

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de Lorena
Departamento de Biotecnologia

Purificação parcial de
 β -glicosidasas do extrato comercial Novozym 188.

Relatório de Iniciação Científica

Aluna: Jéssica Dias Oliveira

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Adriane Maria Ferreira Milagres

Departamento de Biotecnologia – Escola de Engenharia de Lorena

Lorena - SP

1. RESUMO

A celulose é o principal componente da parede celular e a sua hidrólise completa produz glicose, um produto de elevado interesse devido suas aplicações biotecnológicas. No entanto, a lignina, presente na parede celular, é um limitante desta hidrólise e os pré-tratamentos utilizados não eliminam completamente sua ação, fazendo-se necessária a compreensão do mecanismo de inibição da lignina, a fim de aumentar a eficiência da hidrólise.

No processo de hidrólise da celulose o extrato comercial Novozym 188, obtido do cultivo de *Aspergillus* sido muito utilizado. O objetivo desse trabalho foi purificar β -glicosidases do extrato Novozym 188 através de cromatografias de troca iônica, utilizando a resina DEAE-CL6B, e de exclusão molecular, utilizando a resina Sephacryl S-100 High Resolution, em pH 5,0. A eficiência da cromatografia foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE). Com a purificação parcial desta enzima pôde-se detectar a presença de pelo menos três isoenzimas da β -glicosidase.

2. INTRODUÇÃO

A celulose é um polissacarídeo presente na parede celular das plantas e pode representar 50% da sua massa (PANDEY et al., 2000), o que a torna o principal componente da parede celular. De elevada massa molar, esta molécula é formada por resíduos de glicose unidos por ligação β -(1 \rightarrow 4) (FENGEL; WEGENER, 1989). A hidrólise completa da celulose resulta em glicose, o que tem despertado grande interesse por este biopolímero, já que a glicose tem muitas aplicações biotecnológicas, dentre elas a produção de etanol de segunda geração (LYND et al., 2002).

A hidrólise completa da celulose se dá pela ação sinérgica de um complexo enzimático, composto principalmente por três tipos de enzimas. As exoglucanases, também chamadas de celobiohidrolases (CBH), quebram as ligações β -(1 \rightarrow 4) nas extremidades da cadeia de celulose formando o dissacarídeo celobiose. As endoglucanases (EG) hidrolisam as mesmas ligações, no entanto, na parte interna desta cadeia e por fim as celobiases clivam o dissacarídeo celobiose, liberado pelas CBHs, formando glicose. (BRIENZO; ARANTES; MILAGRES, 2009; JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007)

Apesar do grande interesse pelo produto de hidrólise da celulose, esse processo é limitado pela lignina, outra macromolécula da parede celular (MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999; ZHU et al., 2008). A lignina é responsável por manter a rigidez da parede celular e por proteger contra ataques de microrganismos (JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007), o que dificulta o acesso das enzimas à celulose. Para contornar este problema, diversos pré-tratamentos tem sido usados para minimizar o efeito da lignina (ALVIRA et al., 2010). No entanto, mesmo após estes pré-tratamentos, a lignina não é completamente retirada do material e, por isso, ainda dificulta a hidrólise da celulose. Por este motivo a compreensão do mecanismo de inibição da lignina se faz necessária, para que se consiga atingir um nível de eficiência maior na hidrólise da celulose.

O extrato comercial Novozym 188 tem sido muito utilizado no processo de hidrólise da celulose, como fonte da enzima β -glicosidase. Essa suplementação é

importante, uma vez que o extrato celulolítico comercial de *Trichoderma reesei* ATCC26921 é deficiente em α -glicosidase. De acordo com Vinzant (2001), a principal β -glicosidase presente nesse extrato possui massa molar 78,4 kDa e ponto isoelétrico 6,5. Entretanto, Chauve et al. (2010) mostraram a presença de duas β -glicosidases nesse preparado comercial através da técnica de eletroforese bidimensional.

Com base nos resultados de caracterização físico química e cinética do extrato comercial Novozym 188 apresentado na literatura, neste trabalho foi feita a purificação das β -glicosidases, utilizando cromatografia de troca iônica e exclusão molecular, visando em um trabalho futuro estudar a influência da lignina, de materiais pré-tratados, nesta enzima purificada. Esse relatório apresenta os dados finais da purificação parcial de β -glicosidases do extrato Novozym 188.

3. METODOLOGIA

3.1. Medida de atividade da β -glicosidase

A atividade da β -glicosidase foi determinada conforme descrito por Tan, Mayers e Saddler (1987), com adaptações. Para isso 0,1 mL da amostra foram misturados a 0,4 mL do substrato *p*NP-G (*p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo) 0,1% (m/v), preparado em tampão acetato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8. A mistura foi deixada incubada a 45°C, por 15 min. Após esse tempo, foi adicionado 1 mL de NaHCO₃ 10%, a fim de interromper a reação. As absorbâncias foram medidas no comprimento de onda 410 nm e os valores de absorbância foram convertidos em concentração de *p*-nitrofenol através de uma curva de calibração.

Uma unidade internacional (UI) de β -glicosidase foi definida como a liberação de 1 μ mol de *p*-nitrofenol por minuto, a 45 °C.

3.2. Medida da atividade da xilanase

A atividade da xilanase foi determinada conforme descrito por Bailey, Biely e Poutanen (1992). Para isso, 0,9 mL de xilana de birchwood 1% foi misturada com 0,1 mL da amostra, a mistura foi incubada a 45°C por 5 min. A reação foi interrompida adicionando 1,5 mL de DNS e os tubos foram fervidos por 5 min. A absorbância foi medida em comprimento de onda 540 nm.

3.3. Medida de atividade da endoglucanase

A atividade enzimática da endoglucanase foi determinada conforme o procedimento descrito por Tanaka (1981) com adaptações. Para isso 0,9 mL de CMC (carboximetil celulose) 0,44% foi misturado a 80 μ L de tampão acetato, pH 4,8 e 10 mM, e aquecido em banho a 50 °C, em seguida foi adicionado 20 μ L da amostra. A reação foi interrompida adicionando 1 mL de DNS, após 30 min de

reação. A absorvância foi medida a 540 nm e a concentração de açúcares redutores foi calculada através de uma curva de calibração utilizando glicose.

3.4. Medida do teor de proteína

Para quantificar as proteínas foi usado o método de Bradford (1976). Foi utilizado 1 mL de Bradford para cada 0,1 mL de amostra e os tubos foram agitados e deixados em repouso por 10 min. Em seguida, a absorvância foi medida no comprimento de onda 595 nm. Com os valores encontrados foi possível calcular a quantidade de proteínas presentes nas amostras, através de uma curva de calibração de albumina.

3.5. Purificação por troca iônica

O pH ideal para a purificação, aquele no qual a proteína adsorvesse à resina, foi determinado de acordo com o seguinte teste, feito em duplicata: 1,0 mL de resina DEAE-CL6B foi misturada com 1,0 mL de tampão em tubos de centrífuga de 2,0 mL, sendo que 4 valores de pH foram usados: 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0 variando-se os tampões. Para os valores de pH 4,0 e 5,0, foi utilizado tampão acetato de sódio. Os demais valores de pH foram ajustados utilizando tampão fosfato de sódio. Os tubos foram centrifugados, e o tampão descartado, sendo o processo repetido cinco vezes, a fim de ajustar o pH da resina. Em seguida, 50 µL do extrato Novozym 188 foi diluída em 50,0 mL de cada tampão, suas absorvâncias foram medidas em 410 nm. Esta mistura foi colocada nos tubos contendo as resinas com os valores de pH devidamente ajustados e agitou-se. A mistura foi centrifugada e a atividade enzimática dos sobrenadantes foi medida, conforme descrito acima.

