

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNO AFONSO RAMOS CASSILHA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA CELULASE DE *Azospirillum*
*brasiliense***

CURITIBA

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNO AFONSO RAMOS CASSILHA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA CELULASE DE *Azospirillum*
*brasiliense***

Monografia apresentada à disciplina
BIO-028 Estágio Supervisionado em
Biologia, como pré-requisito à
conclusão do Curso de Bacharelado
em Ciências Biológicas, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Paraná

Orientador: Dr. Rose Adele Monteiro

Coorientador: MSc. Marcelo Scarduelli

CURITIBA

2015

AGRADECIMENTOS

À minha família, principalmente a minha mãe, pela educação, carinho e suporte que me forneceu e continua me fornecendo ao longo de toda minha vida.

À minha orientadora, Rose Adele Monteiro, pela orientação ao longo do meu estágio e pela contribuição a minha formação científica.

Ao meu co-orientador Marcelo Scarduelli, pela disponibilidade, paciência e por toda ajuda em cada etapa deste trabalho.

A todos os meus amigos que estiverem presentes nesta fase de graduação, principalmente ao Carlos, por não enxergar cores e ao Leonardo, por ser freguês no FIFA.

A todos do Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio, principalmente ao pessoal do Anexo, da 271 e os técnicos Valter de Baura e Roseli Prado pela ajuda em toda e qualquer dúvida que eu tinha.

À professora Dra. Lucélia Donnati do departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná pela análise no microscópio eletrônico de varredura e pela ajuda detalhada na preparação do material.

RESUMO

A biomassa lignocelulósica constitui um dos materiais biológicos mais abundantes do planeta, sendo de grande interesse comercial a obtenção de enzimas capazes de degradá-la. As celulasas e hemicelulasas conseguem cumprir esse papel, podendo ser utilizadas em diversos processos industriais, como a produção de biocombustíveis (principalmente o etanol de 2ª geração), biopolimento e remoção de cor em têxteis, clarificação de sucos e outros métodos da indústria alimentícia. Existem três tipos diferentes de celulasas, as endoglucanases, as exoglucanases e as β -glucosidases, que atuam conjuntamente na quebra das fibras de celulose até glicose. O objetivo deste trabalho é purificar e caracterizar uma β -glucosidase proveniente da bactéria promotora de crescimento vegetal *Azospirillum brasilense*. O gene que codifica para essa proteína já foi isolado, sequenciado e clonado no plasmídeo de expressão pET28. A purificação da proteína foi feita por cromatografia de afinidade em uma coluna de níquel de 1ml, a determinação da atividade da enzima foi feita utilizando o substrato p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (1 mM) que quando clivado por β -glucosidases libera um composto (paranitrofenol) com coloração amarela que pode ser quantificado por colorimetria. A enzima apresentou boa atividade entre os pHs 7 e 9, sendo mais ativa no pH 8, não precisou de um cofator para catalisar a reação, os íons Ca^{2+} , Mg^{2+} e Cu^{2+} não causaram alterações na atividade, assim como o EDTA, portanto acreditamos que ela também não possui um metal na sua estrutura. A enzima perdeu toda atividade quando incubada por 30 minutos a 60°C e depois testada a 37°C, ela foi mais ativa quando incubada no gelo e depois testada a 55°C. A β -glucosidase parece ser bastante halotolerante, suportando concentrações de até 1M de NaCl sem perder muita atividade, na concentração de 2M apresenta 67% da atividade e na de 6M, 27%. A enzima apresentou uma temperatura de desnaturação de 58,7°C. Não foi possível determinar por microscopia eletrônica se a enzima está relacionada com a colonização de *A. brasilense* na planta.

