

Universidade Federal do Amazonas - UFAM
Centro de Apoio Multidisciplinar – CAM
Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica
PIB-B-0006-PIBIC

**Purificação e caracterização de β -glucosidase
excretado pelo fungo *Aspergillus ustus* isolado da
Amazônia**

Bolsista: Rebeca Polyana dos Santos Bastos

MANAUS 2009

Universidade Federal do Amazonas - UFAM
Centro de Apoio Multidisciplinar – CAM
Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica
PIB-B-0006-PIBIC

**Purificação e caracterização de β -glucosidase
excretado pelo fungo *Aspergillus ustus* isolado da
Amazônia**

Bolsista: Rebeca Polyana dos Santos Bastos
Orientadora: Leonor Alves da Silva
Financiamento: CNPq

Este projeto tem por finalidade purificar e
caracterizar o principal componente
excretado pelo fungo *Aspergillus ustus*
isolado da Amazônia, com a finalidade
de aprimorar as pesquisas já existentes.

MANAUS 2009

Resumo

A β -glucosidase desempenha um papel crucial na degradação enzimática da celulose, quebrando a celobiose até monômeros de glicose, desta forma eliminando seu efeito inibitório sobre essas enzimas. Assim ela pode ser considerada como um fator limitante da velocidade da reação enzimática de sacarificação completa da celulose, uma vez que impede o acúmulo do dissacarídeo. A β -glucosidase foi purificada através dos métodos de precipitação à 70% de sulfato de amônia sendo a fração precipitada ressuspensa em tampão Tris HCl 20mM pH 7,4 e posteriormente cromatografada com um trocador aniônico sendo acompanhado por eletroforese PAGE-SDS. A enzima apresentou melhor desempenho na faixa do pH igual à 6,0. Essa enzima apresentou-se ser termostática, pois se mostrou estável em todas as faixas de temperaturas 25-70°C, onde se destacou à 60°C, a referida enzima hidrolisa a celobiose liberando glicose, resultado este que foi detectado através da análise do perfil cromatográfico em cromatografia em camada delgada em sílica gel 60.

Índice

	Página
1. Introdução	04
2. Objetivo	05
2.1. Objetivo Geral.....	06
2.2. Objetivos específicos	06
3.Referencial Teórico.....	07
3.1.Enzimas.....	07
3.2.Celulose.....	07
3.3.Enzima Celulolítica.....	08
3.4.Origem das enzimas.....	08
4. Material e método.....	09
4.1. Repique	09
4.2. Inoculação	09
4.3. Dosagem da atividade β -glucosidase	09
4.4. Determinação de proteína	10
4.5. Purificação	10
4.5.1. Precipitação com sulfato de amônia	10
4.5.2. Precipitação com acetona	10
4.5.3.Cromatografia Syphadex Aniônica.....	10
4.5.4.Eletroforese em gel.....	10
4.5.5.Cromatografia em camada delgada.....	10
4.6.Caracterização físico-química da β -glucosidase purificada.....	11
4.6.1.pH ótimo de atividade da β -glucosidase purificada.....	11
4.6.2.Temperatura ótima de atividade da β -glucosidase purificada....	11
5. Resultados e discussões	11
5.1.Utilização de diferentes substratos como fonte de carbono pelo fungo <i>Aspergillus ustus</i> para produção de enzima.....	11
5.2.Etapas de purificação da enzima β -glucosidase.....	11
5.2.1. Precipitação com sulfato de amônia e acetona.....	12
5.2.2. Cromatografia Syphadex Aniônica.....	13
5.2.3. Eletroforese em gel.....	13
5.2.4. Cromatografia em camada delgada.....	13
5.3. Caracterização físico-química da β -glucosidase purificada.....	13
5.3.1. pH ótimo de atividade da β -glucosidase purificada	14
5.3.2. Temperatura ótima de atividade da β -glucosidase purificada....	14
6. Considerações finais	15
7. Referências	16
8.Cronograma de atividades.....	18

1. Introdução

Com o aquecimento Global houve um crescimento relacionado com as questões ambientais. E isso tem incentivado a população mundial a buscar novas tecnologias “limpas”, sofisticadas e baratas. Neste contexto, a tecnologia enzimática tem ganhado espaço, isoladas ou juntamente com células íntegras, pois as enzimas são usadas como biocatalizadores em processos industriais bem como na despoluição ambiental. (PHILIPPIDS & SMITH, 1995).

O Brasil desponta na produção agrícola como sendo um dos seleiros mundiais. Boa parte de nossa produção agrícola é exportada para a Europa, países árabes e algumas partes do continente asiático. Porém uma produção agrícola tão pujante traz alguns inconvenientes como a geração de resíduos agroindustriais como exemplo os produzidos em usinas de açúcar, álcool e etc. Gacesa & Huble (1991), apontam a produção de glicose a partir destes resíduos agrícolas como o melhor destino a ser dado a estes poluentes. Portanto enzimas celulolíticas são indispensáveis para a conversão de celulose em unidades de glicose, podendo ser fermentada gerando etanol, aumentando dessa forma a produção de álcool.