Foram aplicados 10,0 mL do extrato Novozym 188 diluído 100 vezes em uma coluna DEAE-CL6B (1,0 x 6,0 cm), previamente equilibrada em tampão acetato de sódio 10 mmol/L, pH 5,0. O fluxo foi mantido em 0,7 mL/min com o auxílio de uma bomba peristáltica. Depois de aplicar a amostra, a coluna foi lavada com 25,0 mL do mesmo tampão. Na sequência, para eluir as proteínas retidas na

coluna, foram aplicados volumes diferentes de soluções de NaCl 10 mmol/L, 20 mmol/L e 50 mmol/L. Durante toda a corrida, frações de 1,0 mL foram coletadas com auxílio de um coletor automático. A absorbância das frações foi medida em 280 nm e a atividade de β -glicosidase foi determinada, conforme descrito acima.

As amostras foram agrupadas de acordo com a atividade enzimática e concentradas. Em seguida, cada grupo foi ressuspensionado em água destilada.

3.6. Purificação por exclusão molecular

A amostra (descrita nos resultados) foi aplicada em uma coluna Sephacryl S100 High Resolution (2,5 x 60,5 cm), previamente equilibrada com tampão acetato de sódio, 100 mmol/L, pH 5,0. O fluxo foi mantido em 0,42 mL/min com o auxílio de uma bomba peristáltica e frações de 5,0 mL foram coletadas manualmente. Os primeiros 150,0 mL, aproximadamente o volume vazio da coluna, foram coletados em uma única fração.

As frações foram analisadas quanto ao teor de proteínas em espectrofotômetro, a 280 nm, e tiveram a atividade da β -glicosidase medida.

3.7. Separação de proteínas por ultrafiltração

As amostras, após troca iônica, foram submetidas a ultrafiltração em centrífuga, utilizando um módulo de ultrafiltração de 5,0 kDa e rotação de 4000 rpm, por 15 min. O procedimento foi feito em temperatura baixa (4 °C), afim de evitar desnaturação da enzima.

Tanto as frações que ficaram retidas na membrana quanto as que passaram por ela foram armazenadas. As frações que ficaram retidas foram avolumadas para 2,0 mL com tampão acetato 10 mM, pH 5,0.

3.8. SDS-PAGE

A eficiência da cromatografia foi avaliada através da eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE), conforme proposto por Laemmli (1970). As eletroforeses foram realizadas em uma cuba de eletroforese vertical Ruby SE 600 (GE Healthcare).

Os géis de concentração e separação foram preparados de acordo com as composições descritas na tabela 1. Persulfato de amônio 10% e TEMED foram adicionados por último, e simultaneamente, a mistura foi colocada imediatamente nas placas.

Tabela 1: Composição dos géis de concentração e separação.

	Volume (mL)	
	Gel concentrador (4%)	Gel separador (12%)
H ₂ O	3,075	10,200
Tris-HCl 0,5 mmol/L, pH 6,8 (concentrador)	1,250	-
ou 1,5 mmol/L, pH 8,8 (separador)	-	7,500
SDS 20% (m/v)	0,025	0,150
Acrilamida/Bis-acrilamida 30%/0,8% (m/v)	0,670	12,000
Persulfato de amônio 10%	0,100	0,500
TEMED	0,020	0,060

Os tampões de amostra e de corrida foram preparados conforme as tabelas abaixo:

Tabela 2: Composição do tampão de amostra.

Tampão de amostra (5x)	Quantidade pra 10 mL
β -mercaptoetanol 10 mmol/L	0,0078 g
Tris-HCl 0,2M pH 6,8	4,000 mL da solução 0,5 mol/L
SDS 10% (m/v)	1,000 g
Glicerol 20% (v/v)	2,000 mL
Azul de bromofenol 0,05% (m/v)	0,005 g

Tabela 3: Composição do tampão de corrida.

Tampão de corrida	Quantidade para 1 L
Tris 25 mmol/L	3,028 g
SDS 0,1% (m/v)	15,012 g
Glicina 2º mmol/L	1,000 g

As amostras foram misturadas com tampão de amostra, numa proporção de 4:1 (amostra:tampão) e, em seguida, foram fervidas por 5 min e aplicadas nas canaletas do gel. O volume de amostra utilizado foi determinado de acordo com a quantidade de proteína, de forma que, no máximo, 30 µg de proteínas fossem aplicados em cada canaleta. Durante a corrida, no gel de concentração foi mantida a diferença de potencial de 100V e no gel de separação 150V.

Terminada a corrida, o gel foi embebido em uma solução fixadora, composta por ácido acético:metanol:água (2:9:9). Em seguida, foi mantido por 12 h, a 37 °C, em uma solução corante de composição semelhante à fixadora, mas acrescida de Comassie Blue R-250 0,1%(m/v). Após esse tempo, o gel foi lavado sucessivas vezes na solução fixadora até que as bandas ficassem aparentes.

4. Resultados e Discussão

4.1. Purificação por troca iônica

Durante o teste de adsorção em diferentes valores de pH foi possível observar que uma fração representativa da enzima não ficou retida na resina ao usar o tampão acetato de sódio em pH 4,0 (Tabela 4).

Tabela 4: Absorbâncias a 410 nm da reação do extrato comercial com p-NPG antes e depois do teste de adsorção à resina equilibrada em diferentes valores de pH.

pH	Absorbância inicial	Absorbância do sobrenadante
4,0	0,725	0,237
5,0	0,820	0,020
6,0	0,776	0,020
7,0	0,835	0,019

A comparação dos valores de absorbâncias também deixa claro que o ponto isoelétrico (pI) da enzima está entre 4,0 e 5,0, uma vez que a partir do valor de pH 5,0 a proteína aderiu à resina. Neste ponto há uma divergência do resultado apresentado por Vinzant (2001), que encontrou o valor de pI 6,5 para a β -glicosidase desse extrato. O valor de pH 5,0 foi escolhido, já que esse foi o menor valor no qual houve adsorção da enzima de interesse. Dessa forma, proteínas com valores de pI maiores que 5,0 seriam eluídas da coluna por repulsão entre os seus grupos trocadores e a enzima..

A fim de averiguar se a β -glicosidase adsorveu na resina durante a corrida, foi feita a determinação da atividade enzimática das frações eluídas.. Não foi detectada atividade de β -glicosidase, indicando que a enzima ficou retida na coluna. A figura 1 mostra o perfil de eluição com NaCl das proteínas que ficaram retidas na coluna aniônica DEAE-CL6B. Foram feitas as análises de proteína a 280 nm e de atividade de β -glicosidase a 410nm de cada uma das 112 frações coletadas.