Palavras-Chave: Celulase, β -glucosidase, pNPG, *Azospirillum brasilense*

ABSTRACT

Lignocellulosic biomass consist in one of the most abundant biological matter in the planet, being of great economical interest the obtainment of enzymes able to degrade it. Cellulases and hemicellulases can fulfill this role, being utilized in many industrial procedures, like biofuel production (mostly second generation bioethanol), biopolishing and color removal of textiles, juice clarification and others food industry processes. There are three types of cellulases, endoglucanases, exoglucanases and β -glucosidases, which act synergetic in the hydrolysis of cellulose fibers to glucose. This study aimed to purify and characterize a β -glucosidase from plant-root-colonizing bacteria *Azospirillum brasilense*. The protein gene had already been isolated, sequenced and cloned in the expression plasmid pET28. Affinity chromatography with a 1ml nickel column was used to purify the enzyme, p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (1mM) was selected as substrate to determine enzyme activity because when cleaved by β -glucosidases it releases a yellow colored compound (paranitrophenol) that can be detected by a spectrophometer. The enzyme showed good activity in the pHs range of 7 to 9, with pH 8 being the optimal activity, it didn't need cofactors to catalyze the reaction, ions Ca^{+2} , Mg^{+2} and Cu^{+2} caused no alteration in activity, just as EDTA, so we believe this enzyme is not a metalloprotein. The β -glucosidase lost all its activity when incubated for 30 minutes at 60°C and then tested at 37°C, it was most active when incubated at ice and then tested at 55°C. The enzyme seems to be halotolerant, withstanding concentrations up until 1M of NaCl without loss of activity, at 2M it showed 67% of activity and at 6M, 27%. The protein melting temperature was calculated to be 58,7°C. Using scanning electron microscopy we weren't able to determine if the enzyme is related to the plant colonization of *A. brasilense*.

Keyword: Cellulase, β -glucosidase, pNPG, *Azospirillum brasilense*

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Estirpe de bactéria usadas neste trabalho16

TABELA 2: Plasmídeo usado neste trabalho17

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Padrão Eletroforético da purificação da Bglid2.....	24
FIGURA 2: Ensaio de pH usando pNPG como substrato e a enzima β-glucosidase.....	25
FIGURA 3: Ensaio do efeito da temperatura na atividade da Bglid2.....	26
FIGURA 4: Ensaio de termoestabilidade da Bglid2.....	27
FIGURA 5: Ensaio de íons, EDTA e BSA.....	28
FIGURA 6: Ensaio de halotolerância da Bglid2.....	29
FIGURA 7: Ensaio do efeito da concentração do substrato pNPG.....	30
FIGURA 8: Ensaio de temperatura de desnaturação da Bglid2.....	31
FIGURA 9: Microscopia eletrônica de varredura, aumento x20.....	32
FIGURA 10: Microscopia eletrônica de varredura, aumento x40.....	33
FIGURA 11: Microscopia eletrônica de varredura, aumento x100.....	33
FIGURA 12: Microscopia eletrônica de varredura, aumento x200.....	34
FIGURA 13: Microscopia eletrônica de varredura, aumento x500.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

BGL	- β -glucosidase
Bis-Tris	- Bis(2-hidroxietil)amino – tris(hidroximetil)metano
BSA	- Albumina de soro bovino
CBH	- Celobiohidrolase
D.O ₆₀₀	- Densidade óptica a 600nm
EG	- Endo-(1,4)- β -D-glucanase
HEPES	- Ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanossulfónico
IPTG	- β -D-isopropil-tiogalactopiranosídeo
Km ^r	- Resistência a canamicina
pNP	- Paranitrofenol
pNPG	- Paranitrofenil- β -D-glicopiranosídeo
rpm	- Rotação por minuto
SDS	- Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	- Dodecilsulfato de sódio – eletroforese em gel de poliacrilamida
Tris	- Tris(hidroximetil)-aminometano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Celulase	11
1.2 β -Glucosidase	12
1.3 Aplicações industriais	12
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 MEIOS DE CULTIVO E ANTIBIÓTICOS	16
3.2 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS	16
3.3 PREPARO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA	17
3.4 MANIPULAÇÃO DE PROTEÍNA	17
3.4.1 Superexpressão e purificação de proteínas	18
3.4.2 Eletroforese de proteínas sob condições desnaturantes (SDS-PAGE)	18
3.4.3 Dosagem de proteína.....	19
3.5 CARACTERIZAÇÃO PROTÉICA.....	19
3.5.1 Determinação de atividade de β -glucosidase pelo método de p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNPG).....	19
3.5.2 Determinação da temperatura de melting da β -glucosidase	20
3.5.3 Determinação da função da β -glucosidase em <i>Azospirillum brasilense</i>	21
3.5.4 Esterilização e germinação das sementes de trigo	21
3.5.5 Ensaio da ação da β -glucosidase em raízes de trigo	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1 β -GLUCOSIDASE DE <i>Azospirillum brasilense</i> Sp245	23
4.2 PURIFICAÇÃO DA β -GLUCOSIDASE.....	23
4.3 CARACTERIZAÇÃO DA β -GLUCOSIDASE	24
4.3.1 Ensaio de atividade enzimática com pNPG.....	24