A celulose é o composto orgânico mais abundante da terra, sendo uma fonte energética renovável servindo de substrato para produção de combustível alternativo como o álcool (YOSHIDA *et al.*, 1989). A transformação de celulose em açúcares livres pode ser realizada através da ação de ácidos, bases, compostos oxidantes e enzimas produzidas por microorganismos (BARRICHELO & BRITO, 1985). Apesar de toda tecnologia já existente, a produção de glicose em escala industrial ainda não é economicamente viável, e dentre as soluções possíveis a conversão pela ação enzimática tem apresentado um maior potencial econômico e ambiental. Após o desenvolvimento desta tecnologia, a glicose poderá ser utilizada na produção de medicamentos, alimentos, bebidas e proteínas celulares ou transformada em bicomcombustível. A degradação microbiana da celulose é total e específica e tem estimulado o uso dos processos de fermentações celulolíticas pelo homem.

A sacarificação enzimática do material celulósico até glicose envolve a ação sinérgica de pelo menos três enzimas diferentes: endo- β -1-4-glucanase (EC 3.2.1.4), exocelobiohidrolase (EC 3.2.1.91) e β -glucosidase (β -D-glicosideglucohidrolase (EC 3.2.1.21). Endoglucanase e exocelobiohidrolase atuam sobre a celulose produzindo celobiose como o principal produto final, sendo que as atividades dessas enzimas são frequentemente inibidos pela glicose (WOODWARD, 1982; COUGHLAN, 1985).

A β -glucosidase desempenha um papel crucial na degradação enzimática da celulose, quebrando a celobiose até monômeros de glicose, desta forma eliminando seu efeito inibitório sobre essas enzimas (SHEWALE, 1982; WOOD, 1985). Assim, ela pode ser considerada como um fator limitante da velocidade de reação enzimática da sacarificação completa da celulose, uma vez que impede o acúmulo do dissacarídeo (SENGUPTA *et al.*, 1991).

A glicose, além de ser o principal produto obtido pela hidrólise da celulose, é também fonte de energia para o crescimento de muitos microrganismos, dentre os quais estão fungos, leveduras, protozoários e algas. Apesar do grande número de microrganismos celulolíticos conhecidos, poucos apresentam interesse industrial. Os mais pesquisados são os fungos do gênero *Aspergillus*, *Humicola*, *Phanerochaete*, *Schizophyllum*, *Sclerotium*, *Sporotrichum*, *Talaromyces* e principalmente o *Tricoderma*, considerando o melhor produtor de enzimas celulolíticas (COUGHLAN, 1985).

A β -glucosidase tem um grande potencial de aplicação no processamento de bebidas, como vinho e suco de laranja e em outros produtos alimentícios. Esta enzima é capaz de transformar antocianinas, pigmentos presentes em muitos vegetais em antocianidinas, assim tende a precipitar tornando-se um composto mais fácil de ser removido. A enzima, quando usada no processamento de sucos de laranja, promove a hidrólise das antocianinas e a remoção das agliconas insolúveis durante a filtração, prevenindo a descoloração dos sucos causada pelo aquecimento durante a pasteurização, devido à presença de antocianinas. Essa enzima também pode ser usada para conseguir a cor desejada em vinhos rose (MARTINO *et al.*, 1994).

Os papéis fisiológicos postulados para a β -glucosidase são extremamente diversos, desde catabolismo de glicosil ceramídeos no tecido humano até a hidrólise de arbutina em plantas, liberando hidroxifenol, que é tóxico e desse modo, defendendo as plantas contra a invasão de patógenos (LECLERC *et al.*, 1987).

Conhecendo as diferentes aplicações da referida enzima, como na degradação da celulose à glicose, para subsequente fermentação e produção de álcool; bem como do seu possível uso nas indústrias de suco de laranja e de vinho. Tem-se a necessidade de estudos de isolamento e caracterização bioquímicas da β -glucosidase, visualizando aplicações industriais.

2. Objetivo

2.1. Geral

Purificar e caracterizar o principal componente excretado pelo fungo *Aspergillus ustus* isolado da Amazônia.

2.2. Específicos

- Determinação de um protocolo para purificação do principal componente β -glucosidásico excretado pelo *Aspergillus ustus*;
- Determinar o pH e temperatura ótima do principal componente excretado pelo fungo *Aspergillus ustus*;
- Avaliar a influência de alguns íons sobre a enzima purificada;
- Determinar a estabilidade térmica e em diferentes pHs da enzima purificada.

3. Referencial Teórico

3.1. Enzimas

Enzimas são macromoléculas predominantemente protéicas imprescindíveis aos seres vivos, pois aceleram praticamente todas as reações químicas que mantêm e regulam os processos vitais. São classificadas de acordo com o tipo de reação catalisada em seis grandes grupos: oxirredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases.

As enzimas têm elevado poder catalítico, sendo muitas vezes superiores aos catalisadores inorgânicos, além de alta especificidade por seus substratos, sendo assim não geradores de produtos indesejáveis, e podem atuar sob condições suaves de temperatura, pH e pressão, resultando em significativa conservação de água, equipamentos e energia, para benefícios tanto da indústria, quanto do meio ambiente (KIRK *et al.*, 2002). Elas são facilmente degradadas e assimiladas pela cadeia alimentar, não contaminam lençóis freáticos, não são carcinogênicas, portanto, não poluem o ambiente (SAID & PIETRO, 2004).

A ação de enzima sob resíduos celulolíticos pode convertê-los à glicose, a qual pode ser utilizada em processos fermentativos para obtenção de álcoois, proteínas celulares, antibióticos e diversos produtos químicos industrialmente importantes. As fontes de celulasas microbianas mais importantes para a produção industrial constituem linhagens de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicilium* e *Trichoderma* (UHLIG, 1998; SAID & PIETRO, 2004).

