-terminal da enzima recombinante, apresenta afinidade pelo níquel, e dessa forma permite sua purificação.

A eficiência da purificação foi avaliada por análise de SDS-PAGE das alíquotas retiradas de cada eluição (Figura 13).

Figura 13 - Análise por SDS-PAGE 10% da purificação da AfBgl1.3 recombinante. M: Marcador de massa molecular (Calibration Kit Low Molecular Weight For Electrophoresis - GE Healthcare); coluna 1: Flow-through; coluna 2-6: Lavagem com tampão fosfato de sódio 20 mM contendo NaCl 500 mM (pH 7,4); coluna 7, 8 e 9: eluição da AfBgl1.3 recombinante com 5, 10 e 20 mM de imidazol, respectivamente; coluna 10 e 11: eluição da AfBgl1.3 recombinante com 40 mM de imidazol; coluna 12 e 13: eluição da AfBgl1.3 recombinante com 80 mM de imidazol; coluna 14 e 15: eluição da AfBgl1.3 recombinante com 160 e 250 mM de imidazol, respectivamente; coluna 16 e 17: eluição da AfBgl1.3 recombinante com 500 mM de imidazol. As bandas proteicas foram reveladas com Coomassie Brilliant Blue G-250



Fonte: autoria própria.

Foi possível observar que a AfBgl1.3 foi purificada com sucesso e completamente eluída na faixa de concentração de imidazol de 40 mM a 250 mM. As alíquotas contendo a enzima recombinante pura foram misturadas e submetidas à troca de tampão para retirada do excesso de imidazol, de acordo com o item 3.18. Após quantificação da AfBgl1.3 pelo método de Greenberg (GREENBERG, 1929), o rendimento médio obtido de cada indução, foi de cerca de 6,4 mg/L de meio.

A partir do gel, pode-se observar que a banda proteica correspondente a AfBgl1.3 recombinante apresentou uma massa molecular estimada de 54 kDa, o que corresponde ao tamanho previsto para a proteína.

4.2 Análises estruturais da AfBgl1.3 recombinante

4.2.1 Alinhamento e modelagem da AfBgl1.3 recombinante

O gene Afu1g14710 codifica a proteína AfBgl1.3, que possui 483 resíduos de aminoácidos e massa molecular de aproximadamente 54 kDa. Análises de similaridade com outras sequências revelaram que a enzima pertence à família GH1, apresentando um único

domínio (β/α)₈ TIM barril, cujo mecanismo catalítico se caracteriza pela capacidade de reter a configuração do carbono anomérico presente no substrato, enquanto catalisa a hidrólise (SRIVASTAVA et al., 2019).

O alinhamento múltiplo da AfBgl1.3 de *A. fumigatus* (Uniprot ID: Q4WRY0), com sequências homólogas de β -glicosidases GH1 de outras espécies, como a Os4BGlu18 de *Oryza sativa* (Uniprot ID: Q7XSK0, PDB: 7D6B), com 43,02% de identidade; TrBgl2 de *Trichoderma reesei* (Uniprot ID: O93785, PDB: 3AHY), com 40,04% de identidade; ThBgl2 de *Trichoderma harzianum* (Uniprot ID: A0A0F9XM91, PDB: 5JBO), com 50,00% de identidade e BglD5 de *Jeotgalibacillus malaysiensis* (Uniprot ID: A0A0B5ARU7), com 68,60% de identidade, (Figura 14), indicou dois possíveis resíduos catalíticos de glutamato conservados – E173 e E384 – que correspondem ao resíduo ácido/básico catalítico e ao resíduo nucleofílico catalítico, respectivamente, destacados na Figura 14 (JENG et al., 2011; FLORINDO et al., 2018; LIEW et al., 2018; BAIYA et al., 2021). Além disso, foi possível identificar motivos conservados para β -glicosidases da família GH1, como o motivo N-terminal, que compreende 15 aminoácidos, cuja sequência é dada por: [F-X-(F/Y/W/M)-(G/S/T/A)-X-(G/S/T/A)-X-(G/S/T/A)-(G/S/T/A)-(F/Y/N/H)-(N/Q)-X-E-X-(G/S/T/A)], no caso da AfBgl1.3 (FLWGFATASYQIEGA) e os motivos TXNEP e I/VTENG, que contém os resíduos de glutamato catalíticos, sublinhados na Figura 14 (JENG et al., 2011; SOBRI et al., 2020).

Análises de bioinformática revelaram que a enzima não apresenta peptídeo sinal em seu N-terminal, porém, análises do secretoma do *A. fumigatus* em presença de bagaço de cana-de-açúcar demonstraram que a β -glicosidase AfBgl1.3 é secretada extracelularmente (DE GOUVÊA et al., 2018). Além disso, foi predito 1 potencial sítio de N-glicosilação no resíduo N385, conservado em outras β -glicosidases GH1, o qual está destacado na Figura 14. A N-glicosilação de resíduos de asparagina é uma modificação pós-traducional fundamental para o enovelamento correto da proteína, sua secreção, estabilidade e outras propriedades enzimáticas (WILD et al., 2018). Ademais, a AfBgl1.3 não apresentou resíduos de cisteínas envolvidos em ligações dissulfeto, a partir das análises feitas por modelagem.

Figura 14 - Alinhamento múltiplo da sequência da AfBgl1.3 de *A. fumigatus*. Azul: possíveis sítios catalíticos, verde: potencial sítio de N-glicosilação, (*): resíduos conservados, (): motivos da AfBgl1.3

AfBgl1.3	-----MGSTTTSTLPPDFLWGFATASYQIEGAVDEDEDGRGPSI	37
Os4Bglu18	MAGGSKTRIHASLVSTLLLLLPLASAIHRSDFPASFLFGTATSSYQIEGAYLEGNKSLSN	60
TrBgl12	-----MLPKDFQWGFATAAYQIEGAVDQDGRGPSI	30
ThBgl12	-----MSESLSLPNDFEWGFATAAYQIEGAVKEGGRGPSI	35
BglD5	-----MRKFPPEHFVWGTATSSSQIEGGR--ESRGESI	30
	* * * * *	*
AfBgl1.3	WDTFCKIPGKIAGGASGEVACDSYHRTHEDIALLKECGAKAYRFSISWSRVIPLGGRNDP	97
Os4Bglu18	WDVFTLPGNIKDGSDIADDDHYRYEEDVELMNSLGVNAYRFSISWSRILPKG-RFGG	119
TrBgl12	WDTFCAQPGKIADGSSGVTACDSYNRTAEDIALLSLGAKSRYRFSISWSRIIPEGGRGDA	90
ThBgl12	WDTYCHLEPSRTNGANGDVACDHYRYDEDFLLTKYGAKAYRFSLSWSRIIPLGGRLDP	95
BglD5	WDQFCKNPGKVLNGDHGEVACDHINRYKEDVQLMKDLNVPWYRFSISWSRIFPNGDR--V	88
	** * * * * * * * * * *	
AfBgl1.3	VNEKGLQHYVKFVDDLLAAGITPLVTLFHWDLDPALDKRYGGLLNKEEFVADFANYARVM	157
Os4Bglu18	VNPAGIDFYNKLIDSILLKGIQPFVTLTHYDIPQLEDRYGAWLNA-EIQSDFGHFADVC	178
TrBgl12	VNQAGIDHYVKFVDDLLDAGITPFTLFWHDLPEGLHQRYGGLLNREFPLDFENYARVM	150
ThBgl12	INEEGIEFYSNLIDALLKRGVTPWVTLYHWDLPQALHLDRYGGWLNKVEVQLDFERYARLC	155
BglD5	VNEEGLQFYDNLLELEQQGIKPAVTLYHWDLPQALQDK-GGWMNR-DIVEEFAHYCDVI	146
	* * * * * * * * * *	
AfBgl1.3	FNAFGSKVKYWITFNEPWCSSVLGVNQGAFAPGRTSDR--TKSPVGDGSRPWIIVGHNIL	215
Os4Bglu18	FGAFGDRVKYWTTFNEPNVAVRHGYMLGTYPSPRCSPPFGHCARGGDSHAEPYVAHNVI	238
TrBgl12	FRAL-PKVRNWTTFNEPLCSAIPGYGSGTFAPGRQS-----TSEPWTVGHNIL	197
ThBgl12	FERFGDRVKNWITFNEPWIQSIYGYATGNSNAPGRSSIN--KHSTEGDTTTEPWLAKAQI	213
BglD5	FDCFGDRVSNWITFNEPWVVSWLGYGSGEHAPGYRDIP-----GFLKAAHVHL	194
	* * * * * * * * *	
AfBgl1.3	VAHGAVKIYREEFKPRDG-GEIGITLNGDWAEPDWPENPADVEACDRKIEFAISWFADP	274
Os4Bglu18	LSHATAIEIYKRKYQSKQ-RGMIGMVLYSTWYEPDRD-VPEDRLATERALAFETPWFLDP	296
TrBgl12	VAHGRAVKAYRDDFKPASGDGQIGIVLNGDFTYPWDAADPADKEAAERLEFFTAWFADP	257
ThBgl12	MSHARAVAVYSKEFRASQ-RGQIGISLNGDYEPWSSDPRDKEAAERMEFHWYANP	272
BglD5	LSHGVVVKRFR---ERGLQGEIGITLNLSSYPFNE-NASSVEAAVRWDGFLNRWFLDP	249
	* * * * * * * * *	
AfBgl1.3	IYH-GKYPDSMVKQLGDRL--PTWTPEDIALV-HGSNDFYGMNHYCANYIKAKTG--EPD	328
Os4Bglu18	LVY-GDYPPEMRQILGGRL--PSFSPEDRRKL-RYKLDFIGVNHYYTLYARDCMFSDCPQ	352
TrBgl12	IYL-GDYPPASMRKQLGDRL--PTFPEERALV-HGSNDFYGMNHYTSNRYLRHRSS--PAS	311
ThBgl12	IFLKKDYPPASMRKQLGDRL--PALTPADFAILNAGETDFYGMNYYTSQFARHYEG--PVP	328
BglD5	VFK-GQYPADMLEHYSVYTDVDFSVFVKEGDLDTM-SAAVDLFGINYYYSISYLTHQPGAWLEA	307
	* * * * * * * * *	
AfBgl1.3	PNDVAGNLEILLQNKNGEWIGPETQSPWLRPHPIGFRKLLKWLSDRYNQPKIYVTEGTS	388
Os4Bglu18	GQETQHAAAVTGESNGLPIGTPTAMPTFYVVPDIEKMKVYFMRRYNNLPMFITENGYA	412
TrBgl12	ADDTVGNVDVLTNKGQNCIGPETQSPWLRPCAAGFRDFLVWISKRYGYPPIYVTEGTS	371
ThBgl12	KTDFLGAIHEHQENKDGSPVGEESGIFWLRSCPDMFRKHLARVHGLYK-PIYITENGC	387
BglD5	GHEGG-----GHRRTSMGWEVYAKGLSDLLIRLKNYDNPVIYVTEGAA	352
	* * * * * * * * *	
AfBgl1.3	LKGESDLPVDQIVNDDFRVQYFREYIAAMADAYTLDGVNVRAYMAWSLMDNFEWAEGYET	448
Os4Bglu18	QGGDSYTDADWDIDEDRIEYLEGYLTKLAKV-IRDGADVRGYFAWSVVDNFEWLFYTL	471
TrBgl12	IKGESDLPKEKILEDDFRVKYNEYIRAMVTAVELDGVNKGYFAWSLMDNFEWADGYVT	431
ThBgl12	CPGEDKMTCEEAINDPFRIQYFDSHLSISKAISQDGVVVKGYFAWALLDNLEWSDGYGP	447
BglD5	YDDEV---TNGEVHDPERVQYLQEHLDACLDAI-DADVLRGYFAWSFLDNFEWAFGYCK	408
	* * * * * * * * *	
AfBgl1.3	RFGVTFVDYANNQRRIPKKSARKVLEIFDQYIEKA-----	483
Os4Bglu18	RFGLYYIDYRT-QERSPKLSALWYKEFLQNLHENQ-----	505
TrBgl12	RFGVTYVDYENGQKRFKKSARKSLKPLFDELIAAA-----	466
ThBgl12	RFGVTYTDYTT-LKRTPKKSALVLDKMFADRQVRKVAA--	484
BglD5	RFGLVYVDFET-QQRIPKESAKWFQQVILNGLKIQQYTT	447

Fonte: autoria própria.