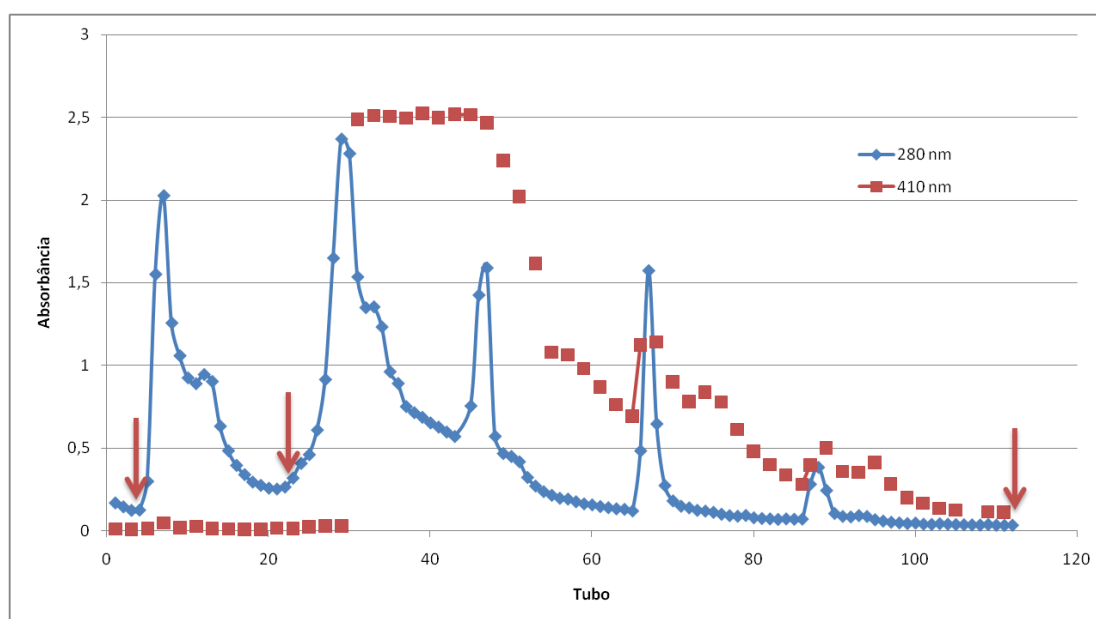


Figura 1: Perfil de eluição das proteínas do extrato comercial Novozym em DEAE CL6B. As setas indicam o início da aplicação sequencial das soluções de NaCl nas concentrações de 10 mmol/L, 20 mmol/L e 50 mmol/L.

A eluição da coluna, com 20,0 mL a solução de NaCl 10 mmol/L, coincidiu com um pico de proteína, evidenciado pelo aumento da absorbância a 280 nm (primeira seta na figura 1). Não foi detectada atividade de β -glicosidase nessa fração.

Ao aumentar a força iônica do tampão com NaCl 20 mmol/L (segunda seta na figura 1), proteínas com atividade de β -glicosidase foram eluídas, evidenciado pelo aumento da absorbância a 410 nm, após teste de atividade enzimática. O primeiro pico que aparece a 280 nm, tubo 29, não apresenta atividade de β -glicosidase, que tem início no tubo 31. Até o tubo 47, a absorbância a 410 nm após o ensaio de atividade enzimática ultrapassou a capacidade de detecção do espectrofotômetro, mostrando alta atividade da β -glicosidase.

Analisando os picos de proteína (280 nm), pode ser observado um patamar que começa a ser detectado no tubo 33. Se fosse possível detectar o início desse pico (caso os picos tivessem sido resolvidos), muito provavelmente coincidiria com o início da atividade enzimática, indicando que esse pico corresponde à β -glicosidase. O próximo pico de absorbância a 280 nm, que tem início no tubo 47, também coincide com uma região de grande atividade enzimática. Esta atividade,

após o tubo 47, decresce ao mesmo tempo em que decresce a absorvância a 280 nm, indicando a presença de outra isoenzima com atividade β -glicosidase.

Os dois últimos picos de proteína, tubos 66 a 69 e 86 a 90, ocorrem simultaneamente à detecção de picos atividade enzimática, o que indica que nestes dois picos também estão presentes enzimas com atividade de β -glicosidase. De acordo com esse cromatograma, é possível inferir que pelo menos 4 isoenzimas com atividade de β -glicosidase possam estar presentes no extrato da Novozym 188.

Em seguida, a coluna foi eluída com 25,0 mL NaCl 50mmol/L (terceira seta) e o volume foi coletado em um béquer. Nessa fração, apenas uma pequena atividade de β -glicosidase foi detectada.

As frações foram agrupadas, após análise do cromatograma, conforme a tabela 5. Os tubos 1 a 29 foram descartados, por não apresentarem atividade enzimática.

Tabela 5: Agrupamento dos tubos de acordo com atividade enzimática.

Grupo	Tubos
1	30 a 39
2	40 a 53
3	54 a 64
4	65 a 72
5	73 a 82
6	83 a 91
7	92 a 112
8	25 mL de NaCl 0,5 M

4.2. SDS-PAGE após troca iônica

Para evidenciar o perfil protéico das frações, foram realizadas eletroforeses em condições desnaturantes (SDS-PAGE). O resultado pode ser observado nas figuras 2 e 3.

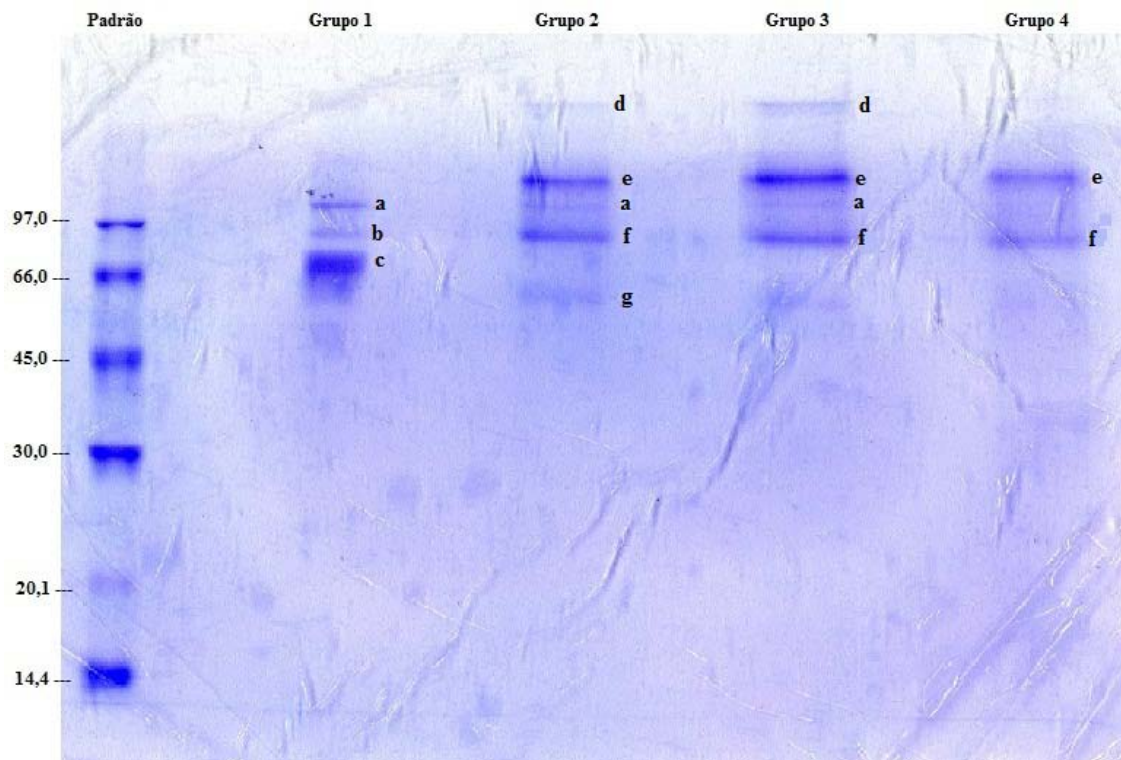


Figura 2: SDS-PAGE das frações de 1 a 4, coletadas após cromatografia de troca iônica. A primeira coluna do gel corresponde ao padrão de massa molar.