3.2 Celulose

A celulose, o principal constituinte da parede celular das plantas e, portanto, o biopolímero mais abundante na Terra, é constituído por cadeias lineares de resíduos de glicose unidos por ligações do tipo β -1,4. Estima-se que aproximadamente 4×10^9 toneladas de celulose sejam sintetizadas anualmente, contudo, ela não se acumula devido aos fungos e bactérias que eficientemente degradam os materiais das paredes celulares das plantas (ARO *et al.*, 2005).

Béguin & Albert (1994), dizem que na composição estrutural da celulose os polímeros adjacentes interagem entre si por meio de pontes de hidrogênio que de uma forma mais ampla formam as fibras de celulose que irão agrupar-se em regiões cristalinas, mais organizadas e entremeadas de regiões amorfas, com menor grau de compactação (Figura 1).

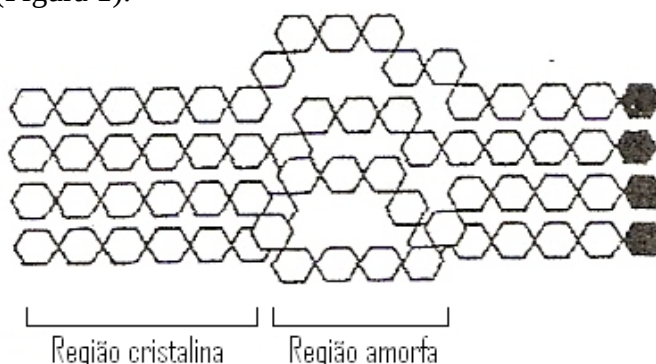


Figura 1 – Níveis de organização das regiões constituintes das fibras de celulose (BÉGUIN & AUBERT, 1994).

3.3. Enzima Celulolítica.

De acordo com o modo de ação, os componentes do sistema celulolítico são geralmente classificados como: endoglucanases (1,4- β -D-glucan-4-glucanohidrolases, EC 3.2.1.4); exoglucanases, incluindo celodextrinases (1,4- β -D-glucan glucanohidrolases, EC 3.2.1.74) e celobiohidrolases (1,4- β -D-glucan celobiohidrolases, EC 3.2.1.91); e β -glicosidases (β -D-glucosídeo glucohidrolases, EC 3.2.1.21). Endoglucanases clivam ao acaso ligações internas de regiões amorfas das cadeias de celulose, gerando oligossacarídeos de vários comprimentos, e por essa razão quantificada com substratos solúveis, como carboximetilcelulose. Exoglucanases atuam de modo processivo, hidrolisando ligações nas extremidades redutoras ou não redutoras, liberando glicose ou celobiose como principais produtos (Figura 2), sendo quantificadas com o uso de substratos cristalinos como avicel (TEUNISSEN & CAMP, 1993; LYND *et al.*, 2002).

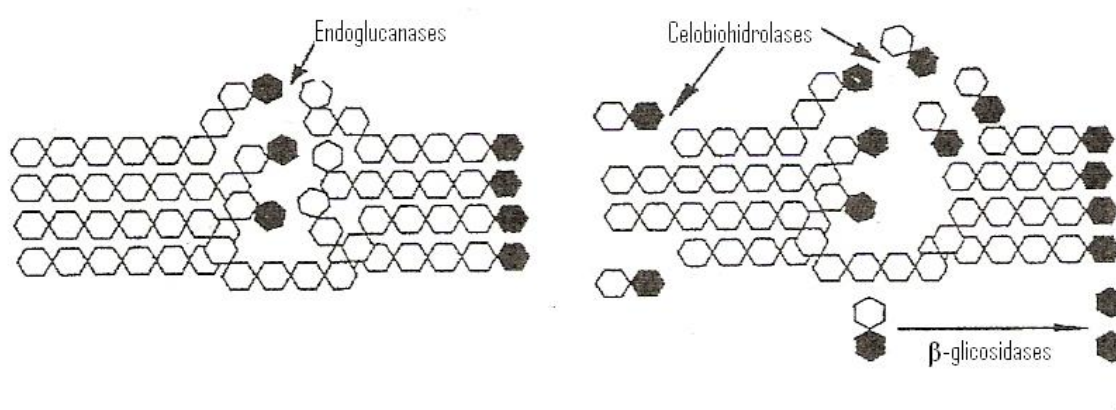


Figura 2 – Ação das enzimas celulolíticas (BÉGUIN & AUBERT 1994).

Dados da literatura demonstram um crescente interesse pelo estudo da produção de celulases por microrganismos, devido ao grande potencial industrial.

3.4. Origem das Enzimas

A grande maioria das enzimas aplicadas industrialmente (aproximadamente 90 %) são de origem microbiana (GODFREY & WEST, 1996, FELIX *et al.*, 2004).

Os microrganismos representam excelente fonte de enzimas devido à diversidade bioquímica, crescimento rápido, com requerimento limitado de espaço, o que diminui o custo de produção em relação às enzimas de origem animal ou vegetal; bem como produção independente de variações sazonais e localização geográfica; utilização de substratos baratos, como resíduos agrícolas e agroindustriais; possibilidade de se aumentar o rendimento pela otimização das condições de cultivo; e pela facilidade de manipulação genética das linhagens, através de evolução dirigida, engenharia de proteínas ou tecnologia do DNA recombinante (GODFREY & WEST, 1996; KIRK *et al.*, 2002).