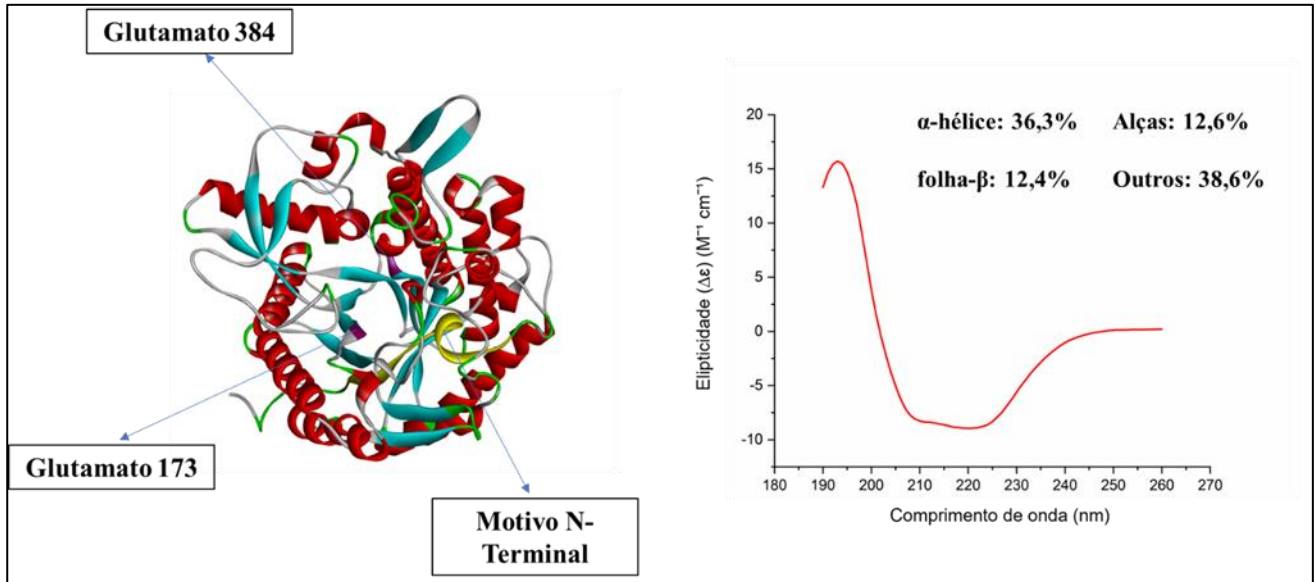
4.2.2 Análise por dicroísmo circular

A fim de complementar as análises da estrutura, realizadas anteriormente por modelagem, foi empregado análises espectroscópicas por dicroísmo circular na AfBgl1.3 recombinante.

Para estruturas α -hélice, o espectro normalmente apresenta uma forte banda positiva na faixa de 191-193 nm, com $\Delta\epsilon$ na ordem de $+21 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e dois picos intensos em 208 nm e 222 nm, com valor típico de $\Delta\epsilon = -11 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A estrutura folha- β , geralmente apresenta uma banda negativa na faixa de 210-225 nm ($\Delta\epsilon = -1$ a $-3.5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e uma intensa banda na faixa de 190-200 nm ($2-6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Já para proteínas que apresentam ambas as estruturas, como a AfBgl1.3, o espectro é dominado pela conformação α -hélice, frequentemente caracterizado pela presença de bandas negativas em 222 e 208 nm, e pico intenso entre 190-195 nm, como é possível observar na Figura 15 (MARTIN; SCHILSTRA, 2008).

A partir do espectro obtido por dicroísmo circular para a AfBgl1.3 recombinante a 25 °C (Figura 15), foi realizado a predição de sua estrutura secundária, na qual foi possível observar que a enzima apresentou 36,3% de α -hélice e 12,4% de folha- β , estimados por BeStSel (MICSONAI et al., 2018). Ao comparar as proporções de α -hélice e folha- β , respectivamente, para a estrutura modelada (Figura 15), dadas pelo Phyre2 (35,0% e 14,0%) e pelo método de Kabsch and Sander (39,8% e 15,3%), pode-se observar que os resultados foram similares, o que indica que a AfBgl1.3, nas condições empregadas na análise por DC, pode estar na sua conformação nativa (KABSCH; SANDER, 1983; KELLEY et al., 2016). Além disso, a enzima TrBgl2 (PDB:3AHY), que compartilha 69% de identidade com a AfBgl1.3, apresenta uma proporção semelhante de α -hélice (41,3%) e folha- β (15,5 %) (JENG et al., 2011).

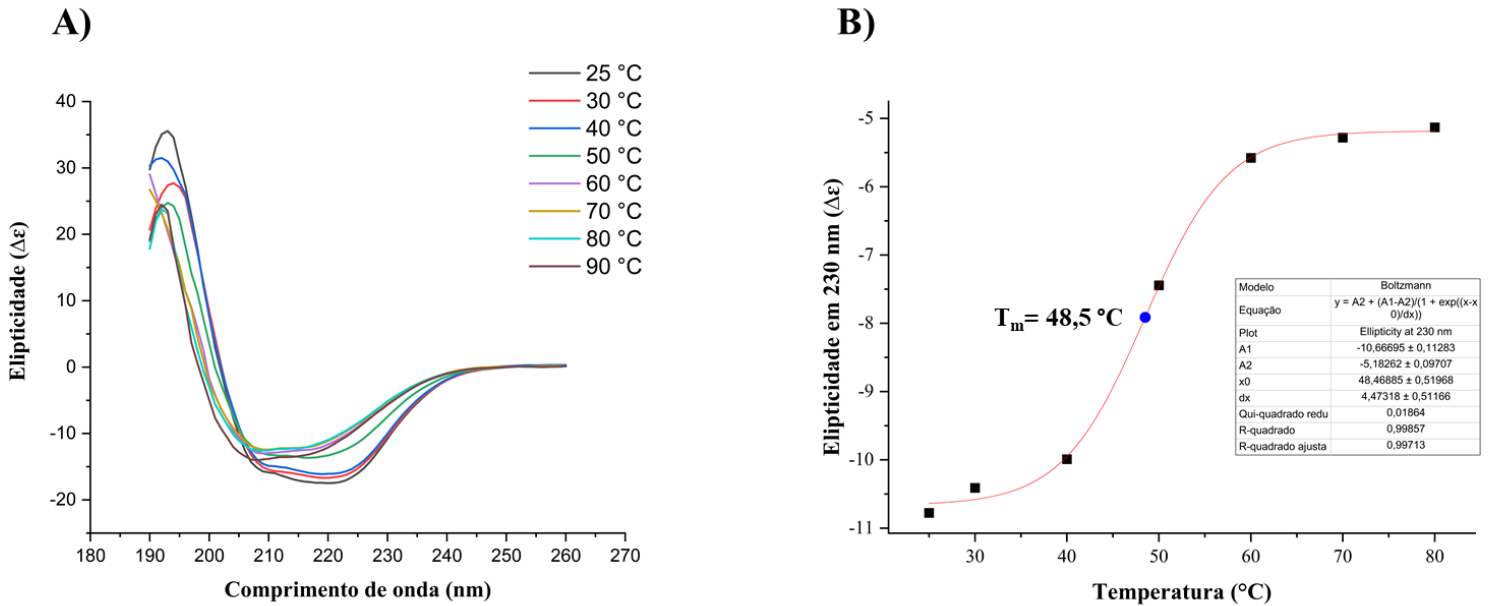
Figura 15 - Análise estrutural da AfBgl1.3. A) Modelagem tridimensional (Phyre2) da β -glicosidase AfBgl1.3, destacando os resíduos catalíticos GLU173 e GLU384 em roxo e o motivo N-terminal em amarelo. B) Espectro obtido por dicroísmo circular na região do UV distante



Fonte: autoria própria.

Ao submeter a AfBgl1.3 em diferentes temperaturas (25 °C – 80 °C) por 30 minutos, foi possível observar as mudanças estruturais da proteína recombinante, a partir da mudança do espectro DC, de acordo com a Figura 16A.

Figura 16 – Análise da AfBgl1.3 recombinante por dicroísmo circular na região do UV distante. (A) Espectro obtido após incubação da enzima em diferentes temperaturas (25 – 80°C), por 30 minutos. (B) Primeira derivada da elipticidade em 230 nm pela temperatura, para determinação do T_m aparente



Fonte: autoria própria.

Observou-se que ao aumentar a temperatura, ocorreu uma mudança no perfil espectroscópico, na qual o pico máximo em 190-195 nm, diminuiu progressivamente, assim como o pico negativo em 208 e 222 nm, o que pontua a diminuição da proporção da estrutura α -hélice. Além disso, observou-se um deslocamento do espectro, para o comprimento de onda de 200 nm, ocorrendo uma mudança mais acentuada na transição entre 40 °C e 50 °C, o que indica tendência de desnaturação da proteína (IRELAND; SULA; WALLACE, 2018).

Complementando esse resultado, ao fazer a derivada primeira da curva de elipticidade em 230 nm ($\Delta\epsilon$) pela temperatura (°C) (Figura 16B), foi possível determinar o ponto médio aparente da temperatura de transição T_m (temperatura de transição da estrutura nativa para desnaturada), que foi de 48,5 °C. Para fins de comparação, valores de T_m encontrados na literatura, baseados em resultado de DC são: para β -glicosidase GH1 ThBgl, $T_m = 49^\circ\text{C}$, em tampão 40 mM HEPES pH 7,5 e 150 mM NaCl, β -glicosidase GH1 Gluc1C, $T_m = 45,2^\circ\text{C}$, em tampão 50 mM fosfato de sódio pH 7,5 e β -glicosidase GH3 Bgl7226, $T_m = 64,5^\circ\text{C}$, em tampão 5 mM Tris-HCl, pH 7,0 (ADLAKHA et al., 2012; SANTOS et al., 2016; LIMA et al., 2020).

O valor de T_m da AfBgl1.3, menor quando comparado ao da Bgl7226, pode estar relacionado a ausência de formação de pontes dissulfeto em sua estrutura, uma vez que a

presença desse arranjo é um dos principais fatores que contribuem para o envelhecimento e termoestabilidade das proteínas (BASHIROVA et al., 2019).

A Tabela 2, representa as proporções das estruturas secundárias da AfBgl1.3 recombinante, para cada temperatura empregada, onde foi possível observar a diminuição da conformação α -hélice e um aumento na conformação folha- β antiparalela, ao aumentar a temperatura.

Tabela 2 - Efeito da temperatura na proporção das estruturas secundárias da AfBgl1.3 recombinante

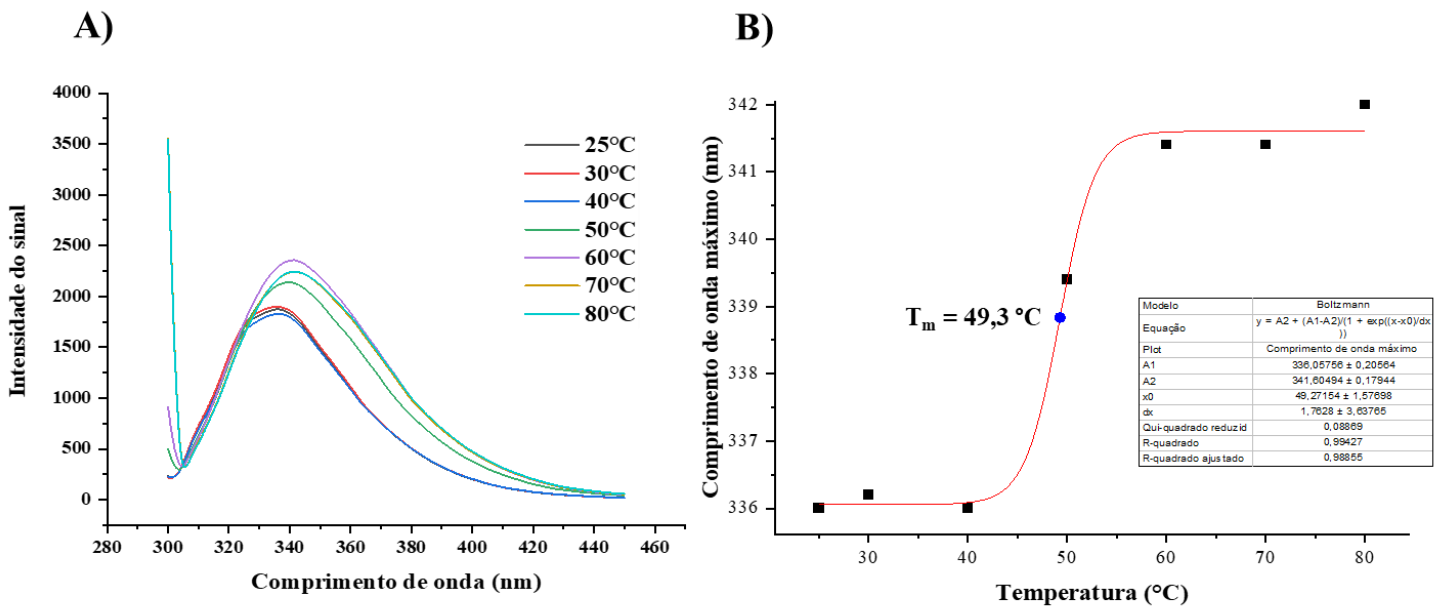
Temperatura (°C)	α-helices (%)	Folhas-β antiparalelas (%)	Folhas-β paralelas (%)	Alças (%)	Outras e desordenadas (%)
25	36,62	3,97	13,84	11,04	34,53
30	38,9	0,43	13,17	11,83	35,67
40	34,72	5,99	13,23	11,84	34,22
50	31,27	9,28	12,57	11,31	35,56
60	27,23	17,43	7,54	10,14	37,66
70	21,16	19,09	10,17	11,14	38,44
80	22,83	16,75	7,53	11,47	41,37

Fonte: autoria própria

4.2.3 Análise por Emissão intrínseca do triptofano

A presença de 16 resíduos de triptofano, torna a AfBgl1.3 sensível a análise por emissão intrínseca de fluorescência do triptofano. Tendo em vista a importância dessa técnica para o estudo da estrutura de proteínas, foi realizado o monitoramento da emissão de fluorescência do triptofano da AfBgl1.3 recombinante, a partir da indução de transições de desdobramento térmico, em diferentes temperaturas (Figura 17A) (25 °C – 80 °C).