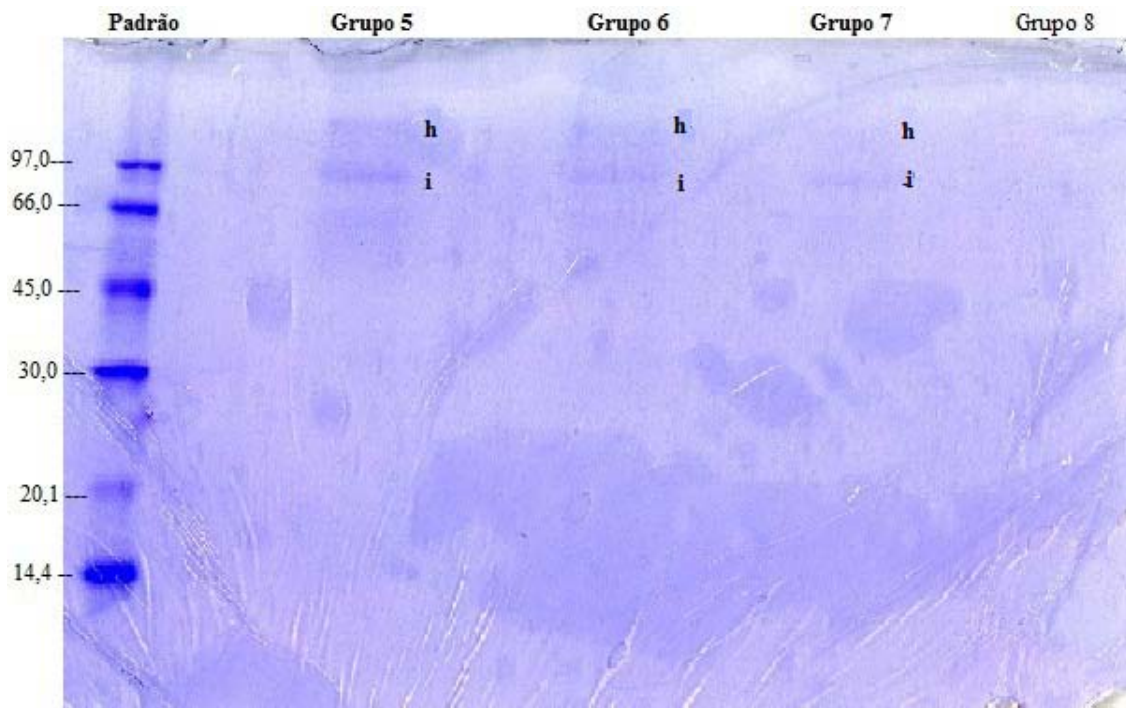


Figura 3: SDS-PAGE das frações de 5 a 8, coletadas após cromatografia de troca iônica. A primeira coluna do gel corresponde ao padrão de massa molar.

Nas canaletas 1 e 2, foram aplicados 30 µg de proteína e nas demais foram utilizadas 150 µL de amostra. As letras de ‘a’ até ‘i’, nos géis indicam as diferentes bandas detectadas na eletroforese. Nenhum dos grupos apresentou uma banda única, o que demonstra que a β-glicosidase não foi completamente purificada neste procedimento.

O primeiro gel tem as bandas mais evidentes que o segundo, devido a maior quantidade de proteína aplicada. Apesar de terem sido detectadas proteínas na fração 8 pelo método de Bradford, nenhuma banda pode ser observada no gel (Figura 2), sugerindo que nessa fração haja algum interferente ao método de determinação protéica..

Pela massa molar das bandas do padrão e mobilidade relativa (R_f) foi estimada a massa molar das bandas presentes no gel, conforme tabela 6.

Tabela 6: Estimativa das massas molares das bandas presentes no gel.

Banda	Massa molar (kDa)
A	93,1
B	84,1
C	73,9
D	139,3
E	104,4
F	80,6
G	63,1
H	100,6
I	82,7

Pode-se inferir que as bandas ‘i’ e ‘f’ representam a mesma proteína, assim como as bandas ‘h’ e ‘e’, pois apresentam massas molares bastante próximas. No entanto, como foram feitas em géis diferentes o valor de R_f pode sofrer pequenas alterações, o que leva a uma variação na estimativa da massa molar.

Além disso, é possível inferir que a β-glicosidase descrita por Vinzant (2001) pode ser a proteína representada pela banda ‘c’, já que sua massa molar estimada foi 73,9 kDa, um valor próximo da massa citada por ele, 78,4 kDa.

4.3. Purificação por exclusão molecular

O grupo 1 foi submetido à cromatografia de exclusão molecular, por ser o grupo que apresenta maior atividade da β -glicosidase.

As frações foram coletadas em 52 tubos e, depois de medidas as absorbâncias a 280 nm e 410 nm (após ensaio de atividade enzimática). A figura 4 mostra o cromatograma gerado por essa etapa de purificação.

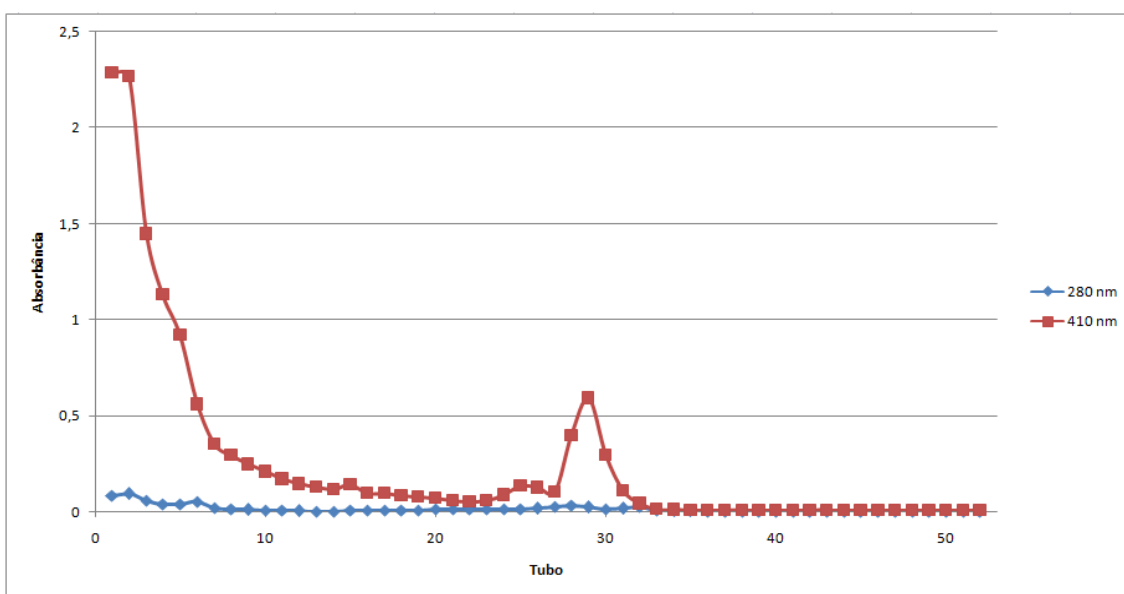


Figura 4. Perfil de eluição das proteínas obtidas da troca iônica (grupo I) que foram aplicadas na cromatografia de exclusão molecular

É observar a presença de dois picos de atividade de β -glicosidase, sendo que o primeiro (tubos 1 a 7) apresenta maior atividade do que o segundo (tubos 27 a 31), estes picos de atividade enzimática coincidem com um aumento na quantidade de proteínas (favor fazer uma segunda escala para a proteína aí você vai ver melhor os picos). Isto nos leva a crer que a quantidade de proteínas nessas frações foi baixa, sendo a β -glicosidase a proteína mais presente. Os tubos foram reagrupados, conforme a tabela 7, de acordo com suas atividades.