Muitos microrganismos, devido ao seu estilo de vida, são capazes de utilizar diversas substâncias como fonte de carbono e energia, através de diferentes enzimas extracelulares, em diferentes ambientes (PRADE, 1995; KAUR *et al.*, 2004). Portanto as enzimas microbianas ocupam um papel crucial na clivagem de nutrientes, realizando uma variedade de reações de fixação, oxidação, redução e hidrólise na conversão da matéria orgânica necessária para a manutenção de equilíbrio num ecossistema.

Devido ao modo de nutrição por absorção, os fungos devem inicialmente liberar enzimas digestivas no ambiente externo. Estas enzimas quebram moléculas grandes e relativamente insolúveis como os carboidratos, proteínas e lipídeos em moléculas pequenas e mais solúveis que podem ser absorvidas.

4. Material e métodos

4.1. Repique

O fungo *Aspergillus ustus* isolado da Amazônia (CARVALHO, 2006) foi repicado em meio sólido BDA e incubado por 7 dias a 30°C para formação de esporos.

4.2. Inoculação

Após 7 dias de crescimento do fungo *Aspergillus ustus*, preparou-se uma solução de esporos na concentração de 10^7 esporos/ml a qual posteriormente foi inoculada em 100 ml de meio líquido contendo: celobiose de bagaço de cana 0,75g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,56g ; $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,08g ; KH_2PO_4 0,40g ; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,06g ; peptona (soja) 0,18g ; levedura 0,05g ; $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mg/ml ; $\text{MnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3,2 mg/ml ; $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,8mg/ml ; $\text{CaClSO}_4\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 40,0 mg/ml. Incubou-se por 240 horas sob uma agitação de 150 rpm à 30°C. Posteriormente foram centrifugados e os sobrenadantes submetidos a dosagens enzimáticas e protéicas.

4.3. Determinação da atividade β -glicosidásica (GHOSE, 1987)

Para a determinação da atividade β -glicosidásica, incubou-se 50 μ L de extrato enzimático em 50 μ L de substrato, solução de celobiose 15 mM (5,13 g/L) dissolvida em tampão citrato de sódio pH 4,8 por 30 min. a 50 °C. Após o tempo reacional de 30 min., incubou-se os tubos imediatamente a 100 °C por 10 min, de forma a promover a inativação das enzimas. Em seguida, adicionou-se 1 mL de reativo enzimático para dosagem de glicose pelo método GOD-PAP (método enzimático colorimétrico sem desproteinização), conforme descrito por GHOSE, 1987 incubou-se novamente os tubos, desta vez a 37 °C por 15 min. Por fim, adicionou-se 1 mL de água destilada e registrou-se as absorbâncias das soluções a 505 nm, sendo cada análise realizada em triplicata.

O branco reacional compreendia 50 μ L de solução enzimática diluída em tampão citrato de sódio pH 4,8 mais 50 μ L de solução de celobiose, incubada por 10 min a 100 °C, com acréscimo posteriormente de 1 mL de reativo de glicose e posterior incubação por 15 min à 37 °C e acrescentará 1,0 mL de água destilada. Homogeneizou-se em vórtex e analisar em Abs 505 nm. Uma unidade enzimática corresponde à um micromol de açúcar redutor por mL por minuto. Sendo a glicose utilizada como padrão.

4.4. Determinação de proteína

A determinação de proteína foi realizada pelo método colorimétrico de LOWRY *et al.*,(1951), utilizando albumina de soro bovina como padrão.

4.5. Purificação

4.5.1. Precipitação com sulfato de amônia e acetona

Após o material previamente resfriado em banho de gelo, foram adicionados lentamente e com agitação contínua sulfato de amônia até 70% (m/v) de saturação e ou acetona. As misturas foram mantidas em temperaturas de banho de gelo por cerca de trinta minutos e posteriormente centrifugação por 45 min a 4.000 g a 4^oC, sendo obtidos duas frações uma designada sobrenadante e a outra precipitado, as quais posteriormente foram submetidas à dosagens enzimáticas e protéicas conforme descrito nos itens 4.3 e 4.4.

4.5.2. Cromatografia em Sepharose

O precipitado do sulfato de amônia obtida na etapa 4.5.1, foi ressuspensionado em 3,0 mL de tampão Tris HCl, 20mM pH 7,4 e posteriormente dialisado over-night no referido tampão e 1,5 mL desta solução foi cromatografado em uma coluna DEAE-Sepharose trocador aniônica com fluxo de 0,5 mL/min, sendo coletados frações de 1mL por tubo. A eluição das proteínas ligadas à resina foi realizada com gradiente salino linear no tampão tris HCl com NaCl 20 mM pH 7,4. O perfil de eluição de proteínas foi acompanhado a 280 nm em espectrofotômetro. A atividade β -glucosidase foi medida nas frações eluídas e aquelas contendo atividade enzimática foram reunidas e dialisadas.

4.6. Eletroforese em gel

A metodologia de eletroforese em sistema denaturante (LAEMMLI, 1970) foi utilizada para verificação do índice de pureza da enzima, usando gel 12%. A amostra foi preparada na proporção 1:1 em tampão de amostra (SDS 4%, glicerol 17%, azul de bromofenol 0,1% e Tris-HCl 0,12 M, pH 6,8) na presença de 10% β -mercaptoetanol e aquecida em água fervente por 5 min. As eletroforeses foram realizadas em tampão de corrida Tris-glicina, durante 4,0 h, sob corrente de 200V. Após a corrida, procedeu-se a coloração das proteínas com prata.