Figura 17 - Análise da AfBgl1.3 recombinante por emissão intrínseca do triptofano. (A) Espectro obtido após incubação da enzima em diferentes temperaturas (25 – 80 °C), por 30 minutos. (B) Primeira derivada, do máximo comprimento de onda pela temperatura, para determinação do T_m aparente



Fonte: autoria própria.

Os parâmetros obtidos através do espectro de emissão amplamente utilizados no monitoramento de mudanças estruturais em proteínas são: o comprimento de onda de emissão máxima do triptofano (λ_{max}) e a intensidade da emissão, que são altamente sensíveis ao ambiente local, e que podem ser correlacionados ao grau de exposição do triptofano ao solvente (GHISAIDOOBE; CHUNG, 2014).

Ao aquecer a enzima de 25 °C até 40 °C por 30 minutos, não ocorreu mudança significativa no espectro, o que mostrou que a polaridade envolta do triptofano não mudou significativamente. Porém, de 40 °C para 50 °C, foi possível observar o efeito *red-shift*, na qual o comprimento de emissão máxima deslocou de cerca de 335 nm para 340 nm, indicando a transição e maior exposição dos resíduos de triptofano ao ambiente polar, na qual a enzima se encontrava, o que ocasionou uma relaxação da excitação da fluorescência, ocasionado pela diminuição da energia (SHAH; MISHRA; CHAUDHURI, 2011).

Observa-se a partir do espectro de emissão, que ao aumentar a temperatura, a intensidade do sinal aumenta, o que pode estar relacionado ao afastamento dos resíduos de triptofano de resíduos de aminoácidos polares, como o aspartato, glutamato, lisina, arginina,

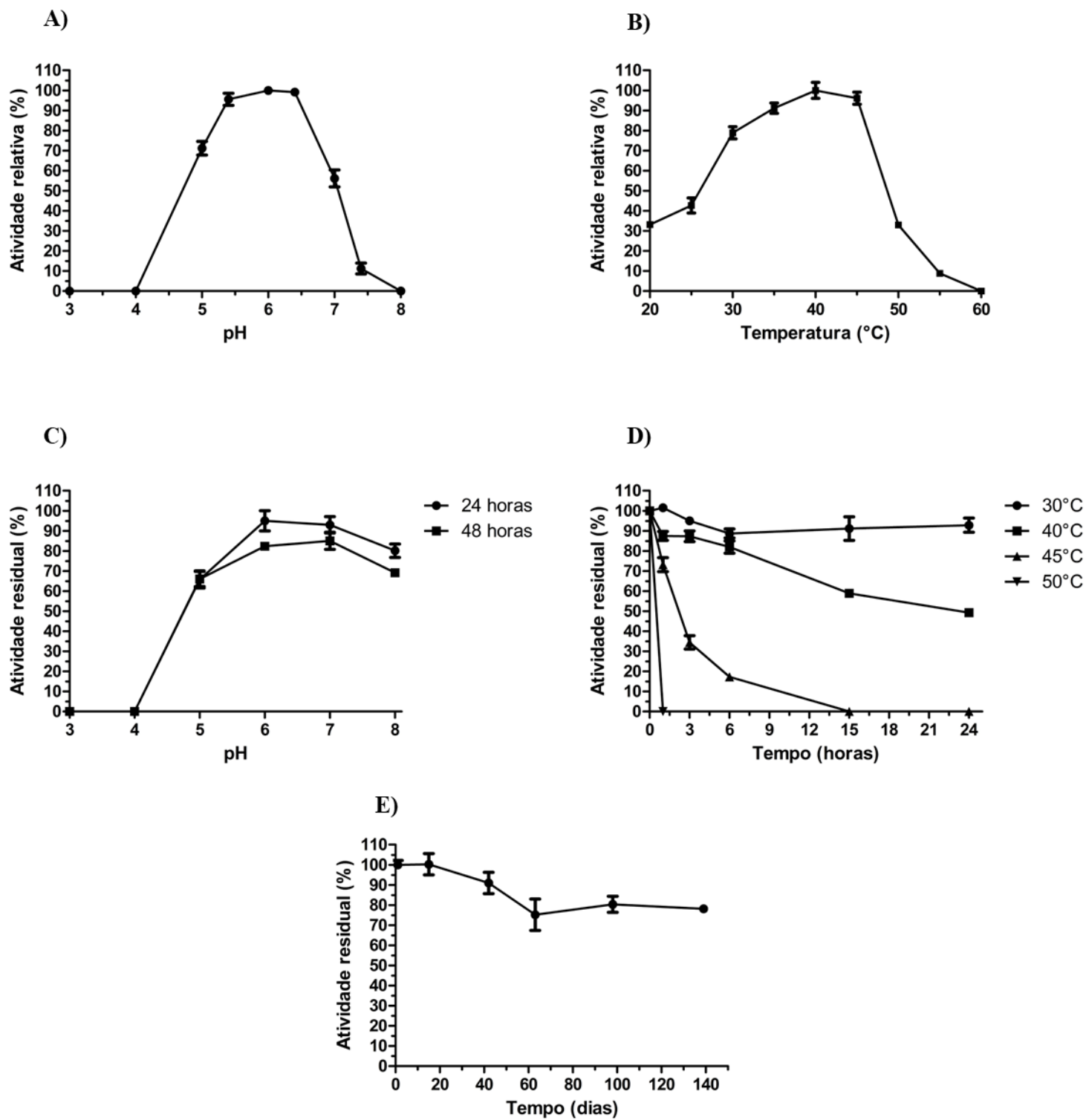
histidina e cisteína, que causam a extinção de fluorescência (LADOKHIN, 2000; GHISAIDOOBE; CHUNG, 2014). Em temperaturas mais elevadas, como em 70 °C e 80 °C, a diminuição da intensidade da fluorescência ocorre devido ao desenovelamento da proteína, pois com o aumento da temperatura, pode ter gerado a agregação da enzima, induzido pela formação de ligações intermoleculares (APRODU et al., 2017).

Da mesma forma que descrito anteriormente, a derivada primeira do comprimento de onda máximo (nm) pela temperatura (°C), (Figura 17B), mostrou os estados bem definidos: nativo (25–40 °C) e desnaturado (60–80 °C) e determinou o ponto médio aparente, ($T_m = 49,3$ °C), valor próximo ao dado pelo dicroísmo circular.

4.3 Caracterização bioquímica da AfBgl1.3 recombinante

A partir da enzima recombinante purificada, foram avaliadas as condições ótimas para a atividade da AfBgl1.3 recombinante sobre o substrato D-(-)-Salicina. A caracterização enzimática, demonstrou que a AfBgl1.3 apresenta ótima atividade na faixa de pH 5,4-6,4 (95-100% da atividade máxima), com a maior atividade em pH 6,0 (Figura 18A). A AfBgl1.3 também mostrou ótima atividade na temperatura de 40 °C (100%), mantendo cerca de 90% e 95% de sua atividade máxima, nas temperaturas de 35 °C e 45 °C, respectivamente (Figura 18B). Na literatura estão descritas diferentes β -glicosidases, sendo que a maior parte delas apresenta atividade ótima na faixa de pH 5-8 e na faixa de temperatura entre 40-70 °C (GODSE et al., 2021).

Figura 18 - Estabilidade e condições ótimas para a atividade da AfBg11.3 recombinante. A) Curva de pH. B) Curva de temperatura. C) Estabilidade ao pH. D) Termoestabilidade. E) Estabilidade na geladeira (4 °C)



Fonte: autoria própria

A avaliação da termoestabilidade da AfBgl1.3 (Figura 18D), após pré-incubação nas temperaturas de 30, 40, 45 e 50 °C, em diferentes tempos, mostrou que a enzima se apresenta estável nas temperaturas de 30 °C e 40 °C, retendo cerca de 90% e 50% de sua atividade inicial, respectivamente, após 24 horas de pré-incubação. Na temperatura de 45 °C, a AfBgl1.3 reteve cerca de 70% de sua atividade após 1 hora de pré-incubação, perdendo totalmente sua atividade após 15 horas. A 50 °C, a AfBgl1.3 não apresentou atividade em nenhum dos tempos avaliados, o que corrobora os resultados apresentados na análise de dicroísmo circular e emissão intrínseca do triptofano, que apresentaram valores de T_m de 48,5 °C e 49,3 °C, ou seja, após perder cerca de 50% da conformação nativa, a AfBgl1.3 recombinante perdeu sua atividade enzimática.

Esses resultados demonstram que a AfBgl1.3 não é uma enzima que apresenta elevada termoestabilidade, o que pode ser explicado novamente pela falta de pontes dissulfeto em sua estrutura. Dessa forma, a estabilidade foi observada em temperaturas de 30 °C e 40 °C.

Um dos principais desafios dos processos de sacarificação e fermentação simultâneas e do bioprocessamento consolidado é a disponibilidade de enzimas que apresentam alta atividade hidrolítica e que ainda sejam estáveis na mesma temperatura de crescimento do microrganismo usado no processo para a fermentação a etanol. Como a maioria dos microrganismos utilizados apresentam temperatura ótima para a fermentação entre 28 e 37 °C, a AfBgl1.3 pode ser uma candidata para esse tipo de emprego biotecnológico (HASUNUMA; KONDO, 2012; PRATTO et al., 2020).

Uma outra abordagem relevante do ponto de vista industrial é a estabilidade de armazenamento da enzima na geladeira. Avaliando esse parâmetro, verificamos que a AfBgl1.3 reteve cerca de 75% de sua atividade, após 140 dias a aproximadamente 4 °C, quando armazenada no tampão fosfato de sódio 20 mM, NaCl 500 mM (pH 7,4), sem a adição de estabilizantes, demonstrando que a enzima é altamente estável nessa temperatura (Figura 18E).

A estabilidade frente a diferentes pH, como pode ser observado na Figura 18C, demonstrou que a AfBgl1.3 é consideravelmente estável na faixa de pH de 5-8, retendo cerca de 65% de sua atividade original, após 48 horas de pré-incubação. Em pH mais ácidos, como pH 3 e 4, a enzima perdeu totalmente sua atividade. A estabilidade ao pH é uma característica desejável em indústrias como de alimento e de biorrefinarias de lignocelulose (XIA et al., 2016).

A Tabela 3, apresenta uma comparação entre as propriedades bioquímicas de algumas β -glicosidases da família GH1. Pode-se observar que a maioria das β -glicosidases descritas na tabela apresentam temperatura ótima maior que 40 °C, o que dificulta atualmente o emprego dessas enzimas de forma otimizada em usinas de bioprocessamento consolidado e de

fermentação e sacarificação simultânea. Além disso, dentre as enzimas que apresentam temperatura ótima de 40 °C, como a MaGlu1A de *Microbulbifer* sp. ALW1 e Bg1NB11 de *Saccharomonospora* sp. NB11, a AfBgl1.3 demonstrou ser mais termoestável nessa temperatura.