Tabela 7. Agrupamento após exclusão molecular.

Grupo	Tubos
G1/1	1 e 2
G1/2	3 ao 8
G1/3	9 ao 27
G1/4	28 ao 31

Os tubos 32 a 52 foram descartados por não apresentarem atividade de β -glicosidase.

Os grupos G1/1, G2/2 e G1/4 foram liofilizados interrompendo a liofilização antes da sublimação total. O grupo G1/3 não foi liofilizado, já que possuía baixa atividade enzimática e quase inexistente presença de proteína.

A figura 5 mostra o perfil protéico das frações coletadas após a cromatografia de exclusão molecular G1/1, G1/2 e G1/4, analisado por SDS-PAGE.

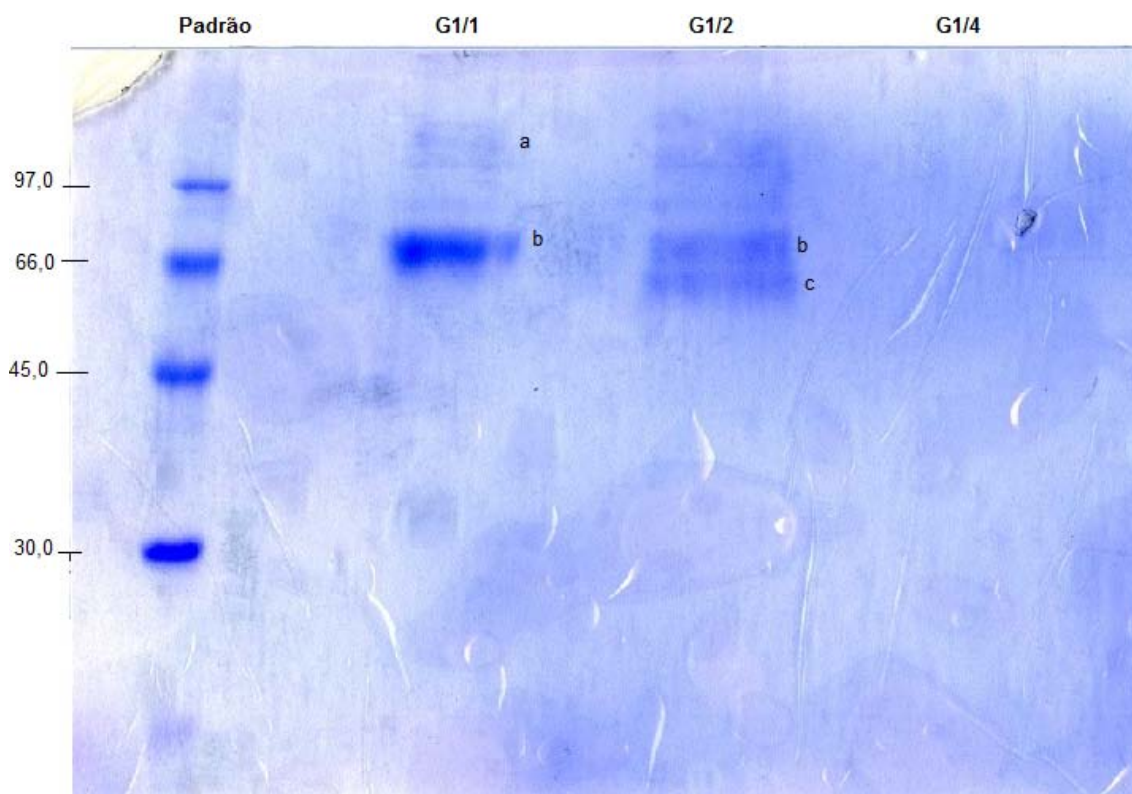


Figura 5. Gel de separação do grupo 1, após exclusão molecular.

Mesmo após a segunda cromatografia, nenhum dos grupos apresentou uma banda única, ou seja, β -glicosidase não foi completamente purificada após este procedimento.

No entanto, após essa etapa de purificação a enzima perdeu muito de sua atividade. A tabela abaixo mostra os dados da purificação após a exclusão molecular.

Tabela 8. Purificação após exclusão molecular.

Grupo	Atividade (UI)	Proteína (mg)	Atividade específica
G1/1	0,51	0,72	0,71
G1/2	0,15	0,61	0,24
G1/4	0,06	0,04	1,63

Após a liofilização, houve uma queda acentuada na atividade enzimática e, conseqüentemente a atividade específica, a purificação e o rendimento apresentaram valores extremamente baixos. É possível que a enzima tenha perdido atividade devido a algum resíduo de NaCl proveniente da etapa de troca iônica que foi concentrado após a liofilização. Outro fato que pode ter contribuído para a perda de atividade é o modo como a enzima foi congelada. O congelamento a -60°C foi feito em ultrafreezer, que é um procedimento mais lento do que se tivesse sido utilizado, por exemplo, o nitrogênio líquido. Dessa forma pode ter havido a formação de cristais os quais poderiam desnaturar a enzima. A combinação da presença de sal e o modo de congelamento também que ser considerados como fatores responsáveis pela perda de atividade enzimática.

Como o objetivo deste trabalho foi purificar a β -glicosidase para estudar a influência da lignina de materiais pré-tratados nesta enzima, era necessário que a enzima estava pura e ativa. Por este motivo, uma nova purificação foi iniciada e a liofilização foi descartada como forma de concentração.

4.4. Segunda purificação por troca iônica.

A troca iônica foi realizada seguindo os mesmos parâmetros utilizados na primeira. No entanto, as frações foram coletadas a partir do momento que a enzima diluída foi aplicada na coluna. As absorbâncias nos comprimentos de onda 280 nm e

410 nm (após ensaio enzimático) foram medidas e o cromatograma pode ser observado na figura 6:

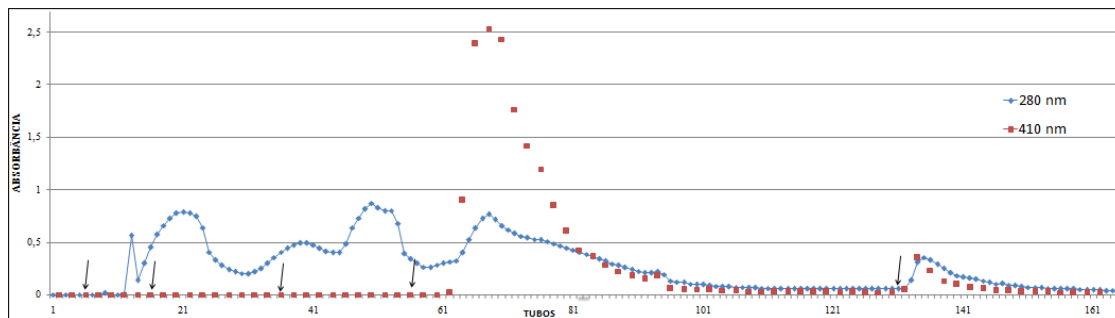


Figura 6. Perfil de eluição das proteínas do extrato comercial Novozym em DEAE CL6B. As setas indicam o início da aplicação sequencial das soluções de NaCl nas concentrações de 10 mmol/L, 20 mmol/L e 50 mmol/L.