4.7. Cromatografia em camada delgada

Para verificação e confirmação da presença da β -glucosidase realizou-se uma cromatografia em camada delgada. Utilizou-se uma placa de sílica gel 60 e aplicando-se três amostras distintas, glicose, celobiose a 2% e hidrolisado enzimático de celobiose. Para preparar o respectivo hidrolisado procedeu-se da seguinte forma: em um tubo de ensaio foram adicionados 100 μ L de solução celobiose a 2% 100 μ L da enzima parcialmente purificada, submetidos por 2 horas em banho-maria à 50 °C. O eluente utilizado para a eluição da placa, foi composto por água: acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético nas proporções 4:9:1:3 mL e o revelador utilizado foi vapores de iodo (FONTANA *et. al.*, 1998).

4.8. Caracterização físico-química da β -glucosidase purificada

4.8.1. Determinação do pH ótimo de atividade da β -glucosidase parcialmente purificada

A verificação do efeito do pH sobre a atividade da enzima purificada foi realizada incubando-se 25 μ L da enzima em 75 μ L de celobiose 2% em tampão McIlvaine em diferentes valores de pH: 3,0 - 4,0 - 5,0 - 6,0 - 7,0 - 8,0. Os ensaios de atividade foram realizados conforme condições definidas no item 3.3.

4.8.2. Determinação da temperatura ótima de atividade da β -glucosidase parcialmente purificada

A verificação da temperatura ótima foi realizada incubando-se a mistura de reação, em temperaturas variando de 25 a 70°C em tampão fosfato de sódio 0,05 M e pH 6,0 por 30 min, conforme condição de ensaio enzimático definido no item 3.3.

5. Resultados e discussões

5.1. Utilização de diferentes substratos como fonte de carbono pelo fungo *Aspergillus ustus* para produção de enzima

O efeito de diferentes resíduos no crescimento e produção de β -glucosidase pelo fungo está relacionada na Tabela 1. O fungo cresceu com perfis e atividades enzimáticas variáveis.

<i>Substratos</i>	<i>Crescimento</i>	<i>Ativ. β-glucosidásica (U/mL)</i>
Celobiose	+++	2,0286
Bagaço de cana	+	0,0872

+++ Muito Bom; +Baixo

5.2. Etapas de purificação da enzima β -glucosidase

Todas as etapas de purificação foram realizadas à temperatura ambiente, com exceção da etapa de precipitação. O processo de purificação foi acompanhado de dosagem das atividades enzimáticas das frações após cada etapa, conforma descrito no item 3.3. A Figura 3 mostra o diagrama de purificação da β -glucosidase.

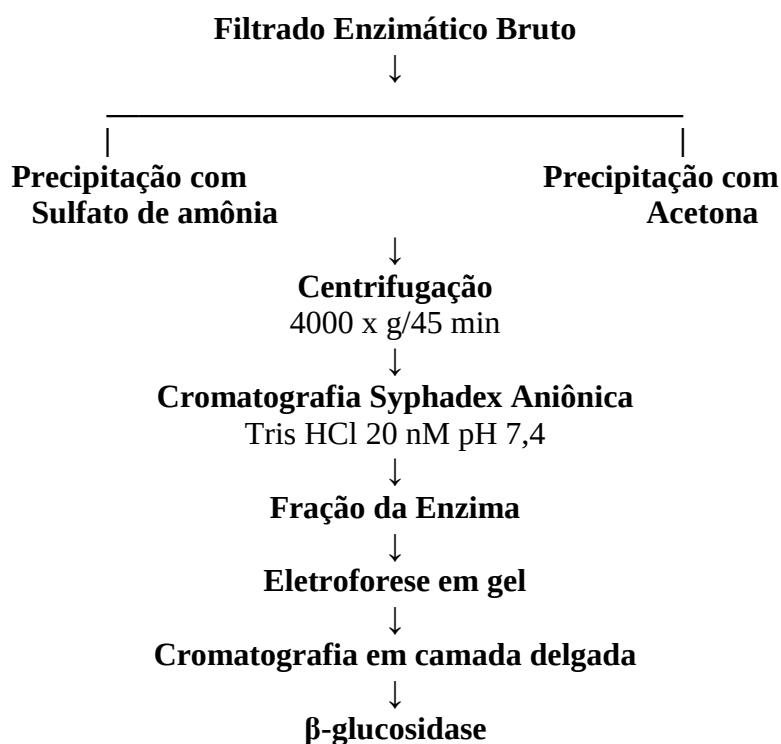


Figura 3: Diagrama de purificação da β -glucosidase do fungo *aspergillus ustus*.

5.2.1. Precipitação com sulfato de amônia e acetona

Um volume de 100 mL do extrato enzimático foi precipitado com 47,2 g de sulfato de amônia de acordo com o descrito no item 3.5.1. Como descrito no item 3.5.2 utilizou-se um volume de 20 mL do extrato enzimático para uma precipitação com 46,66 mL de acetona. Nesta etapa inicial da purificação ocorreu a concentração de proteínas, que é importante para uma boa purificação. A enzima deve ser precipitada, ocorrendo a sua separação do maior número possível de contaminantes, como proteínas, pigmentos, fragmentos celulares, ácidos nucléicos, entre outros. O efeito do tipo de precipitação no extrato enzimático bruto está relacionado na Tabela 2.