Tabela 3 - Comparação das propriedades bioquímicas de β -glicosidases GH1 de diferentes organismos

Organismo de origem	Nome da proteína	Sistema de expressão	T ótima	pH ótimo	Termoestabilidade	Estabilidade ao pH	Referência
<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293	AfBgl1.3	<i>Pichia pastoris</i> X-33	35-45 °C	5,4-6,4	60% de atividade residual após 15 horas a 40°C e 90% de atividade residual após 24 horas a 30°C.	Atividade residual >70% após 24 e 48 horas de incubação na faixa de pH 5-8.	Este estudo
<i>Paecilomyces thermophila</i>	PtBglu1	<i>Pichia pastoris</i> GS115	55 °C	6	Cerca de 88% de atividade residual após 30 minutos a 55°C.	Atividade residual >80% na faixa de pH (5,0-11,0)	(YANG et al., 2013)
<i>Jeotgalibacillus malaysiensis</i>	BglD5	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	65 °C	7	t _{1/2} 65 °C = 35 min (com cálcio); t _{1/2} 65 °C = 70 min (sem cálcio)	-	(LIEW et al., 2018)
<i>Bacillus</i> sp. CGMCC 1.16541	BsBgl1A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	45 °C	5,6 -7,6	Cerca de 100% de atividade residual após 120 min a 45 °C; t _{1/2} 50°C = 58 min	Aproximadamente 100% de atividade residual na faixa de pH 4-9, após 24	(YIN et al., 2020)

<i>Microbulbifer</i> sp. ALW1	MaGlu1 A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	40 °C	4,5	34,0 % de atividade residual após 0,5 h a 40°C	e 48 horas de pré-incubação -	(JIANG et al., 2021)
<i>Saccharomono</i> <i>spora</i> sp. NB11	BglNB1 1	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	40 °C	7	40% de atividade residual a 40 °C por 2 h e 70 % de atividade residual após 24 h na faixa de temperatura de 25–35 °C	Atividade residual >50% após 8 horas de pré-incubação na faixa de pH 6-10.	(SALEH ZADA et al., 2021)
<i>Anoxybacillus</i> <i>thermarum</i>	BgAt	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	65 °C	7	Aproximadamente 100% de atividade residual após 24 horas a 50°C; 80% de atividade residual a 60 °C após 6 horas e 41% após 24 horas	Indução da atividade enzimática na faixa de pH 4,0–6,5 após 15 min de pré-incubação	(ALMEIDA et al., 2020)
<i>Trichoderma</i> <i>reesei</i>	bg11	<i>Pichia pastoris</i> GS115	70 °C	5	Atividade residual >90% a 60°C por 60 min	Atividade residual >90% na faixa de pH 4-7.	(CHEN et al., 2011)

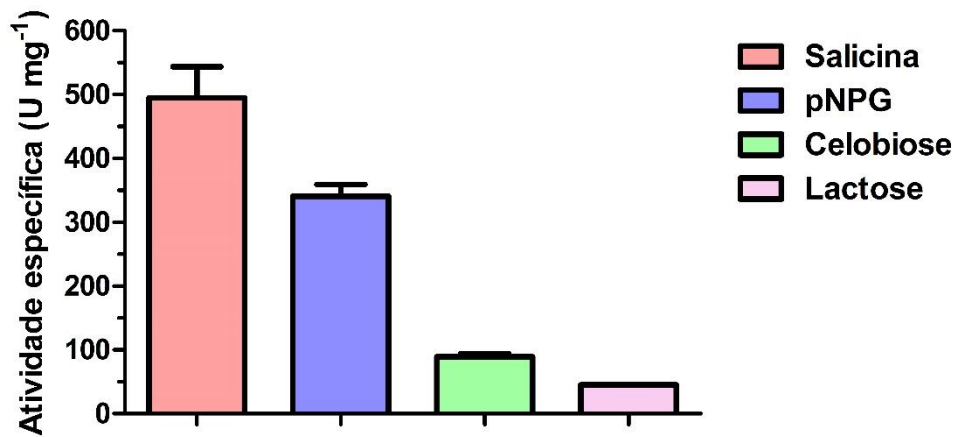
<i>T. halotolerans</i> <i>YIM 90462^T</i>	ThBGL1 A	<i>E. coli</i> <i>BL21</i>	40-55 °C	5,6-6,6	Cerca de 100% de sua atividade residual a 40°C após 2 horas; $t_{1/2}$ 50°C = 58 min	>60% de atividade residual após 12h e 24h de pré-incubação na faixa de pH 5-8 Atividade residual manteve-se próximo a 90% após 1 hora de pré-incubação na faixa de pH 5,0-8,0	(YIN et al., 2021)
<i>Dictyoglomus turgidum</i>	<i>Dtur</i> βGl u	<i>E. coli</i> <i>BL21</i> (<i>DE3</i>)- <i>RIL</i>	80 °C	5,4	Após 2 horas de pré-incubação a 70 °C e 80 °C, a atividade residual foi de 70% e 50%, respectivamente		(FUSCO et al., 2018)

Fonte: autoria própria.

4.4 Ensaio de especificidade ao substrato

A atividade hidrolítica da AfBgl1.3 recombinante foi testada em diferentes substratos, como os substratos naturais (salicina, celobiose e lactose) e sintéticos *p*-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo, com ligações glicosídicas β(1→4). A Figura 19, mostra que a AfBgl1.3 demonstra maior atividade sobre os substratos salicina ($495,0 \pm 49,0$ U mg⁻¹) e pNPG ($340,5 \pm 18,6$ U mg⁻¹), comparado a atividade sobre a celobiose ($89,3 \pm 5,1$ U mg⁻¹) e a lactose ($45,1 \pm 0,5$ U mg⁻¹).

Figura 19 - Atividade específica (U mg^{-1}) da AfBgl1.3 recombinante sobre Salicina, pNPG, celobiose e lactose. Os valores foram dados pela média \pm desvio padrão de 3 replicatas



Fonte: autoria própria.

As β -glicosidases são agrupadas de acordo com a sua especificidade ao substrato em: (i) Aril- β -glicosidases, que possuem grande afinidade por aril- β -glicosídeo, como a Salicina e o p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo; (ii) celobiasas, que atuam apenas em oligossacarídeos, como celobiose e lactose; e (iii) β -glicosidases de ampla especificidade, que apresentam atividade em diferentes tipos de substrato, sendo o grupo mais comum observado em β -glicosidases (RIOU et al., 1998). Nesse contexto a AfBgl1.3 recombinante pode ser classificada como uma β -glicosidase de ampla especificidade.

Diversas β -glicosidases da família GH1, assim como a AfBgl1.3, apresentam alta especificidade por aril- β -D-glicosídeos como a salicina e o pNPG, substratos nos quais o grupo aglicona é aromático. β -glicosídeos aromáticos são largamente encontrados em plantas, e a presença de um sistema enzimático específico para esse tipo de substrato está relacionado ao papel do *A. fumigatus* na degradação de biomassas vegetais (UCHIYAMA; MIYAZAKI; YAOI, 2013).

As variações na especificidade ao substrato das β -glicosidases são provenientes da diferença entre os organismos de origem e também nas diferenças estruturais. Embora, as enzimas GH-A, na qual se insere a família GH1 de β -glicosidases, apresentam similaridades em sua estrutura, como o domínio $(\alpha/\beta)_8$ barril presente em seu sítio catalítico, diferenças podem ser encontradas nos loops de superfície, presentes ao redor do local de ligação da aglicona (subsítio -1), o que está relacionado as diferenças na especificidade ao substrato (XU

et al., 2020). Em seu trabalho, BAIYA et al., (2021), realizou a sobreposição das estrutura cristalográficas das β -glicosidases GH1 Os4Bglu18 e Os3Bglu7, na qual foi possível observar que ambas enzimas apresentaram a mesma estrutura geral, porém os 4 loops (LA, LB, LC e LD) presentes ao redor do sitio ativo, apresentaram claras diferenças, como no formato, comprimento, composição dos resíduos de aminoácido, densidade e presença de ligações dissulfeto, e foi sugerido que todas essas diferenças estruturais, estão relacionadas as diferenças na especificidade de ambas as enzimas por seus substratos naturais.

4.5 Determinação dos parâmetros cinéticos

O estudo dos efeitos de concentrações crescentes de substratos (pNPG, salicina e celobiose) sobre a atividade da AfBgl1.3 recombinante purificada, foram realizadas sobre as condições otimizadas (pH 6,0 e 40 °C). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

A partir dos resultados obtidos foi possível observar que para os três substratos, a AfBgl1.3 apresentou comportamento típico da cinética de Michaelis-Menten. Ou seja, conforme aumentou-se a concentração de substrato, a velocidade de reação aumentou até atingir valor próximo a V_{max} , valor no qual toda a enzima presente no meio reacional se encontra na forma de complexo enzima-substrato e que o aumento na concentração de substrato não confere mais acréscimo em sua velocidade (LINEWEAVER; BURK, 1934).

Os valores das constantes cinéticas, V_{max} , K_M , k_{cat} e k_{cat}/k_m , obtidas para os três substratos, por regressão não-linear, estão representados na Tabela 4.

Tabela 4 - Constantes cinéticas para a AfBgl1.3 recombinante. Foi utilizado na reação 0,25 μ g de enzima

Substrato	V_{max} (U mg⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat} (s⁻¹)	k_{cat}/K_M (M⁻¹s⁻¹)
pNPG	656,0 \pm 17,5	7,6 \pm 0,8	595,8	7,8 x 10 ⁴
Salicina	706,5 \pm 23,8	17,6 \pm 1,9	621,7	3,5 x 10 ⁴
Celobiose	132,6 \pm 7,1	15,4 \pm 2,5	120,4	7,8 x 10 ³

Fonte: autoria própria.

Como pode ser observado, a eficiência catalítica na presença do substrato colorimétrico pNPG (7,8 x 10⁴ M⁻¹s⁻¹), foi 10 vezes maior, em relação a eficiência catalítica para a celobiose

($7,8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), o que corrobora com o modelo para preferência e especificidade ao substrato proposto por NAM, SUNG e HWANG (2010). A partir de várias estruturas cristalográficas, obtidas em diferentes etapas reacionais, como de pré-reação, etapa intermediária e pós-reação, foi possível obter um retrato instantâneo do processamento catalítico da β -glicosidase, em diferentes substratos. A partir do estado intermediário (hidrólise do substrato), foi possível sugerir um modelo para a especificidade ao substrato. Observou-se que o sítio S1, da ligação do substrato, é rígido, ou seja, o bolso do sítio catalítico é uma estrutura fixa, portanto, a cinética das BGLs depende da configuração do substrato.

No modelo proposto para a celobiose, essa apresenta um modo de ligação, na qual uma das glicoses se liga no bolso S1 (bolso anterior a posição de clivagem), entretanto a segunda glicose, se sobrepõe a superfície do bolso S1' (bolso adjacente a posição de clivagem), devido ao impedimento estérico. Como a β -glicosidases apresentam bolso S1 rígido, a segunda glicose altera a configuração da celobiose, rotacionando a ligação σ . Para o modelo sugerido ao substrato pNPG, a molécula de glicose presente no substrato, apresenta um modo de ligação no bolso S1 semelhante a celobiose, entretanto, como o *p*-nitrofenil, apresenta um tamanho menor, comparado a glicose, esse grupo é relativamente livre para se mover no bolso S1'. Portanto, como a celobiose requer uma mudança conformacional para a sua hidrólise, diferente do substrato pNPG, a eficiência catalítica ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$) para esse substrato é menor em comparação ao substrato sintético (NAM; SUNG; HWANG, 2010).

Esse resultado é semelhante para outras β -glicosidases da família GH1, como a β -glicosidase TsBGL, de *Thermofilum* sp. ex4484_79, que apresentou $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ para o substrato pNPG ($220,5 \text{ mm}^{-1}\text{s}^{-1}$), cerca de 58 vezes maior, comparado a eficiência em celobiose ($3,81 \text{ mm}^{-1}\text{s}^{-1}$) (CHEN et al., 2021) e a β -glicosidase BGLA, de *Alteromonas* sp. L82, que apresentou $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ para o substrato pNPG ($36,5 \text{ mM}^{-1}\text{S}^{-1}$), aproximadamente 28 vezes maior que para o substrato celobiose ($1,3 \text{ mM}^{-1}\text{S}^{-1}$) (SUN et al., 2020).

4.6 Efeito de diferentes íons e reagentes sobre a atividade da AfBgl1.3 recombinante

As β -glicosidases são enzimas comumente utilizadas em diversos processos industriais. Portanto, o efeito positivo ou negativo de diferentes aditivos na atividade dessas enzimas, deve ser considerado durante o seu emprego em escala industrial (Tabela 5).

Tabela 5 - Efeito de diferentes íons e reagentes, na concentração final de 5 mM, sobre a atividade da AfBgl1.3 recombinante

Aditivo	Atividade relativa (%)	Aditivo	Atividade relativa (%)
Controle	100,0 ± 3,0	MgSO ₄	91,4 ± 0,0
SDS	0	AgNO ₃	0
Triton X-100	123,1 ± 2,6	CoCl ₂	39,9 ± 5,4
EDTA	94,5 ± 2,3	MnCl ₂	114,5 ± 1,2
β-mercaptoetanol	103,5 ± 3,8	CaCl ₂	83,8 ± 1,7
DMSO	116,3 ± 3,9	KCl	108,4 ± 2,1
Ácido Ascórbico	0	Tween 20	118,2 ± 2,5
CuSO ₄	0	SLS	0
FeSO ₄	31,4 ± 1,1	(NH ₄) ₂ SO ₄	108,7 ± 1,2
ZnSO ₄	0	DTT	111,2 ± 2,3

Fonte: autoria própria.