4.3.2 Ensaio para determinação da temperatura de desnaturação da enzima	30
4.3.3 Ensaio para possível ação da Bglid2 de <i>A. brasilense</i> em raízes de planta	31
5 CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS	36

1 INTRODUÇÃO

1.1 Celulase

Celulose é o principal biopolímero constituinte das plantas e o polissacarídeo mais abundante na Terra (BAYER, 1998), estima-se que 100 bilhões de toneladas de carbono são fixadas por fotossíntese ao ano, metade disso como celulose (RYU, 1980). Portanto, há um grande interesse industrial em utilizar parte de tamanha biomassa como uma fonte renovável de energia, podendo as enzimas capazes de degradar celulose (celulases) ser de grande valia para esse processo.

Celulases são enzimas do tipo glicosil-hidrolases, que são capazes de hidrolisar ligações glicosídicas em carboidratos, de acordo com a nomenclatura da *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB), as glicosil-hidrolases são classificadas como EC 3.2.1.x. (HENRISSAT, 1991). Celulases hidrolisam a celulose, um homopolímero formado por unidades de D-glicose $\beta(1,4)$ ligadas. Apesar de todas as celulases clivarem o mesmo tipo de ligação em um substrato quimicamente simples, a grande quantidade de padrões de ligação intermoleculares da celulose cria um substrato cristalino que é particularmente resistente à degradação, tornando necessário um sistema múltiplo de enzimas para degradar eficientemente a celulose (BAYER, 1998).

Celulase é uma família constituída por, pelo menos, 3 grupos de enzimas: endo-(1,4)- β -D-glucanase (EG, EC 3.2.1.4); exo-(1,4)- β -D-glucanase ou celobiohidrolase (CBH, EC 3.2.1.91) e β -glucosidases (BGL, EC 3.2.1.21). (COUGHLAN e LJUNGDAHL, 1988). As EGs agem hidrolisando as ligações O-glicosídicas na região amorfa da celulose, originando oligossacarídeos de cadeias diferentes e novas pontas livres nas fibras. As CBHs degradam a celulose a partir dessas novas pontas livres, gerando celobiose, um dissacarídeo. Existem dois tipos de CBHs, a CBH I que cliva terminais redutores da celulose, e a CBH II que age nos terminais não-redutores. As BGLs terminam o processo, hidrolisando as celobioses formadas, produzindo glicose. (KUHAD et al., 2011). As três enzimas agem sinergicamente, tendo uma melhor atividade quando usadas conjuntamente (MIETTINEN-OINONEN, 2005), sendo a β -glucosidase, frequentemente, um fator

limitante na hidrólise enzimática da celulose (FANG, 2010), devido ao efeito inibitório da celobiose nas EGs e CBHs.