Tabela 2- Valores de atividade β -glucosidásica (U/mL), utilizando métodos diferentes de precipitação

Precipitação 70%	Desempenho	Ativ. β-glucosidásica (U/mL)
Sulfato de amônia (fração do precipitado)	+++	1,1897
Acetona (fração do precipitado)	+	0,2613

+++Muito bom; +Baixo

5.2.2. Cromatografia Sepharose Aniônica

O precipitado do sulfato de amônia obtido na etapa 3.5.3 foi cromatografado em uma coluna de troca iônica DEAE Sepharose. A coluna foi primeiro eluída com tampão tris HCl 20 mM pH 7,4, e depois com gradiente salino de tris HCl com NaCl 20 mM pH 7,4 monitoradas por absorbância à 280 Nm e dosadas suas atividades β -glucosidásicas. Como resultado da cromatografia as amostras recolhidas nos tubos 3 à 6, conforme podemos observar na Figura 4, detectamos atividades enzimáticas. Analisando a figura 4, podemos detectar que a enzima não possui afinidade pela resina, portanto não grudou na resina, sendo eluída nas frações anteriores ao gradiente salino.

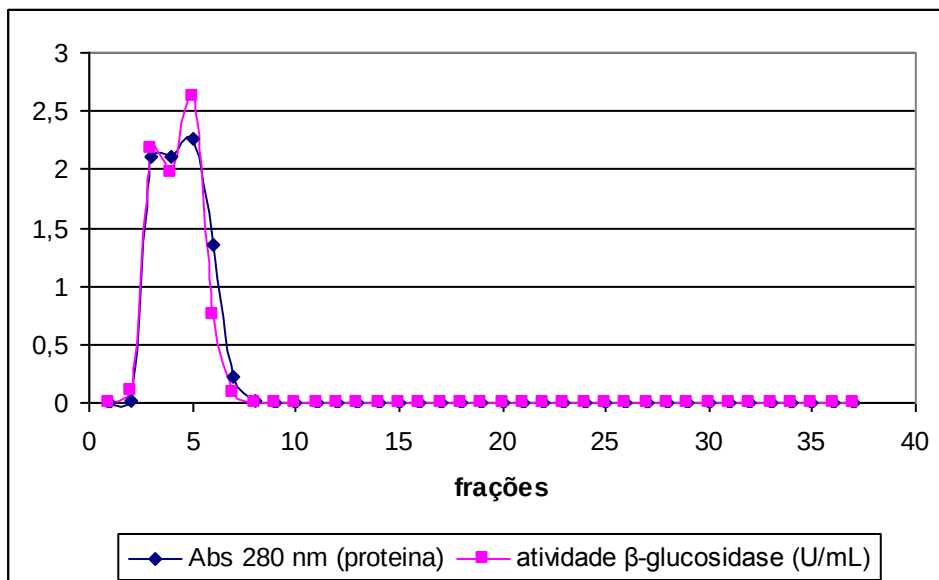


Figura 4- Perfil cromatográfico da coluna DEAE

5.2.3. Eletroforese em gel

Concluída a etapa de cromatografia aniônica, as amostras cuja as atividades obtiveram o melhor desempenho, foram agrupadas e aplicadas em um gel de eletroforese. Obteve-se traço de uma possível banda.

5.2.4. Cromatografia em camada delgada

Tendo em vista que pela eletroforese só conseguimos observar traços de proteína e dosando atividade na respectiva amostra, obtínhamos resultado positivo. Realizou-se um hidrolisado (item 3.5.5) para ser verificado seu produto de hidrólise em cromatografia de camada delgada (Figura 5). Sabendo-se que a β -glucosidase degrada celobiose liberando glicose, aplicou-se na placa de cromatografia em camada delgada um padrão de glicose, uma solução de celobiose mais tampão e uma solução de hidrolisado (celobiose mais enzimas), ambas soluções preparadas nas mesmas condições (item 3.5.5).

Conforme podemos observar na Figura 5, a enzima estava degradando a celobiose liberando glicose. Portanto apesar de conseguirmos observar esta enzima por eletroforese, através deste experimento foi possível verificar a presença da enzima.

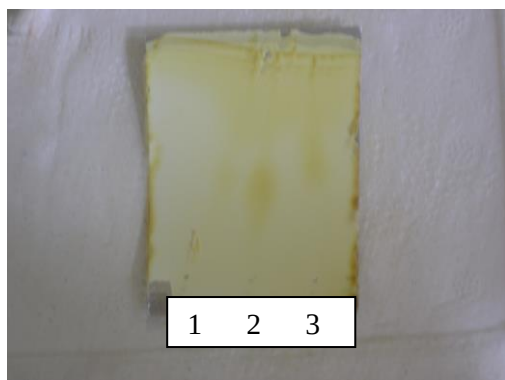


Figura 5-Cromatografia em camada delgada: 1- padrão glicose; 2- hidrolisado; 3- celobiose.