Pode-se observar na Tabela 5 que a atividade da AfBgl1.3 recombinante não é afetada pelo quelante EDTA (94,5%), reagente geralmente empregado como inibidor de metaloproteases, esse resultado sugere que a AfBgl1.3 não é uma metaloproteína, já que o EDTA se liga a íons divalentes (FANG et al., 2010; MILLES et al., 2018). Enquanto o agente redutor, β-mercaptoetanol, que reduz pontes dissulfeto, não afetou significativamente a atividade da enzima (103,5%), o agente redutor DTT, geralmente utilizado como estabilizador de proteínas que apresentam em sua estrutura grupos sulfidril livres, estimulou moderadamente sua atividade (111,2 %), indicando que a catálise enzimática da AfBgl1.3 não perde sua atividade em condições redutoras, e que a AfBgl1.3, que não apresenta pontes dissulfeto, não

teve alterações em sua estrutura (LAURO; ROSSI; MORACCI, 2006; YIN et al., 2020; BERNARDI et al., 2021).

A adição de surfactantes na reação foi responsável por diferentes efeitos na atividade enzimática da AfBgl1.3. Na presença do surfactante aniônico SDS a AfBgl1.3 perdeu totalmente sua atividade, efeito esperado pois o reagente SDS é um forte desnaturante de proteínas, sendo capaz de quebrar as interações iônicas, hidrofóbicas e as ligações de hidrogênio, formando um complexo negativamente carregado SDS-enzima, que leva a sua inativação (HOU; HE; WANG, 2020). Com a adição do surfactante aniônico SLS, a AfBgl1.3 também perdeu totalmente sua atividade. Porém, quando exposta aos surfactantes não iônicos Tween 20 e Triton X-100, a AfBgl1.3 teve sua atividade induzida (118,2% e 123,1%, respectivamente). Tolerância a esses surfactantes é um resultado interessante no ponto de vista industrial, já que muitos deles são utilizados em refinarias de etanol de segunda geração, para evitar a adsorção irreversível das enzimas hidrolíticas na lignina durante o processo de sacarificação da biomassa (SEO; FUJITA; SAKODA, 2011; CHENG; YU; ZHU, 2014).

A adição de DMSO ao meio reacional induziu a atividade da AfBgl1.3 (116,3 %). O DMSO é um reagente comumente utilizado como co-solvente em reações enzimáticas, capaz de solubilizar substratos e moléculas indutoras de atividade, que são pouco solúveis, como polímeros, surfactantes e carboidratos, além disso, ele pode suprimir reações indesejadas que dependem de água, pode direcionar a enantioseletividade das reações enzimáticas e aumentar a termoestabilidade das proteínas (SHAH et al., 2006; OSTERMEIER; OLIVA; WINTER, 2020).

A presença de íons Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , K^+ e NH_4^+ , não afetaram significativamente a atividade da AfBgl1.3, porém a adição de íons Fe^{2+} e Co^{2+} , reduziram a atividade enzimática para 31,4% e 39,9%, respectivamente. Já a adição dos íons Cu^{2+} , Zn^{2+} e Ag^{2+} , fez com que a atividade da enzima fosse totalmente perdida. Metais pesados, como o cobre, possuem alta afinidade pelos grupos tiol, presentes na cadeia lateral dos resíduos de cisteína, o que pode promover a inibição enzimática, após a oxidação desses grupos funcionais (BONFÁ et al., 2018).

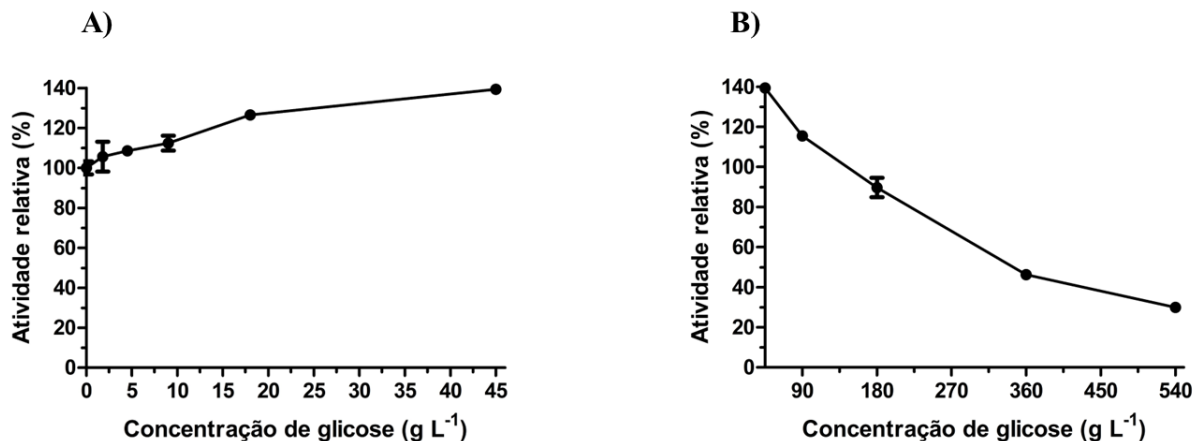
4.7 Efeito da presença de glicose sobre a atividade da AfBgl1.3 recombinante

As β -glicosidases são enzimas chaves para a conversão da celulose em açúcares fermentescíveis, funcionando como a enzima limitante do processo. Um fator importante que pode limitar suas aplicações industriais, é a inibição por glicose, principalmente na hidrólise de

biomassas. A conversão da celobiose em glicose, é a última etapa do processo, assim, β -glicosidases sensíveis à glicose, não são capazes de converter de forma eficiente a celobiose, gerando seu acúmulo. Esse acúmulo é prejudicial ao processo, pois a celobiose atua como inibidora das outras enzimas envolvidas no processo, como as endoglucanases e celobiohidrolases, o que compromete de forma geral a sacarificação. Sendo assim, a suplementação em coquetéis enzimáticos de β -glicosidases estimuladas e/ou tolerantes a glicose pode aumentar significativamente a concentração de açúcares fermentescíveis no final do processo, o que pode levar a um maior rendimento de bioetanol (RAJASREE et al., 2013).

Devido à importância de se caracterizar novas β -glicosidases tolerantes a glicose, foi realizado o ensaio de inibição por glicose, na qual foi avaliado a atividade relativa em concentrações crescentes de glicose, de 0 a 540 g L⁻¹ (Figura 20).

Figura 20 - Efeito inibitório da presença de glicose na atividade da AfBgl1.3 recombinante durante a hidrólise de pNPG. A) 0-45 g L⁻¹ de glicose. B) 45-540 g L⁻¹ de glicose



Fonte: autoria própria.

Como pode ser observado, a AfBgl1.3 recombinante apresentou uma característica interessante quanto a inibição por glicose. A sua atividade foi estimulada em uma ampla faixa de concentração de glicose (1,8 – 90 g L⁻¹). Na concentração de 45 g L⁻¹ de glicose, observou-se aumento de cerca de 1,4 vezes na atividade da enzima. A partir dessa concentração, a atividade começou a decair, chegando a cerca de 90%, 50% e 30% na presença de 180 g L⁻¹, 360 g L⁻¹ e 540 g L⁻¹ de glicose, respectivamente. Devido a esse perfil, a AfBgl1.3 pode ser classificada com uma β -glicosidase estimulada por baixas concentrações de glicose e inibida por altas concentrações de glicose (SALGADO et al., 2018). A tolerância e estimulação por

glicose da AfBgl1.3 nessa ampla faixa de concentração é interessante no ponto de vista industrial, uma vez que a concentração de glicose durante a sacarificação de biomassas lignocelulósicas em altas concentrações de sólido pode chegar na faixa de 117-180 g L⁻¹ (MELEIRO et al., 2015).

Apesar da tolerância a glicose ser descrita em diversas β -glicosidases da família GH1, o mecanismo da estimulação da atividade dessas enzimas ainda não está completamente elucidado.

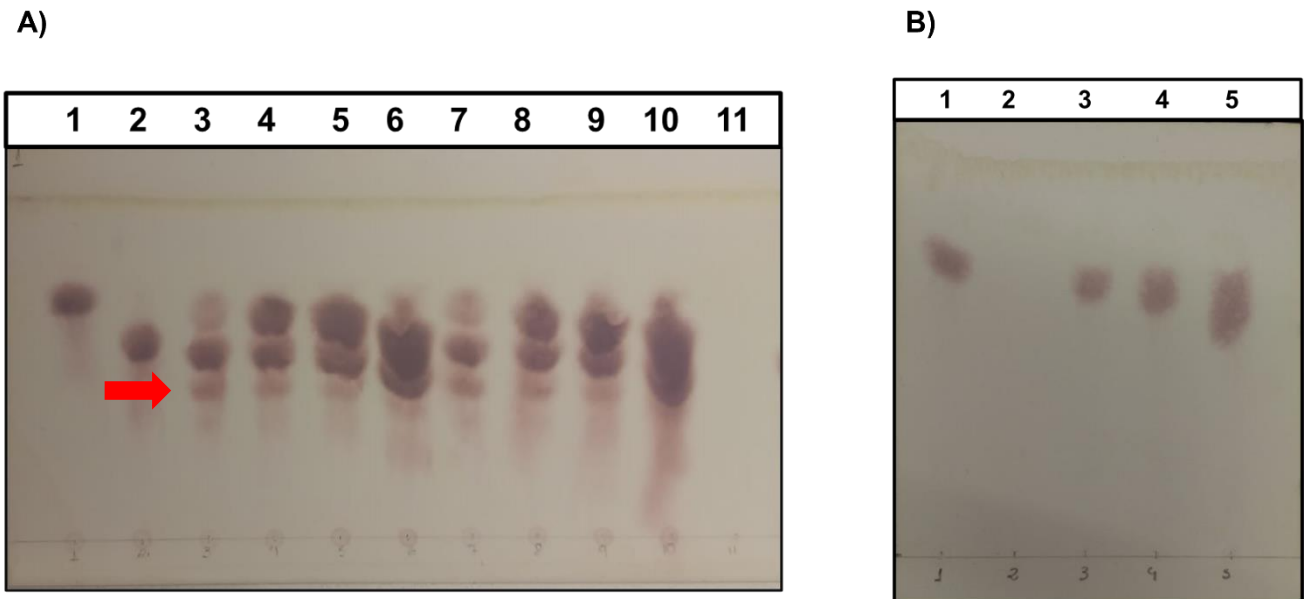
Atualmente, sugere-se que essa maior tolerância à glicose das BGLs da família GH1 quando comparado às da família GH3, está relacionada à facilidade com que a glicose interage ao sítio catalítico, enquanto BGLs GH1 normalmente apresentam sítio catalítico profundo com cavidade estreita, as BGLs GH3 apresentam sítio ativo em um bolso superficial (DE GIUSEPPE et al., 2014). O sítio de ligação da aglicona profundo e estreito, presente nas β -glicosidases GH1, obstrui o caminho da glicose até o subsítio -1 (sítio de ligação para glicona). De acordo com os resultados apresentados por DODDA et al., (2018), por meio da análises da estrutura 3-D obtidas por modelagem, foi possível observar que as β -glicosidases GH1 do fungo *A. fumigatus* apresentam sítio catalítico profundo e estreito, incluindo a AfBgl1.3, o que pode explicar a sua tolerância a glicose.

Análises por docking molecular das β -glicosidases de *A. fumigatus* também mostram que durante a catálise enzimática, moléculas de glicose se ligam em outro espaço além do sítio catalítico com uma energia de ligação de -6,1 kcal/mol para as enzimas GH1 e -5,9 kcal/mol para as enzimas GH3, diminuindo a competição entre o substrato e a glicose pelo sitio ativo, sugerindo que as β -glicosidases da família GH1 de *A. fumigatus* são mais tolerantes a glicose em comparação a família GH3 (DODDA et al., 2018).

4.8 Determinação da atividade de transglicosilação da AfBgl1.3 por cromatografia em camada delgada (CCD)

Muitos estudos relacionam a tolerância e estímulo por glicose das β -glicosidases com sua atividade de transglicosilação (SALGADO et al., 2018). A fim de se investigar essa atividade, realizou-se um ensaio por CCD, em que permitiu a avaliação dos produtos formados pela ação da AfBgl1.3 sobre o substrato celobiose na presença ou ausência de glicose, no tempo de 30 e 60 minutos de reação, (Figura 21).