A primeira seta corresponde ao início da passagem da Novozym 188 diluída, a segunda mostra o momento de aplicação do tampão, as setas três, quatro e cinco equivalem a aplicação do NaCl 10mmol/L, 20 mmol/L e 50 mmol/L, respectivamente.

Pode-se ver que há picos de proteína antes que comece a ser detectada atividade enzimática, indicando a separação de proteínas sem atividade de β -glicosidase. A solução salina 10 mmol/L não foi capaz de desorver a β -glicosidase da coluna, mas teve força suficiente para arrastar outras proteínas que interagem menos intensamente com a resina.

Foi medida a atividade da endoglucanase e da xilanase nos tubos que apresentavam picos de proteínas, mas não foi detectada atividade de nenhuma das duas enzimas. No entanto, o fato de não ser possível detectar atividade da endoglucanase e da xilanase não nos dá a certeza de que estas enzimas não estejam presentes no extrato, pois ele foi diluído inicialmente. Além disso, a concentração dessas enzimas é bem menor do que da β -glicosidase no extrato original.

Semelhante ao que aconteceu na primeira purificação por troca iônica, a eluição da β -glicosidase teve início com a aplicação da solução de NaCl 20 mmol/L. Também podem ser observados picos de atividade enzimática coincidentes com picos proteicos em diferentes pontos do cromatograma.

Há três picos de atividade enzimática. O primeiro (tubos 62 a 85) é o que apresenta maior concentração de proteínas e maior atividade enzimática. Assim

como no primeiro cromatograma (Figura 1), é possível notar um ombro (tubo 76) no primeiro pico. No entanto, no primeiro cromatograma este ombro é visível apenas na análise protéica (280 nm). No cromatograma da segunda troca iônica (Figura 6) ele pode ser visto, sutilmente, também na análise da atividade da β -glicosidase (410 nm).

O segundo pico (tubos 92 a 96) é o que tem menor atividade da β -glicosidase e menor quantidade de proteína. Enquanto que o terceiro (tubos 132 a 140) apresenta a absorvância intermediária em ambos os comprimentos de onda.

Os tubos foram agrupados de acordo com a atividade enzimática (Tabela 9). Os tubos de 1 a 62 foram descartados por não apresentarem atividade da β -glicosidase.

Tabela 9. Grupamento conforme atividade enzimática.

Grupo	Tubos
G1-3	63 a 88
G2-3	89 a 91
G3-3	92 a 95
G4-3	96 a 132
G5-3	133 a 143
G6-3	144 a 164

Com o intuito de remover o sal dos grupos e de concentrá-los, eles foram submetidos à ultrafiltração, conforme descrito na metodologia, e foi medida a atividade da β -glicosidase e a quantidade de proteínas nos grupos em todas as etapas. A tabela 10 mostra os resultados:

Tabela 10. Procedimento de purificação da β -glicosidase do extrato Novozym.

	Atividade (UI/mL)	Proteína (μg)	Atividade específica	Fator de purificação	Rendimento
Extrato inicial	4540,19	2197,60	2066,00	1	100
Troca Iônica					
G1-3	287,94	1678,80	4459,34	2,16	63,40
G2-3	48,06	28,10	5122,88	2,48	10,60
G3-3	46,57	87,90	2120,08	1,03	10,30
G4-3	6,94	-	-	-	1,50
G5-3	47,69	-	-	-	10,50
G6-3	6,44	-	-	-	1,40

**Ultrafiltração
(fração retida)**

G1-3	26,58	-	-	-	5,85
G2-3	42,90	66,00	1300,02	0,63	9,45
G3-3	0,76	27,80	56,45	0,03	0,17
G4-3	68,45	218,10	627,68	0,30	15,08
G5-3	1,91	-	-	-	0,42
G6-3	0,49	-	-	-	0,11

**Ultrafiltração
(fração passou)**

G1-3	16,19	12,03	24562,23	11,89	3,56
G2-3	-	-	-	-	-
G3-3	-	-	-	-	-
G4-3	-	-	-	-	-
G5-3	11,87	0,061	1536772,76	743,84	2,62
G6-3	-	-	-	-	-

Houve perda de proteína, principalmente após a ultrafiltração. A diminuição da quantidade de proteína não é ruim, desde que as proteínas removidas não apresentem atividade de β -glicosidase, que foi o que ocorreu após a troca iônica. Nesta etapa a perda de proteínas foi de 18% (contabilizando todos os grupos) em relação ao extrato inicial. No entanto, a atividade enzimática não sofreu grande alteração, como se pode perceber pelo aumento na atividade específica da enzima e elevado rendimento (97,7%, considerando todas as frações)

O grupo G1-3 foi o que apresentou maior atividade e maior rendimento, enquanto que G2-3 apresentou o maior fator de purificação, sendo o extrato enriquecido em até 2,5 vezes quanto a atividade de β -glicosidase nessa etapa. Não foi possível detectar proteínas pelo método de Bradford nos grupos G4-3 a G6-3. Por este motivo, não foi possível calcular a atividade específica e o fator de purificação destes grupos. O grupo G5-3 tem uma atividade enzimática elevada e apresenta pouca proteína, indicando um enriquecimento da atividade de β -glicosidase, mesmo não sendo possível calcular o fator de purificação.

A membrana utilizada na ultrafiltração tem poros de tamanho médio de 5,0 kDa. Como a β -glicosidase tem massa molecular superior a 70 kDa, era esperado que o NaCl e outras proteínas menores passassem pela membrana enquanto que a β -

glicosidase ficasse retida. No entanto, isso não foi observado. Os grupos G1-3 e G5-3 tiveram atividade da β -glicosidase detectada tanto na fração que passou pela membrana durante a ultrafiltração, quanto na que ficou retida. A membrana pode ter sido danificada durante o processo de filtração, uma vez que celulasas presentes nas frações podem ter agido na membrana, que é feita de celulose regenerada, rompendo sua estrutura e alterando o tamanho dos poros. Os grupos G2-3 e G4-3 (fração retida) tiveram um aumento na quantidade de proteína após a ultrafiltração. O grupo G3-3 (fração retida) teve perda de proteína, que possivelmente aderiu à membrana e não foi recuperada durante o processo.

Após a ultrafiltração, grupo G1-3 teve uma grande perda na atividade enzimática e uma drástica diminuição no teor de proteína. Quase toda proteína dessa fração passou pela membrana. No entanto, a atividade enzimática na fração retida deixa evidente que há β -glicosidase, mesmo que em quantidade muito pequena. Como não foi possível determinar a quantidade de proteínas dessa fração, não foi possível calcular a atividade específica e o fator de purificação. Já na fração que passou pela membrana a atividade específica é muito alta e a purificação também, devido à baixa concentração de proteínas. O rendimento foi baixo para as duas frações.

G2-3 teve pequena diminuição na atividade enzimática e aumento protéico, resultando em baixa atividade específica e fator de purificação. Além disso, o rendimento também foi baixo, apesar de ter sido o segundo maior dentre todos os grupos. O grupo G3-3, que corresponde ao segundo pico de atividade enzimática, teve sua quantidade de proteína reduzida, sendo que boa parte da proteína perdida era a β -glicosidase, já que se observa uma redução drástica na atividade desta enzima. A atividade específica foi muito baixa. Em ambos os grupos não foi possível detectar proteínas nas frações que passaram pela membrana.