5.3. Caracterização físico-química da β -glucosidase purificada

5.3.1. pH ótimo de atividade da β -glucosidase purificada

Conforme descrito no subitem 3.6.1, a atividade enzimática foi medida incubando-se a enzima em tampões de pHs variando de 3,0 à 8,0. Os resultados são apresentados na Figura 6, o qual podemos observar que obtivemos melhores valores de atividades β -glucosidase no pH 6,0. O pH ótimo das β -glucosidases produzidas por vários microorganismos está na faixa de 3,0 a 7,0 (COUGHAN, 1985; WOODWARD *et al.*, 1982). O resultado dessa pesquisa está dentro deste valor.

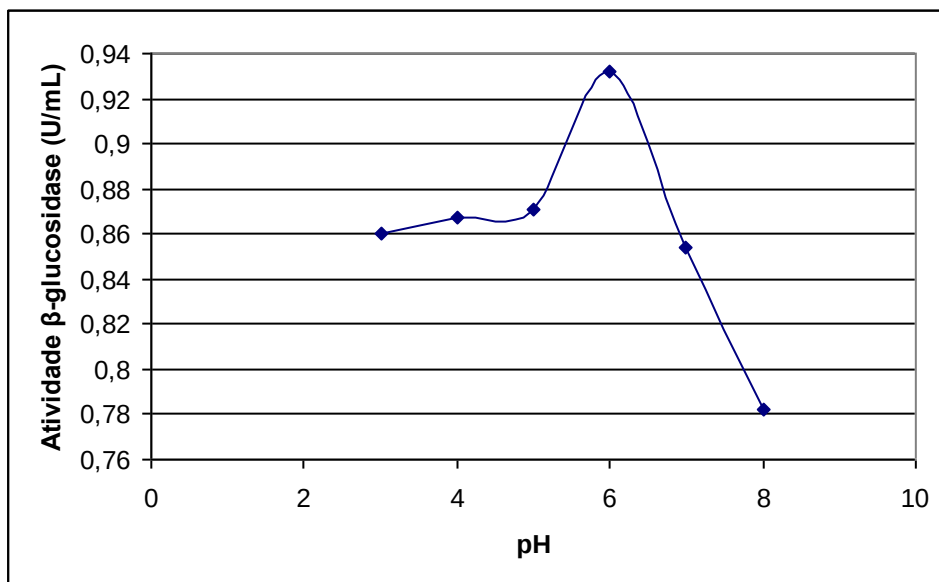


Figura 6: Perfil de pH ótimo de atuação β -glucosidase

5.3.2. Temperatura ótima de atividade da β -glucosidase purificada

A atividade enzimática foi medida incubando-se a enzima com o substrato em diferentes temperaturas por 30 min, conforme descrito no subitem 3.6.2. A Figura 7 ilustra os resultados obtidos para a enzima. As temperaturas ótimas de β -glucosidase de várias fontes microbianas variam de 40 à 105 °C (WOODWARD *et al.*, 1982; COUGHLAN, 1985). A enzima β -glucosidase purificada no referido trabalho demonstrou um caráter termodinamicamente estável, obtendo uma pequena melhora em 40° C.

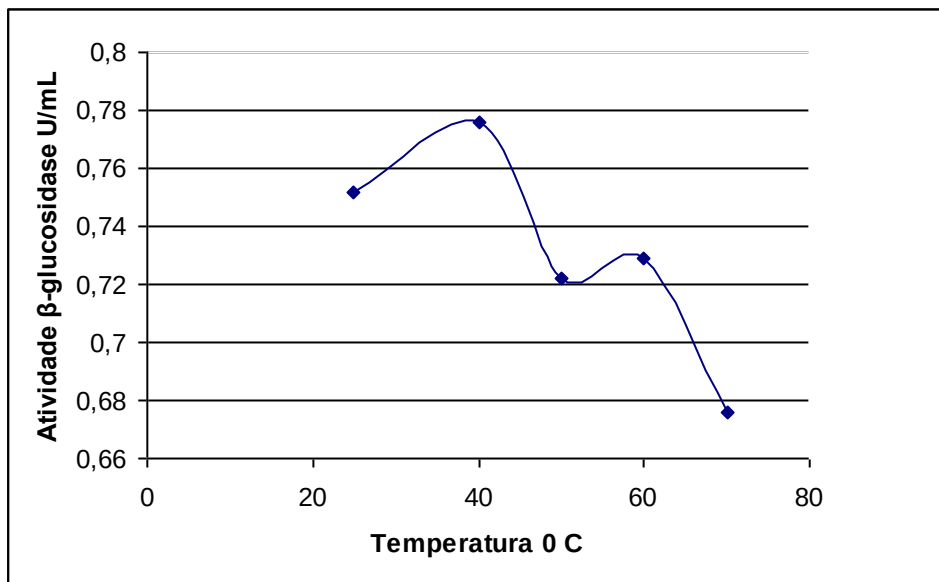


Figura 7: Temperatura ótima de atuação β-glucosidase

6. Considerações finais:

Nas condições em que os experimentos foram conduzidos foi possível detectar que:

- O fungo *Aspergillus ustus* fermentado em meio líquido sintético contendo celobiose como fonte de carbono excretou um complexo celulolítico, que através de técnicas de precipitação com 70% de sulfato de amônia e posterior cromatografia em coluna de troca iônica obtivemos como componente principal uma β-glucosidase.
- A enzima β-glucosidase parcialmente purificada apresentou pH e temperatura ótimas a 6,0 e 40 °C respectivamente.
- A β-glucosidase parcialmente purificada hidrolisou a celobiose, liberando como único produto a glicose.
- Devido ao microrganismo sofrer mutações durante o desenvolvimento do presente trabalho e parar de produzir a enzima de interesse, não foi possível obter mais extrato bruto do complexo β-glucosídico, para purificarmos mais enzima e avaliarmos a influência de alguns íons sobre a enzima purificada, bem como determinar a estabilidade térmica e em diferentes pHs da enzima purificada.