Figura 21 - Análise dos produtos liberados na reação da AfBgl1.3 recombinante sobre: A) concentração saturante de celobiose (1% (p/v)). Coluna 1: padrão de glicose; coluna 2: padrão de celobiose; coluna 3, 4, 5 e 6: reação de 30 minutos na presença de 0, 10, 20 e 45 g L⁻¹ de glicose, respectivamente; coluna 7, 8, 9 e 10: reação de 60 minutos na presença de 0, 10, 20 e 45 g L⁻¹ de glicose. Coluna 11: AfBgl1.3 em 50 mM de tampão fosfato de sódio pH 6,0. B) ausência de celobiose. Coluna 1: padrão de glicose; coluna 2: AfBgl1.3 em 50 mM de tampão fosfato de sódio pH 6,0; coluna 3, 4, 5: reação de 30 minutos na presença de 10, 20 e 45 g L⁻¹ de glicose, respectivamente



Fonte: autoria própria.

Observa-se que tanto na ausência (colunas 3 e 7), quanto na presença do monossacarídeo (colunas 4, 5, 6, 8, 9 e 10) na reação da AfBgl1.3 sobre a celobiose, ocorre a liberação de outro produto de reação além da glicose (seta vermelha), indicando que a AfBgl1.3 apresenta atividade de transglicosilação (Figura 21A). Além disso, observa-se na figura 21B, que a AfBgl1.3 não é capaz de sintetizar ligações glicosídicas a partir de moléculas de glicose, na ausência do substrato celobiose.

De acordo com o modelo apresentado por YANG et al., (2015), a estimulação por glicose de algumas β -glicosidases GH1 ocorre pela ligação do monossacarídeo em um subsítio da enzima, promovendo a atividade de clivagem do substrato por transglicosilação.

Foi proposto que a formação de diferentes produtos a partir desse mecanismo ocorre devido a acomodação da glicose com diferentes orientações no subsítio +1 da enzima, o que permite a formação de ligações glicosídicas β -1-2, β -1-3 ou β -1-4 entre a glicose (acceptor) e o intermediário glicosil-enzima, durante a etapa de deglicosilação (DE GIUSEPPE et al., 2014).

A atividade de transglicosilação é encontrada em outras β -glicosidases estimuladas e tolerantes a glicose. A β -glicosidase Unbgl1A foi capaz de formar celotriose a partir de

celobiose após 48 horas de reação a 37 °C (LU et al., 2013). A β -glicosidase Td2F2 gerou celobiose, sofrorose, laminaribiose e gentiobiose ao reagir com 1,25; 5,0 ou 10 mM de celobiose na presença de 125-1000 mM de glicose. Entretanto, quando a enzima foi incubada apenas na presença de celobiose, o principal produto da reação foi glicose e nenhum produto de transglicosilação foi detectado, diferente da AfBgl1.3 que formou produto na ausência de glicose (UCHIYAMA; MIYAZAKI; YAOI, 2013).

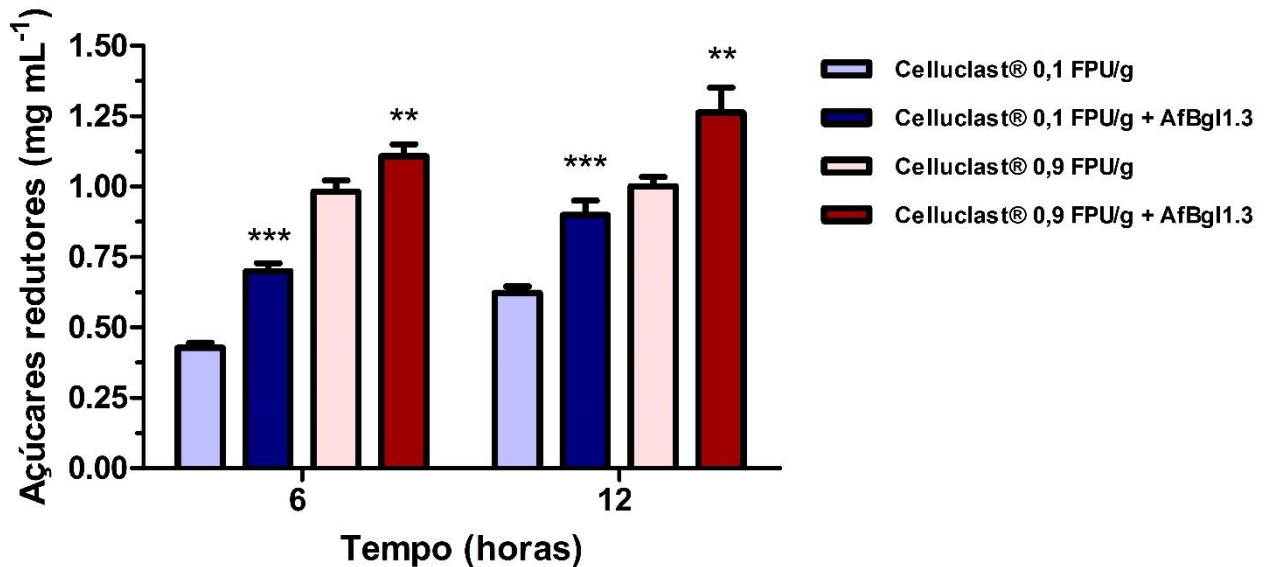
Recentemente, foi observado que a atividade de transglicosilação beneficia a produção de enzimas lignocelulolíticas, já que alguns produtos normalmente formados por esse mecanismo, como a celobiose e sofrorose, são indutores de celulasas em fungos, como o *T. reesei*. Essa característica tem sido investigada e descrita como uma forma econômica de gerar indutores de celulasas, já que a produção atual desses reagentes é cara e agrega custo no processo de produção dessas enzimas (STERNBER; MANDELS, 1979; SINGHANIA et al., 2017).

4.9 Ensaio de sinergismo

4.9.1 Efeito da suplementação da AfBgl1.3 junto ao coquetel comercial Celluclast® 1.5L

Para avaliar a eficiência da suplementação do coquetel comercial Celluclast® 1.5L com 2,5 μ g da AfBgl1.3 recombinante, na degradação de CM-celulose, a mistura foi incubada nas condições otimizadas da AfBgl1.3 (pH 6,0 e 40 °C) e a concentração dos açúcares solúveis foi monitorada por até 12 horas (Figura 22).

Figura 22 - Avaliação da suplementação da AfBgl1.3 em coquetel comercial Celluclast® 1.5L durante a degradação de CM-celulose. Os valores foram dados pela média \pm desvio padrão de 4 replicatas experimentais. Diferenças significativas entre os grupos de tratamento foram analisadas usando o teste t (significância, $p < 0,05$)



Fonte: autoria própria.

As reações foram realizadas em temperatura de 40 °C, diferente das condições normalmente empregadas na sacarificação (45-50 °C), pois além de ser a temperatura ótima para a AfBgl1.3 recombinante, está dentro da faixa de temperatura na qual o coquetel Celluclast 1.5L atua (25-60 °C) (GAMA; VAN DYK; PLETSCHE, 2015). Além disso, quando avaliada a eficiência de três coquetéis comerciais (ACCELLERASE®1500, Celluclast 1.5L e Cellic®CTec2), durante o processo de hidrólise de lodo de papel reciclado, o coquetel Celluclast 1.5L demonstrou menor estabilidade em temperaturas de 45-55°C, quando comparado aos outros coquetéis, entretanto, em temperatura mais moderada (40 °C), tanto sua estabilidade, tanto a conversão do substrato, foram maiores (GOMES; GAMA; DOMINGUES, 2018).

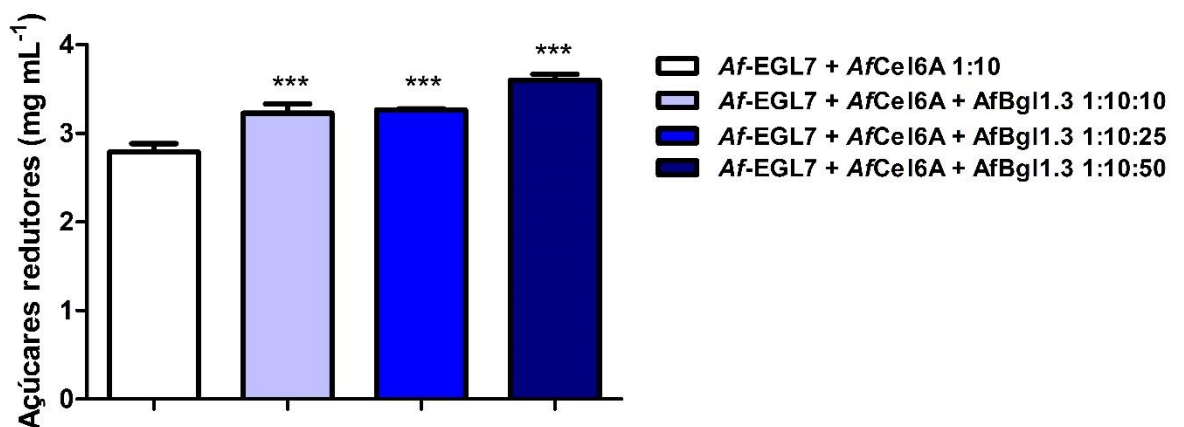
Pode-se observar, que a adição da AfBgl1.3 recombinante junto ao coquetel enzimático, tanto no tempo de 6 e 12 horas, aumentou a sacarificação de CM-celulose. Após 12 horas de incubação, na concentração de 0,1 FPU/g de coquetel, suplementado com 2,5 μg da β -glicosidase, observou-se que a concentração de açúcares solúveis foi de cerca de 0,90 g L^{-1} . Quando se usou 0,9 FPU/g de coquetel suplementado com 2,5 μg da AfBgl1.3, a taxa de conversão do CMC em açúcares redutores, aumentou cerca de 26%, quando comparado ao coquetel atuando sozinho.

Demonstrando o potencial da AfBgl1.3 como candidata na indústria biotecnológica, atuando na suplementação de coquetéis enzimáticos comerciais.

4.9.2 Efeito da associação da AfBgl1.3 junto as celulasas *Af-EGL7* e *AfCel6A* do *A. fumigatus* expressas em *P. pastoris*.

Inicialmente, avaliou-se a melhor proporção das celulasas de *A. fumigatus*, caracterizadas pelo nosso grupo de pesquisa, sobre a degradação de celulose. Para isso, foram testadas as seguintes proporções das enzimas *Af-EGL7*, *AfCel6A* e *AfBgl1.3*: (1:10:1; 1:10:10; 1:10:25 ou 1:10:50). A proporção da endoglucanase *Af-EGL7* e da celobiohidrolase *AfCel6A* foi fixada em 1:10 pois foi verificado que nessa proporção ocorre a maior liberação de açúcares redutores em meio reacional constituído de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,0, contendo 1% (p/v) de CM-Celulose, após 24 hora de reação sob agitação de 1000 rpm a 50 °C (BERNARDI et al., 2021).

Figura 23 - Otimização da proporção entre as celulasas do *A. fumigatus* AfBgl1.3, *Af-EGL7* e *AfCel6A*, expressas em *P. pastoris*, durante a hidrólise de celulose. Os valores foram dados pela média \pm desvio padrão de 4 replicatas experimentais. Diferenças significativas entre as associações das três enzimas em diferentes proporções com relação ao controle (*Af-EGL7* + *AfCel6A* 1:10) foram analisadas usando o teste t (significância, $p < 0,05$)



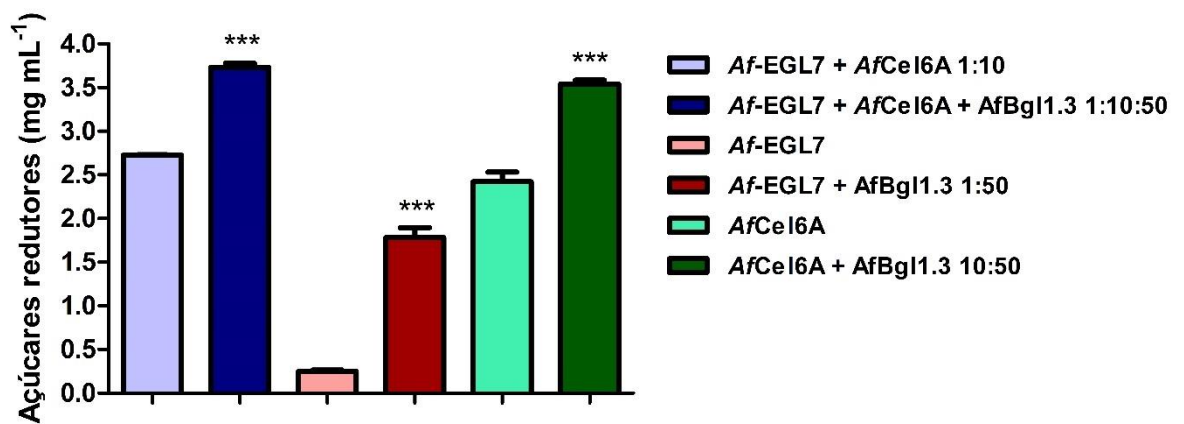
Fonte: autoria própria.