O grupo G4-3, diferentemente dos demais, teve um aumento considerável na atividade enzimática e na quantidade de proteínas. Não é possível saber se a atividade específica aumentou ou não, pois não foi possível calculá-la na etapa anterior. Como para os demais grupos, a purificação foi baixa. No entanto, o rendimento foi o maior dentre os grupos.

Os grupos G5-3 e G6-3 tiveram muita perda na atividade da enzima e rendimentos muito baixos. No grupo G5-3, a maior parte da β -glicosidase ativa passou pela membrana e, diferente de G5-3 após a da troca iônica e de G5-3 que

ficou retido na membrana durante a ultrafiltração, na fração que passou pela membrana foi possível calcular a quantidade de proteína, apesar de ter sido muito baixa. Por este motivo a atividade específica dessa fração foi muito alta, assim como o fator de purificação foi muito alto.

4.5. Eletroforese em SDS-PAGE das frações protéicas obtidas nas ultrafiltrações do extrato comercial Novozym

O perfil protéico dos grupos foi analisado aplicando 200 μ L de amostra em cada canaleta do gel. Esse volume foi utilizado, pois era a quantidade máxima de amostra que poderia ser aplicada. Isso foi necessário, pois a concentração de proteína era baixa em todos os grupos e as bandas não seriam visíveis se quantidade menor de amostra fosse aplicada.

A figura 7 corresponde ao gel com as frações que foram retidas pela membrana durante a ultrafiltração. A figura 8 corresponde às frações que passaram pela membrana. O grupo G6-3 não foi analisado por eletroforese já que a atividade e concentração de proteínas foram muito baixas.

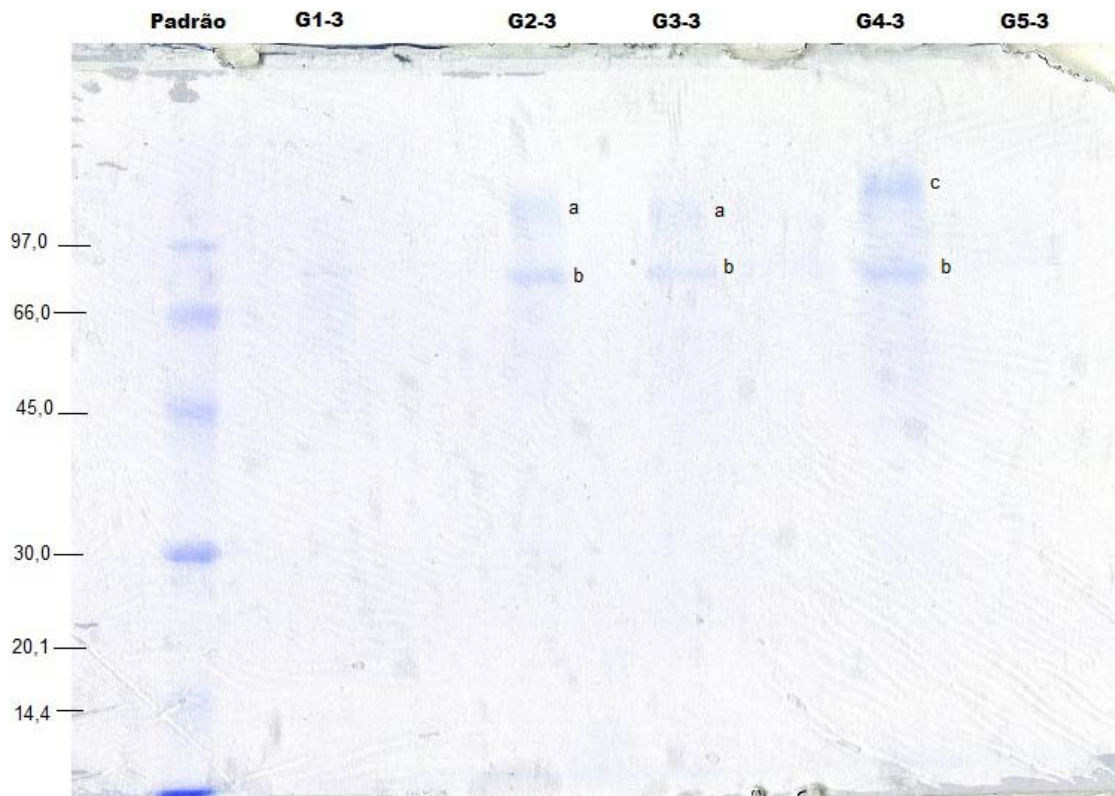


Figura 7. Gel após ultrafiltração, frações que foram retidas pela membrana.

Nas frações que ficaram retidas pela membrana é possível visualizar três bandas. Nos grupos G1-3 e G5-3 não se vê banda alguma e em G2-3 a G4-3 se vê duas bandas distintas. É possível inferir que a banda 'b' corresponda à β -glicosidase, devido a sua massa molecular (Vinzant et al., 2001). G2-3 e G3-3 tem as bandas na mesma posição, ou seja, provavelmente tem o mesmo perfil protéico. Já em G4-3 não se vê a banda 'a', mas há outra banda neste grupo, a banda 'c', que tem uma massa molar superior a 'a' e a 'b'. Aparentemente G3-3 é o grupo que contém menos β -glicosidase, dentre aqueles que contém esta enzima.

Observando a intensidade das bandas, é possível notar que G3-3 é o grupo que menos contém β -glicosidase, enquanto G4-3 é o que mais tem a enzima. Esta observação está de acordo com os valores de atividade enzimática obtidos.

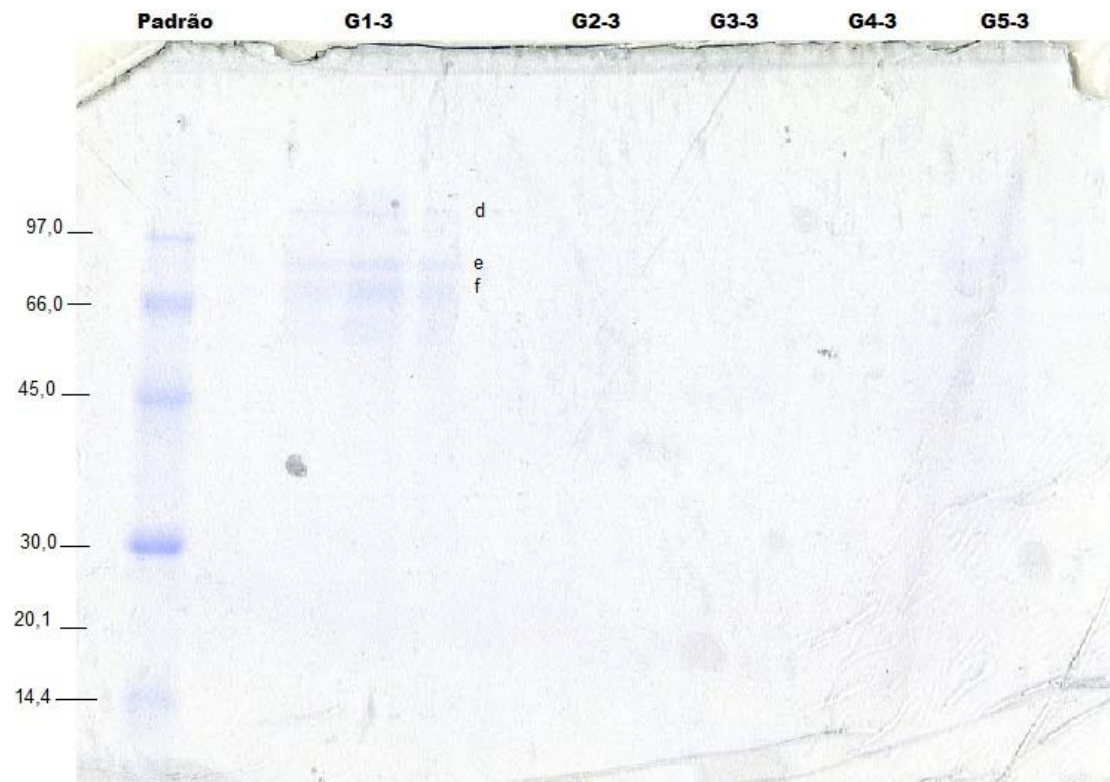


Figura 8. Gel SDS-PAGE das frações que passaram pela membrana de ultrafiltração.