7. Referências

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, N. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiol. Rev.**, Amsterdam, v.29, p.719-739, 2005

BARRICHELO, L.E.G.; BRITO, J.O. **Química da madeira**. Piracicaba: Centro acadêmico “Luiz de Queiroz”, 1985. 126p.

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

COUGHLAN, M. The Properties of Fungal and Bacterial Cellulases with comment on their production and application. **Biotechnol. Gen. Engin. Rev.**, v.3, p.39-109, 1985.

FELIX, R.F.; NORONHA, E.F.; De MARCO, J.L. Proteases: características e aplicações industriais. In: SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis summa, 2004. p. 327-347.

GACESA, P.; HUBBLE, J. The enzymatic treatment of waste materials. In: MARTIN, A.M. (Ed.) *Bioconversion of waste materials to industrial products*. London: Elsevier **Applied Science**, 1991. cap.2, p. 39-61.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulose activities. **Pure & Applied Chemistry**. V.59, n.2. p.257-268. 1987.

GODFREY, T.; WEST, S. Introduction to industrial enzymology. In: GODFREY, T.; WEST, S. **Industrial Enzymology**. New York: Macmillan Publishers, inc., 2 ed., 1996, p. 1-8.

KAUR, G.; KUMAR, S.; SATYANARAYANA, T. Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis. **Bioresource Technology**, v.94, p.239-243, 2004.

KIRK, O.; BORCHERT, T.V.; FUGLSANG, C.C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p.345-351, 2002.

LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227 (5259): 680-685, 1970.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.H., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with phenol reagent. **J.Biol. Chem.**, Bethesda, v.193, p.265-75, 1951.

LYND, L.R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology reviews**, v.66, p.506-577, 2002.

MARTINO, A. PIFFERI, P.G., SPAGNA, G. Production of β -glucosidase by *Aspergillus niger* using carbon sources derived from agricultural wastes. **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, v.60, p. 247-252, 1994.

PHILLIPDIS, P.G.; SMITH, K.T. Limiting factors in the simultaneous saccharification and fermentation process for conversion of cellulosic biomass to fuel ethanol. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 51/52, p. 117-123, 1995.

- PRADE, R.A. Xylanases: from biology to biotechnology. **Biotechnol Genet. Eng. Rev.**, v.13, p.101-131, 1995.
- SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004, p.1-7.
- SEGPUNTA, S.; GHOSH, A.K.; Purification and characterization of a β -glucosidase enzymes from a mushroom *Termitomyces clypeatus*. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1076, p. 215-220, 1991.
- SHEWALE, J.G. β -glucosidase: its role in cellulose synthesis and hydrolysis of cellulose. **Int.J.Biochem.**, v.14, p.435-443, 1982.
- SZIJATO, N. et al. Dynamics of cellulose production by glucose grow cultures of *Trichoderma reesei* Rut-C30 as a response to addition of cellulose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. V.113-116. p. 115-124. 2004.
- TEUNISSEN, M.J.; CAMP, H.J.M.O. Anaerobic fungi and their cellulolytic and xylanolytic enzymes. **Antonie Leeuwenhoek**, v. 63, p.63-76, 1993.
- UHLIG, H. **Industrial enzymes and their applications**. New York: Johnm Wiely & Sons, Inc., p.89-95, 1998.
- WOODWARD, J.; ARNOLD, S.L. The inhibition of β -glucosidase activity in *Trichoderma ressei* C-30 cellulase by derivaties of glucose. **Biotechnol. Bioeng.**, v.23, n. 7, p. 1553-1562, 1985.
- WOODWARD, J. Fungal and other β -D-glucosidase – their properties and applications. **Enz. Microb. Technol.**, v.4, p. 73-79, 1982.
- WOOD, T.M. Properties of cellulolytic enzyme systems. **Biochem. Soc. Trans.** V.13, n.2, p.407-410, 1985.
- YOSHIDA N.; FUKUSHINA T.; SAITO H.; SHIMOSAKA M.; OKAZAKI M. Cellulose and xylan degrading enzymes of pathogenic fungus *Fusarium oxysporum* SUB 850. **Agric. Biol.Chem.**, v.53, p. 1829-1836, 1989.

8. Cronograma de atividades

Nº	Descrição	Ago 2008	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2009	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
	- Revisão bibliográfica	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		
	- Adaptação da metodologia	R	R										
	- Purificação do principal componente β -glicosidásico do complexo celulolítico			R	R	R							
	- Determinação do pH ótimo e temperatura ótima da enzima purificada						R						
	- Estabilidade térmica							NR					
	- Estabilidade em diferentes pHs							NR					
	- Verificação da sensibilidade a diferentes íons metálicos								NR				
	- Determinação de parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$									NR			
	- Análise dos dados, construção de gráficos e tabelas			R	R	R	R	R	R	R	R		
	- Elaboração do Resumo e Relatório Final (atividade obrigatória)											R	
	- Preparação da Apresentação Final para o Congresso (atividade obrigatória)												R