1.2 β -Glucosidase

As β -glucosidases formam um grupo altamente heterogêneo de enzimas hidrolíticas, que catalizam a quebra das ligações β -glicosídicas de alquil- e aril- β -D-glucosídeos (metil- β -D-glucosídeo e p-nitrofenil- β -D-glucosídeo) e também de glucosídeos que contêm apenas monômeros de carboidratos (celobiose)(SINGH, 1995). Possuem dois tipos de classificação, a primeira é baseada na especificidade do substrato, que classifica a enzima em três grupos: aril- β -glucosidases (possuem grande afinidade por aril- β -glucosídeos), celobiasas (hidrolizam apenas oligossacarídeos) e as capazes de hidrolizar tanto aril- β -glucosídeos e oligossacarídeos, este último grupo é o mais comum em microorganismos celulolíticos. A segunda classificação é baseada na homologia de sequências, divide as BGLs em duas subfamílias: BGA (β -glucosidases e phospho- β -glucosidases de bactérias a mamíferos) e BGB (β -glucosidases de leveduras, bolor e bactérias do rúmen) (SINGH, 1995)(FANG, 2010). A segunda classificação é a mais aceita atualmente, por conseguir relacionar características estruturais, relações evolucionárias e mecanismo catalítico destas enzimas (BHATIA et al., 2002).

1.3 Aplicações industriais

Celulase é a terceira enzima mais usada na indústria, em volume de dinheiro, tendo potencial para ser a primeira, se etanol, butanol e outros produtos da fermentação dos açúcares, produzidos por enzimas a partir da biomassa, se transformarem no principal tipo de combustível para veículos (WILSON, 2009).

Na indústria têxtil, antigamente, para o processo de remoção de cor, usava-se o choque mecânico com as pedras-pomes durante as etapas de lavagens, para conseguir quebrar as fibras celulósicas e assim liberar o corante ali presente. Atualmente, utilizam as celulases nesse processo de remoção de cor, substituindo a

etapa com as pedras-pomes, o que gera um resultado melhor, por diminuir o dano as fibras, aumentar a produtividade e ser menos trabalhoso (KUHAD et al., 2011). No processo de biopolimento dos tecidos, também se usa as celulases, para eliminar as microfibrilas superficiais da fibra de algodão recém produzidas, obtendo um produto mais liso, macio e brilhoso (MIETTINEN-OINONEN, 2005). Na indústria cervejeira, glucanases microbiais são utilizadas nas etapas de trituração ou fermentação para hidrolizar glucanas presentes no mosto, porque estes compostos formam géis, dificultando a filtração e ocasionando um produto final mais túrgido, de menor qualidade. Assim, o uso da β -glucanases gera uma redução na viscosidade do mosto e uma melhora na filtração da cerveja. Na indústria vinícola também se usam pectinases, β -glucanases e hemicelulases para facilitar a etapa de maceração da casca da uva, de clarificação e filtração do mostro, o que resulta em uma melhor qualidade e estabilidade do vinho (GALANTE et al., 1998).

Quanto a indústria do bioetanol, a sacarificação enzimática do material lignocelulósico por celulase para produção de biocombustível é, possivelmente, a aplicação mais investigada. Ela depende inicialmente do pré-tratamento do material, geralmente por explosão a vapor (MCMILLAN, 1994), que consiste em submeter o material a alta pressão e temperatura (de 160 a 260°C) e repentinamente diminuir a pressão até o nível atmosférico, ocasionando o fenômeno da explosão das fibras. Esse processo degrada a hemicelulose e transforma a lignina, permitindo um melhor acesso das celulases as fibras, possibilitando a hidrólise da celulose e a formação de moléculas que podem ser metabolizadas a etanol, produzindo o biocombustível. (CHENG e SUN, 2001). A hidrólise do material lignocelulósico pode ser feita por métodos enzimáticos ou químicos, o uso de enzimas é preferível à quebra ácida ou alcalina por ter um custo menor, sendo a reação conduzida em condições amenas (pH 4 a 6, temperatura de 40 a 50°C) e não haver problemas de corrosão (KUHAD, 2011).