O grupo G1-3 é o único que apresenta bandas visíveis, dentre as frações que passaram pela membrana. Como ele apresenta atividade de β -glicosidase, é possível que uma das bandas entre 66,0 e 97,0 kDa ('e' e 'f') seja a mesma proteína classificada como 'b' na figura 7. Nos demais grupos, não se pode ver nenhuma banda, já que a quantidade de proteínas foi muito baixa.

Em nenhum dos grupos, tanto nas frações que ficaram retidos quanto nas que passaram pela membrana, a β -glicosidase está purificada. No entanto a concentração por ultrafiltração, se comparada com a liofilização, reduziu a variação de proteínas. Isto é perceptível pelo número de bandas presentes, o gel após a liofilização apresenta um número maior de bandas do que o gel após a ultrafiltração.

5. Conclusão

O processo utilizado não foi suficiente para a purificação total da β -glicosidase. No entanto, foi possível fracionar as proteínas do extrato comercial Novozym 188. Após as etapas de purificação, houve enriquecimento das frações com relação à atividade dessa enzima. A etapa de concentração das proteínas, tanto a liofilização como a ultrafiltração, foi a mais problemática e que resultou nas maiores perdas de atividade enzimática com consequente baixa recuperação da enzima.

A repetição da cromatografia por exclusão molecular alcançou um maior grau de purificação da β -glicosidase, entretanto mais etapas seriam necessárias para a purificação completa da enzima.

Os métodos de detecção de proteína são pouco sensíveis a baixas concentrações de proteínas como no caso de amostras purificadas. Apesar disso, o método de Bradford pode ser usado neste trabalho. Em algumas frações que apresentaram quantidade muito baixa de proteínas este método não foi capaz de detectá-las, impossibilitando o cálculo da atividade específica e do fator de purificação.

Além disto, foi possível notar que o extrato Novozym 188 contém, pelo menos, três isoenzimas da β -glicosidase, uma a mais do que os resultados até então reportados na literatura.

6. REFERÊNCIAS

- A. SUURNÄKKI; M. TENKANEN; M. SIIKA-AHO; M.-L. NIKU-
PAAVOLA; L. VIIKARI; J. BUCHERT. *Trichoderma reesei* cellulases and their
core domains in the hydrolysis and modification of chemical pulp. VTT
Biotechnology and Food Research, 2000.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J.
Pretreatment Technologies for an efficient bioethanol production process based on
enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851-61,
2010.
- BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEM, K. Interlaboratory testing of
methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, v. 23, p. 257 -
270.
- BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of
Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye
Binding. *Analytical Biochemistry* 72, p. 248-254, 1976.
- BRIENZO, M.; ARANTES, V.; MILAGRES, A.M.F. Enzymology of the
thermophilic ascomycetous fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Fungal Biology
Reviews**, v. 22, p. 120-30, 2009.
- CHAUVE, M., MATHIS, H., HUC, D., CASANAVE, D., MONOT, F.,
FERREIRA, N.L. Comparative kinetic analysis of two fungal β -glucosidases.
Biotechnology for Biofuels 2010, 3:3
- FENGEL, D.; WEGENER, G. *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*.
Berlin: Walter de Gruyter, 1989.
- GHOSE, T.K. Measurement of cellulose activities. *Pure & Applied
Chemistry*, v.59, p. 257-268, 1987.
- HUI, J.P.M.; WHITE, T.C.; THIBAUT, P. Identification of glycan
structure and glycosylation sites in cellobiohydrolase II and endoglucanases I and II
from *Trichoderma reesei*. *Glycobiology*, v. 12, p. 837-849, 2002.
- IRWIN, D.C.; SPEXIO, M.; WALKER, L.P.; WILSON, D.B. Activity
studies of eight purified cellulases: specificity, synergism and binding domain
effects. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, v. 42, p. 1002-1013, 1993.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head
of bacteriophage T₄. *Nature*, London, v. 227, p. 680-685, 1979.
- LEENA RAHKAMO, M.; VEHVILAINEN, M.; DOLK, M.; VIIKARI, L.;
NOUSIAINEN P.; BUCHERT J. Modification of hardwood dissolving pulp with
purified *Trichoderma reesei* cellulases, 1996.
- LYN, L.R.; WEIMER, P.J.; ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. Microbial
cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular
Biology Reviews*, v. 66, p. 506-577, 2002.

JØRGENSEN, H.; KRISTENSEN, J.B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugar: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 1, p. 119-34, 2007.

MANSFIELD, S.D.; MOONEY, C.; SADDLER, J.N..Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnol Progress*, v. 15, p. 804-816, 1999.

MEDVE, J.; LEE, D.; TJERNELD, F. Ion-exchange chromatographic purification and quantitative analysis of *Trichoderma reesei* cellulose cellobiohydrolase I, II and endoglucanase II by fast protein liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 808, p. 153-165, 1988.

MENDES, F.M.; SIQUEIRA, G.; CARVALHO, W.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.F. Enzymatic hydrolysis of chemithermomechanically pretreated sugarcane bagasse and samples with reduced initial lignin content. **Biotechnol. Prog.**, v. 27, n° 2, p. 395-401, 2011.

MONTE, J.R. sacarificação da polpa celulósica do bagaço de cana-de-açúcar com celulasas e xilanases de *Thermoascus aurantiacus*. 2009. 138 p. Dissertação (Mestrado) Departamento de Biotecnologia, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo, 2009.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69-80, 2000.

STÅHLBERG, J.; JOHANSSON, G.; PETTERSSON, G.; *Trichoderma reesei* has no true exo-cellulase: all intact and truncated cellulases produce new reducing end groups on cellulose. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1157, p. 107-113, 1993.

TANAKA, M.; TANIGUCHI, M.; MATSUNO, R.; KAMIKUBO, T. Purification and properties of cellulases from *Eupenicillium javanicum*. Studies on the re-utilization of cellulosic resources (VII). *Journal of Fermentation Technology*, v. 59, p. 177 -183, 1981.

VIZANT, T.B.; ADNEY, W.S.; DECKER, S.R.; BAKER, J.O.; KINTER, M.T.; SHERMAN, N.E.; FOX, J.W.; HIMMEL, M.E. Fingerprinting *Trichoderma reesei* hydrolases in a commercial cellulose preparations. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 91-93, p. 99-107, 2001.

ZHANG, Y.H.P.; LYND, L.R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, p. 797-824, 2004.

ZHU, L.; O'DWYER, J.P.; CHANG, V.S.; GRANDA, C.B.; HOLTZAPPLE, M.T. Structural features affecting biomass digestibility. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 3817-3828, 2008.