Conforme a figura 23, a proporção 1:10:50 de *Af-EGL7*, *AfCel6A* e *AfBgl1.3* foi a que proporcionou a maior liberação de açúcares redutores ($3,60 \pm 0,07$ mg mL⁻¹), concentração

28,6% maior quando comparado a concentração liberada pelo controle (*Af*-EGL7 + *Af*Cel6A 1:10), de $2,80 \pm 0,10 \text{ mg mL}^{-1}$.

Quando associadas separadamente, a combinação entre a *Af*Bgl1.3 e a endoglucanase *Af*-EGL7 na proporção 50:1, ocasionou um aumento na liberação de açúcares redutores de 616% quando comparado a *Af*-EGL7 sozinha. Observa-se também um aumento na liberação de açúcares redutores entre a associação da *Af*Bgl1.3 e a celobiohidrolase *Af*Cel6A na proporção 50:10 de cerca de 46%, mostrando que a *Af*Bgl1.3 apresenta sinergia em todas as associações avaliadas (Figura 24).

Figura 24 - Avaliação do sinergismo entre a *Af*Bgl1.3, *Af*-EGL7 e *Af*Cel6A durante a hidrólise de celulose. Os valores foram dados pela média \pm desvio padrão de 4 replicatas experimentais. Diferenças significativas entre as associações das enzimas em diferentes proporções com relação aos controles foram analisadas usando o teste t (significância, $p < 0,05$)



Fonte: autoria própria.

5 Conclusões

5 Conclusões

Uma β -glicosidase GH1 de *A. fumigatus* foi estudada com relação ao seu potencial em aplicações biotecnológicas. Para isso, após a clonagem do gene Afu1g14710 no vetor de expressão pPICZ α A e transformação em *P. pastoris* X-33, a AfBgl1.3 foi expressa e purificada com sucesso. A partir da enzima pura, prosseguiu-se com as caracterizações estruturais e bioquímicas.

A partir do espectro obtido por dicroísmo circular a 25 °C, observou-se que a AfBgl1.3 apresentou proporções de estruturas secundárias próximas as obtidas por modelagem, indicando que a enzima, nas condições estudadas, apresentava-se em sua conformação correta. A partir das análises por DC e emissão intrínseca do triptofano, obteve-se valores próximos de T_m (48,5 e 49,3 °C, respectivamente).

Na caracterização de suas propriedades bioquímicas e cinéticas, a AfBgl1.3 apresentou atividade máxima em pH 6,0 a 40 °C, condições empregadas tanto no processo de sacarificação e fermentação separadas ou no bioprocessamento consolidado. Além disso, a enzima apresentou elevada termoestabilidade a 30 °C, retendo cerca de 50% de sua atividade após 24 horas. A enzima recombinante também foi estável à presença de diferentes íons e reagentes testados, incluindo Tween 20 e Triton X-100, surfactantes não iônicos comumente empregados na etapa de sacarificação enzimática nas indústrias. Ainda, a AfBgl1.3 foi estimulada e tolerante em altas concentrações de glicose, tendo sua atividade estimulada em 1,4X na presença de 45 g L⁻¹ e retendo 90% de sua atividade na presença de 180 g L⁻¹ de glicose. A AfBgl1.3 também exibiu um elevado grau de sinergismo com o coquetel Celluclast[®] 1.5L e com as celulases de *A. fumigatus* já caracterizadas por nosso grupo de pesquisa durante a degradação de CMC, o que resultou em maior liberações de açúcares redutores em comparação ao controle.

A estabilidade a diferentes aditivos e condições industriais e capacidade de atuar em sinergia com outras celulases são algumas das principais características que uma enzima deve ter para ser empregada em diferentes processos biotecnológicos. Portanto, os resultados descritos no projeto, destacam a AfBgl1.3 como uma enzima robusta para aplicações industriais, podendo ser utilizada para suplementação de coquetéis comerciais, como também, na constituição de novos coquetéis enzimáticos, o que pode contribuir para o mercado de etanol de segunda geração.

Referências

Referências

ADLAKHA, N. et al. Specific fusion of β -1,4-endoglucanase and β -1,4-glucosidase enhances cellulolytic activity and helps in channeling of intermediates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 20, p. 7447–7454, 2012.

ALMEIDA, P. Z. de et al. Heterologous production and biochemical characterization of a new highly glucose tolerant GH1 β -glucosidase from *Anoxybacillus thermarum*. **Process Biochemistry**, v. 99, p. 1–8, 2020.

AMIN, F. R. et al. Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. **AMB Express**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.

APRODU, I. et al. Thermal stability of the complex formed between carotenoids from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) and bovine β -lactoglobulin. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 173, p. 562–571, 2017.

AYODELE, B. V.; ALSAFFAR, M. A.; MUSTAPA, S. I. An overview of integration opportunities for sustainable bioethanol production from first- and second-generation sugar-based feedstocks. **Journal of Cleaner Production**, v. 245, p. 118857, 2020.

BADIEI, M. et al. Comparison of Chemical Pretreatment Methods for Cellulosic Biomass. **APCBEE Procedia**, v. 9, p. 170–174, 2014.

BAIYA, S. et al. Structural analysis of rice Os4BGlu18 monoglucosyl β -glucosidase. **PLoS ONE**, v. 16, n. 1, p. 1–17, 2021.

BASHIROVA, A. et al. Disulfide bond engineering of an endoglucanase from *Penicillium verruculosum* to improve its thermostability. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 7, p. 1602, 2019.

BENNETT, J. W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 66, n. 2–3, p. 101–107, 1998.

BERNARDI, A. V. et al. A thermostable *Aspergillus fumigatus* GH7 endoglucanase over-expressed in *Pichia pastoris* stimulates lignocellulosic biomass hydrolysis. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 9, p. 2261, 2019.

BERNARDI, A. V. et al. LPMO AfAA9_B and Cellobiohydrolase AfCel6A from *A. fumigatus* Boost Enzymatic Saccharification Activity of Cellulase Cocktail. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1, p. 276, 2020.

BERNARDI, A. V. et al. A thermophilic, pH-tolerant, and highly active GH10 xylanase from *Aspergillus fumigatus* boosted pre-treated sugarcane bagasse saccharification by cellulases. **Industrial Crops and Products**, v. 170, n. May, p. 113697, 2021.

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

BHATTARAI, K. et al. Biofuel: An alternative to fossil fuel for alleviating world energy and economic crises. **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 46, n. 12, p. 1424–1442, 2011.

BOHLIN, C. et al. A comparative study of hydrolysis and transglycosylation activities of fungal β -glucosidases. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 1, p. 159-169, 2013.

BONFÁ, E. C. et al. Biochemical characterization of an isolated 50 kDa beta-glucosidase from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* M.7.7. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 13, p. 311–318, 2018.

BRANCO, R. H. R.; SERAFIM, L. S.; XAVIER, A. M. R. B. Second generation bioethanol production: On the use of pulp and paper industry wastes as feedstock. **Fermentation**. v. 5, n. 1, p. 4, 2019.

BYRNE, Bernadette. *Pichia pastoris* as an expression host for membrane protein structural biology. **Current opinion in structural biology**, v. 32, p. 9-17, 2015.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, James M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS microbiology reviews**, v. 24, n. 1, p. 45-66, 2000.

CHANDEL, A. K. et al. Comparative analysis of key technologies for cellulosic ethanol production from Brazilian sugarcane bagasse at a commercial scale. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 13, n. 4, p. 994–1014, 2019.

CHEN, A. et al. Structural and Catalytic Characterization of TsBGL, a β -Glucosidase From *Thermofilum* sp. ex4484_79. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 1 out. 2021.

CHEN, P. et al. Expression of a secretory β -glucosidase from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris* and its characterization. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 12, p. 2475–2479, 2011.

CHENG, J.; YU, Y.; ZHU, M. Enhanced biodegradation of sugarcane bagasse by *Clostridium thermocellum* with surfactant addition. **Green Chemistry**, v. 16, n. 5, p. 2689–2695, 2014.

DE GIUSEPPE, P. O. et al. Structural basis for glucose tolerance in GH1 β -glucosidases. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 70, n. 6, p. 1631–1639, 2014.

DE GOUVÊA, P. F. et al. Transcriptome and secretome analysis of *Aspergillus fumigatus* in the presence of sugarcane bagasse. **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, p. 232, 2018.

DE GOUVÊA, P. F. et al. Lytic Polysaccharide Monooxygenase from *Aspergillus fumigatus* can Improve Enzymatic Cocktail Activity During Sugarcane Bagasse Hydrolysis. **Protein & Peptide Letters**, v. 26, n. 5, p. 377–385, 2019.

DE SOUZA, W. R. et al. Transcriptome analysis of *Aspergillus niger* grown on sugarcane bagasse. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 40, 2011.

DODDA, S. R. et al. Structural and functional insights of β -glucosidases identified from the genome of *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Molecular Structure**, v. 1156, p. 105–114, 2018.

DOS SANTOS, L. V. et al. Second-Generation Ethanol: The Need is Becoming a Reality. **Industrial Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 40–57, 2016.

EFTINK, M. R. Use of fluorescence spectroscopy as thermodynamics tool. **Methods in enzymology**, v. 323, p. 459-473, 2000.

FANG, Z. et al. Cloning and characterization of a β -glucosidase from marine microbial metagenome with excellent glucose tolerance. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 9, p. 1351–1358, 2010.

FLORINDO, R. N. et al. Structural insights into β -glucosidase transglycosylation based on biochemical, structural and computational analysis of two GH1 enzymes from *Trichoderma harzianum*. **New Biotechnology**, v. 40, p. 218–227, 2018.

FONTANA, J. D. et al. α -4-O-methyl-D-glucuronidase component of xylanolytic complexes. In: **Methods in Enzymology**. Academic Press, p. 560-571, 1998.

FUSCO, F. A. et al. Biochemical characterization of a novel thermostable β -glucosidase from *Dictyoglomus turgidum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 783–791, 2018.

GAMA, R.; VAN DYK, J. S.; PLETSCHE, B. I. Optimisation of enzymatic hydrolysis of apple pomace for production of biofuel and biorefinery chemicals using commercial enzymes. **3 Biotech**, v. 5, n. 6, p. 1075–1087, 2015.

GHISAIDOOBE, A. B. T.; CHUNG, S. J. Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: A focus on Förster resonance energy transfer techniques. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 12, p. 22518-22538, 2014.

GODSE, R. et al. Unconventional β -Glucosidases: A Promising Biocatalyst for Industrial Biotechnology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 1-24, 2021.

GOMES, D.; GAMA, M.; DOMINGUES, L. Determinants on an efficient cellulase recycling process for the production of bioethanol from recycled paper sludge under high solid loadings. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2018.

GREENBERG, D. M. The Colorimetric Determination of the Serum Proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 82, n. 2, p. 545–550, 1929.

GUSAKOV, A. V. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 419–425, 2011.

HAGHIGHI MOOD, S. et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77–93, 2013.

HASUNUMA, T.; KONDO, A. Consolidated bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol with thermotolerant yeast strains. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 9, p. 1287–1294, 2012.

HEINZE, T. Cellulose: structure and properties. **Cellulose chemistry and properties: fibers, nanocelluloses and advanced materials**, p. 1-52, 2015.

HELLMANN, N.; SCHNEIDER, D. Hands On: Using Tryptophan Fluorescence Spectroscopy to Study Protein Structure. In: KISTER, A. E. (Ed.). *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York, 2019. p. 379–401.

HOU, H.; HE, H.; WANG, Y. Effects of SDS on the activity and conformation of protein tyrosine phosphatase from thermus thermophilus HB27. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 3195, 2020.

HUANG, C. et al. Production, immobilization and characterization of beta-glucosidase for application in cellulose degradation from a novel *Aspergillus versicolor*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 177, p. 437–446, 2021.

HWANGBO, M.; TRAN, J. L.; CHU, K.-H. Effective one-step saccharification of lignocellulosic biomass using magnetite-biocatalysts containing saccharifying enzymes. **Science of The Total Environment**, v. 647, p. 806–813, 2019.

IRELAND, S. M.; SULA, A.; WALLACE, B. A. Thermal melt circular dichroism spectroscopic studies for identifying stabilising amphipathic molecules for the voltage-gated sodium channel NavMs. **Biopolymers**, v. 109, n. 8, 2018.

JENG, W. Y. et al. Structural and functional analysis of three β -glucosidases from bacterium *Clostridium cellulovorans*, fungus *Trichoderma reesei* and termite *Neotermes koshunensis*. **Journal of Structural Biology**, v. 173, n. 1, p. 46–56, 2011.