Celulases possuem ainda diversas utilidades em várias outras indústrias, na produção de alimentos podem ser usadas: na extração de suco de frutas e óleo de sementes; na clarificação de sucos; na remoção da casca externa da soja para produção de comidas baseadas na fermentação da soja; na extração de agar de algas; na gelatinização de algas para melhorar a digestão; na melhora da re-hidratação de vegetais secos ou misturas de sopa; na remoção da parede celular

para facilitar a liberação de sabores, enzimas, polissacarídeos e proteínas (COUGHLAN, 1985)(MANDELS, 1985). Na indústria de ração animal, as celulases podem ser usadas: na suplementação da ração para ruminantes e animais monogástricos; no pré-tratamento do material lignocelulósico e descasque de grão de cereais para melhorar a digestão em ruminantes e animais monogástricos (MANDELS, 1985). Além disso, genes de celulase podem ser clonados para produzir animais transgênicos que conseguiriam secretar as celulases necessárias em seu trato gastrointestinal para digerir a forragem eficientemente (BÉGUIN & AUBERT, 1993). Na indústria do papel, celulases são utilizadas para: obtenção biomecânica da polpa de madeira de árvores; biomodificar as propriedades das fibras resultando em uma melhor drenagem nas fábricas de papel, aumentando a produtividade (DIENES et al., 2004). Celulases aliadas a xilanases também são usadas na reciclagem do papel, removendo a tinta de impressão da superfície da fibra por hidrólise parcial das moléculas de carboidratos (KUHAD et al., 2010).

Visto a diversidade de uso industrial das celulases e a demanda atual que continua a crescer, o presente estudo visa investigar uma β -glucosidase de *Azospirillum brasilense* e tentar descobrir se essa enzima apresentaria características interessantes que favoreceriam seu uso em algum processo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Expressar, purificar e caracterizar a celulase presente no plasmídeo pMS_CelB obtido no trabalho de Scarduelli (2014).

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Expressar e purificar a celulase presente no plasmídeo pMS_Cel B;
- Caracterizar a enzima obtida quanto as diversas variáveis, como pH, temperatura, salinidade;
- Tentar inferir se a enzima de *Azospirillum brasilense* obtida apresentaria algum papel na colonização da bactéria nas raízes das plantas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MEIOS DE CULTIVO E ANTIBIÓTICOS

Os meios de cultivo empregados para o crescimento da estirpe de *E. coli*, estão descritos abaixo. Foram preparados segundo SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS (1989) e esterilizados em autoclave a 120°C por 20 minutos antes do uso.

Meio Luria Bertani (LB): Triptona 10 g/L; Extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L. Pela adição de 15 g/L de ágar ao meio LB, foi produzido o meio LA.

Meio SOB: Triptona 20 g/L; Extrato de levedura 5 g/L; NaCl 0,584 g/L; KCl 0,186 g/L

Meio SOC: Triptona 20 g/L; Extrato de levedura 5 g/L; NaCl 0,6 g/L; KCl 0,19 g/L; MgCl₂ 0,94 g/L; MgSO₄ 1,2 g/L ; Glucose 3,6 g/L

O antibiótico empregado para cultivo, manutenção e seleção das estirpes de *E. coli* foi: Canamicina 100 µg/ml (Km100).

3.2 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

A estirpe de bactéria e o plasmídeo usado neste trabalho estão descritos na tabela 1 e 2 respectivamente.

Tabela 1: Estirpe de bactéria usada neste trabalho

Estirpe de bactéria	Característica	Referência
<i>Escherichia coli</i> BL21 (λDE3)	hsdS _B , gal(λclts 857 ind 1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1)	SAMBROOK et al., 1989

Tabela 2: Plasmídeo usado neste trabalho

Plasmídeo	Característica	Referência
pMS_CelB	Km ^r , gene AZOBR_p140078 clonado em pET28a (com mutações em L138P e N437D)	SCARDUELLI, 2014

3.3 PREPARO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

A estirpe BL21 (λ DE3) de *E. coli* utilizada para transformação foi cultivada em 200 ml de meio SOB até atingir uma D.O₆₀₀ entre 0,6 e 0,8. Logo em seguida, a suspensão de células foi incubada em banho de gelo por 30 minutos. As células foram coletadas por centrifugação em tubos tipo Falcon de 50 ml a 5.000 rpm por 5 minutos a 4°C em centrífuga Eppendorf 5804R empregando o rotor de ângulo fixo, também Eppendorf, modelo F 34-6-38. O precipitado de células foi lavado 3 vezes com glicerol 10% gelado e suspenso em 1 mL da mesma solução.