JIANG, Z. et al. Characterization of a glucose-stimulated β -glucosidase from *Microbulbifer* sp. ALW1. **Microbiological Research**, v. 251, p. 126840, 2021.

JØRGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 1, n. 2, p. 119–134, 2007.

JUGWANTH, Y.; SEWSYNKER-SUKAI, Y.; GUEGUIM KANA, E. B. Valorization of sugarcane bagasse for bioethanol production through simultaneous saccharification and fermentation: Optimization and kinetic studies. **Fuel**, v. 262, p. 116552, 2020.

KABSCH, W.; SANDER, C. Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. **Biopolymers**, v. 22, n. 12, p. 2577–2637, 1983.

KAMARUDDIN, S. et al. Overexpression, purification and characterization of *Aspergillus niger* beta-glucosidase in *Pichia pastoris*. **Malaysian Applied Biology Journal**, v. 44, n. 1, p. 7-11, 2015.

KARBALAEI, M.; REZAEI, S. A.; FARSIANI, H. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. **Journal of cellular physiology**, v. 235, n. 9, p. 5867-5881, 2020.

KARP, S. G. et al. Bioeconomy and biofuels: the case of sugarcane ethanol in Brazil. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 15, n. 3, p. 899–912, 2021.

KELLEY, L. A. et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**, v. 10, n. 6, p. 845–858, 2016.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1751, n. 2, p. 119–139, 2005.

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

KOOLOTH VALAPPIL, P. et al. Characterization of a glucose tolerant β -glucosidase from *Aspergillus unguis* with high potential as a blend-in for biomass hydrolyzing enzyme cocktails. **Biotechnology Letters**, v. 41, n. 10, p. 1201–1211, 2019.

KUMAR, P. et al. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel Production. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 8, p. 3713–3729, 2009.

LABOUREL, A. et al. A fungal family of lytic polysaccharide monoxygenase-like copper proteins. **Nature Chemical Biology**, v. 16, n. 3, p. 345–350, 2020.

LADOKHIN, A. S. Fluorescence Spectroscopy in Peptide and Protein Analysis. In: **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2000. p. 1–18.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LAURO, B. Di; ROSSI, M.; MORACCI, M. Characterization of a β -glycosidase from the thermoacidophilic bacterium *Alicyclobacillus acidocaldarius*. **Extremophiles**, v. 10, n. 4, p. 301–310, 2006.

LELIEVELD, J. et al. Effects of fossil fuel and total anthropogenic emission removal on public health and climate. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 15, p. 7192–7197, 2019.

LI, T. et al. Developing fibrillated cellulose as a sustainable technological material. **Nature**, v. 590, n. 7844, p. 47–56, 2021.

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

LIMA, R. A. T. et al. Functional and structural characterization of a novel GH3 β -glucosidase from the gut metagenome of the Brazilian Cerrado termite *Syntermes wheeleri*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 165, p. 822–834, 2020.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. **Journal of the American chemical society**, v. 56, n. 3, p. 658-666, 1934.

LIU, D. et al. Characterization of a thermostable β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X33. **Microbial cell factories**, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2012.

LO LEGGIO, L. et al. Structure and boosting activity of a starch-degrading lytic polysaccharide monooxygenase. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2015.

LORENCI WOICIECHOWSKI, A. et al. Lignocellulosic biomass: Acid and alkaline pretreatments and their effects on biomass recalcitrance – Conventional processing and recent advances. **Bioresource Technology**, v. 304, p. 122848, 2020.

LU, J. et al. Expression and characterization of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from a soil metagenome. **Acta Biochim Biophys Sin**, v. 45, n. 8, p. 664-673, 2013.

MACAULEY-PATRICK, Sue et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, n. 4, p. 249-270, 2005.

MARTIN, S. R.; SCHILSTRA, M. J. Circular Dichroism and Its Application to the Study of Biomolecules. **Methods in Cell Biology**, v. 84, n. 07, p. 263–293, 2008.

MELEIRO, L. P. et al. A *Neurospora crassa* β -glucosidase with potential for lignocellulose hydrolysis shows strong glucose tolerance and stimulation by glucose and xylose. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p. 131-140, 2015.

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

MÉNDEZ-LÍTER, J. A. et al. A glucotolerant β -glucosidase from the fungus *Talaromyces amestolkiae* and its conversion into a glycosynthase for glycosylation of phenolic compounds. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 1-13, 2020.

MICSONAI, A. et al. BeStSel: A web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W315–W322, 2018.

MICSONAI, A.; BULYÁKI, É.; KARDOS, J. BeStSel: From Secondary Structure Analysis to Protein Fold Prediction by Circular Dichroism Spectroscopy. In: **Structural Genomics**. Humana, New York, NY, 2021. p. 175-189.

MILLES, L. F. et al. Calcium stabilizes the strongest protein fold. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2018.

MIRHENDI, H et al. Colony-PCR Is a Rapid and Sensitive Method for DNA Amplification in Yeasts. **Iranian Journal of Public Health**, v. 36, n. 1, p. 40-44, 2007

MOHD AZHAR, S. H. et al. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 10, p. 52–61, 2017.

MORANT, A. V. et al. β -Glucosidases as detonators of plant chemical defense. **Phytochemistry**, v. 69, n. 9, p. 1795–1813, 2008.

MOSIER, N. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673–686, 2005.

NAGARAJAN, D.; LEE, D.-J.; CHANG, J.-S. Recent insights into consolidated bioprocessing for lignocellulosic biohydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 44, n. 28, p. 14362–14379, 2019.

NAM, K. H.; SUNG, M. W.; HWANG, K. Y. Structural insights into the substrate recognition properties of β -glucosidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 391, n. 1, p. 1131–1135, 2010.

OSTERMEIER, L.; OLIVA, R.; WINTER, R. The multifaceted effects of DMSO and high hydrostatic pressure on the kinetic constants of hydrolysis reactions catalyzed by α -chymotrypsin. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 22, n. 28, p. 16325–16333, 2020.

PEREIRA, S. C. et al. 2G ethanol from the whole sugarcane lignocellulosic biomass. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2015.

PÉREZ, J. et al. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 53–63, 2002.

PRATTO, B. et al. Experimental optimization and techno-economic analysis of bioethanol production by simultaneous saccharification and fermentation process using sugarcane straw. **Bioresource Technology**, v. 297, p. 122494, 2020.

QUAN, J.; TIAN, J. Circular polymerase extension cloning for high-throughput cloning of complex and combinatorial DNA libraries. **Nature Protocols**, v. 6, n. 2, p. 242–251, 2011.

RABERT, C. et al. Recombinants proteins for industrial uses: utilization of *Pichia pastoris* expression system. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 351–356, 2013.

RAJASREE, K. P. et al. Highly glucose tolerant β -glucosidase from *Aspergillus unguis*: NII 08123 for enhanced hydrolysis of biomass. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 9, p. 967–975, 2013.

RANI, V. et al. Beta-Glucosidase: Key Enzyme in Determining Efficiency of Cellulase and Biomass Hydrolysis. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 5, n. 197, p. 2, 2014.

RASTOGI, M.; SHRIVASTAVA, S. Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 80, p. 330–340, 2017.

RHODES, J. C. *Aspergillus fumigatus*: Growth and virulence. **Medical Mycology**, v. 44, n. SUPPL. 1, p. 77–81, set. 2006.

RIOU, C. et al. Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 3607–3614, 1998.

ROBAK, K.; BALCEREK, M. Review of second generation bioethanol production from residual biomass. **Food technology and biotechnology**, v. 56, n. 2, p. 174, 2018.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 279–291, 2003.

SALEH ZADA, N. et al. Cloning, expression, biochemical characterization, and molecular docking studies of a novel glucose tolerant β -glucosidase from *Saccharomonospora* sp. NB11. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 148, p. 109799, 2021.

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

SÁNCHEZ, Ó. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5270–5295, 2008.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977

SANTOS, C. A. et al. Crystal structure and biochemical characterization of the recombinant ThBgl, a GH1 B-glucosidase overexpressed in *Trichoderma harzianum* under biomass degradation conditions. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2016.

SAVITZKY, A.; GOLAY, M. J. E. Smoothing and Differentiation. **Anal. Chem**, v. 36, n. 8, p. 1627–1639, 1964.

SEO, D. J.; FUJITA, H.; SAKODA, A. Effects of a non-ionic surfactant, Tween 20, on adsorption/desorption of saccharification enzymes onto/from lignocelluloses and saccharification rate. **Adsorption**, v. 17, n. 5, p. 813–822, 2011.

SHAH, M. A.; MISHRA, S.; CHAUDHURI, T. K. Structural stability and unfolding transition of β -glucosidases: A comparative investigation on isozymes from a thermo-tolerant yeast. **European Biophysics Journal**, v. 40, n. 7, p. 877–889, 2011.

SHAH, V. et al. Influence of dimethyl sulfoxide on extracellular enzyme production by *Pleurotus ostreatus*. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 9, p. 651–655, 2006.

SHIM, S. et al. Rice β -glucosidase Os12BGlu38 is required for synthesis of intine cell wall and pollen fertility. **Journal of Experimental Botany**, v. 73, n. 3, p. 784-800, 2022.

SHINDELL, D.; SMITH, C. J. Climate and air-quality benefits of a realistic phase-out of fossil fuels. **Nature**, v. 573, n. 7774, p. 408–411, 2019.

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

SINGHANIA, Reeta Rani et al. Genetic modification: a tool for enhancing beta-glucosidase production for biofuel application. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1352-1361, 2017.

SINGHANIA, R. R. et al. Challenges in cellulase bioprocess for biofuel applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 151, p. 111622, 2021.

SOBRI, M. F. M. et al. In-silico characterization of glycosyl hydrolase family 1 β -glucosidase from *Trichoderma asperellum* UPM1. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 11, 2020.

SRIVASTAVA, N. et al. Microbial beta glucosidase enzymes: Recent advances in biomass conversation for biofuels application. **Biomolecules**, v. 9, n. 6, p. 1–23, 2019.

STERNBERG, D.; MANDELS, G. Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose. **Journal of bacteriology**, v. 139, n. 3, p. 761-769, 1979.

SUN, J. et al. A Novel Glucose-Tolerant GH1 β -Glucosidase and Improvement of Its Glucose Tolerance Using Site-Directed Mutation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 192, n. 3, p. 999–1015, 2020.

TANG, Z. et al. Cloning and expression of *A. oryzae* β -glucosidase in *Pichia pastoris*. **Molecular biology reports**, v. 41, n. 11, p. 7567-7573, 2014.

UCHIYAMA, T.; MIYAZAKI, K.; YAOI, K. Characterization of a novel β -Glucosidase from a compost microbial metagenome with strong transglycosylation activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 25, p. 18325–18334, 2013.

VAN DE VEERDONK, F. L. et al. *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 11, p. 661–674, 2017.

WEIDNER, M.; TAUPP, M.; HALLAM, S. J. Expression of recombinant proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 36, p. e1862, 2010.

WILD, R. et al. Structure of the yeast oligosaccharyltransferase complex gives insight into eukaryotic N-glycosylation. **Science**, v. 359, n. 6375, p. 545–550, 2018.

XIA, W. et al. Engineering a highly active thermophilic β -glucosidase to enhance its pH stability and saccharification performance. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 147, 2016.

XIA, Y.; YANG, L.; XIA, L. High-level production of a fungal β -glucosidase with application potentials in the cost-effective production of *Trichoderma reesei* cellulase. **Process biochemistry**, v. 70, p. 55-60, 2018.

XU, J. et al. β -glucosidase from *Hevea brasiliensis* seeds: Purification, homology modeling, and insights into the substrate-binding model. **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, n. 6, p. 1–9, 2020.

YANG, S. et al. Biochemical properties of a novel glycoside hydrolase family 1 β -glucosidase (PtBglu1) from *Paecilomyces thermophila* expressed in *Pichia pastoris*. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 1, p. 784–791, 2013.

YANG, Y. et al. A mechanism of glucose tolerance and stimulation of GH1 β -glucosidases. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2015.

YIN, Y. R. et al. Characterization of a Cu^{2+} , SDS, alcohol and glucose tolerant GH1 β -glucosidase from *Bacillus* sp. CGMCC 1.16541. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 113, n. 10, p. 1467–1477, 2020.

YIN, Y. R. et al. Expression and characterization of a cold-adapted, salt- and glucose-tolerant GH1 β -glucosidase obtained from *Thermobifida* halotolerans and its use in sugarcane bagasse hydrolysis. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 11, n. 4, p. 1245–1253, 2021.

ZABED, H. et al. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 71, p. 475-501, 2017.

ZHANG, Y. et al. Low-Cost Cellulase-Hemicellulase Mixture Secreted by *Trichoderma harzianum* EM0925 with Complete Saccharification Efficacy of Lignocellulose. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 2, p. 371, 2020.

ZOGLAMI, A.; PAËS, G. Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, p. 874, 2019.