A eletrotransformação foi realizada com alíquotas de 100 μ L de células eletrocompetentes utilizando-se 1 μ L de DNA do plasmídeo contendo o gene de interesse. A mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm (BioRad) já resfriada e colocada na câmara de eletroporação. As células sofreram um choque elétrico de 1,8 kV utilizando o eletroporador GenePulser II (BioRad). Às células transformadas de *E. coli* foram adicionados 900 μ L de meio SOC. Transferiu-se a solução para um frasco de 10 mL estéril e incubou-se por 40 minutos em agitação a 180 rpm a 37°C. Após o tempo de recuperação, as amostras foram plaqueadas em meio sólido LA contendo o Km 100. As placas foram incubadas na estufa à 37°C.

3.4 MANIPULAÇÃO DE PROTEÍNA

3.4.1 Superexpressão e purificação de proteínas

A purificação da β -glucosidase foi realizada com células de *E. coli* da estirpe BL21 (λ DE3) contendo o plasmídeo pMS_CelB. As colônias transformantes foram inoculadas em 10 mL de LB com Km100 e incubadas durante a noite a 37°C. Esse pré-inóculo foi transferido para um erlenmeyer de 2L contendo 800 mL de LB e Km100, sendo incubado em um agitador rotatório a 180 rpm e 37°C até atingir absorbância a 600 nm entre 0,5 a 0,7. Logo depois foram adicionados 260 μ L de IPTG 1M, incubando a 3 horas em 37°C. As culturas foram centrifugadas, após a incubação, a 5.000 rpm por 10 minutos a 4°C e as células ressuspensas em 15 mL de tampão Fosfato (100 mM de fosfato de sódio pH 7), sendo lisadas em um sonicador por 15 ciclos de 15 segundos com 15 segundos de intervalo, com o tubo sempre em gelo. O extrato bruto obtido foi centrifugado por 30 minutos, a 30.000g e 4°C. Passou-se o sobrenadante coletado em coluna HiTrap Chelating-Ni²⁺ (GE Healthcare) de 1 ml conectada a uma bomba peristáltica, já carregada com NiCl₂, como pede o fabricante. Depois, a eluição realizou-se com gradiente descontínuo de imidazol, sendo o tampão composto por 100 mM tampão Fosfato de sódio, 100 mM de KCl e concentrações crescentes de imidazol (10, 50, 100, 300 e 500mM). Utilizou-se na eluição 5 mL para cada tampão. Foram coletadas, no processo, frações de 1,5 mL que foram analisadas em eletroforese SDS-PAGE, com um volume aplicado de 10 μ L. As frações que possuíam a proteína de interesse com maior grau de pureza foram unidas, submetidas à diálise (tampão de diálise: 100 mM tampão Fosfato de sódio; 100 mM de KCl e 10% v/v de glicerol), aliquotadas e armazenadas no freezer.

3.4.2 Eletroforese de proteínas sob condições desnaturantes (SDS-PAGE)

A eletroforese de proteínas sob condições desnaturantes, que contém SDS foi realizada em gel de poliacrilamida como descrito por LAEMMLI (1970). O gel utilizado apresentava uma concentração de 10%. As eletroforeses foram realizadas em sistema vertical seguindo as recomendações do fabricante das cubas de eletroforese (sistema MiniProtean, Biorad). As corridas foram realizadas a 180V, em

tampão de corrida 1X por 1 hora. O gel foi corado com solução de Comassie Blue por trinta minutos, seguido de descoloração com solução descorante até conseguir se visualizar as bandas protéicas.

3.4.3 Dosagem de proteína

A proteína obtida foi quantificada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), usando o Reagente de Bradford da Sigma. A reação foi preparada em microplaca de 96 poços, sendo utilizada 1 μ L de amostra, 19 μ L de água ultrapura e 180 μ L de reagente. Para obtenção da curva padrão se usou albumina de soro bovino. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas, em 595 nm.

3.5 CARACTERIZAÇÃO PROTÉICA

3.5.1 Determinação de atividade de β -glucosidase pelo método de p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNPG)

β -glucosidases conseguem hidrolizar as ligações glicosídicas β 1,4 de substratos solúveis como o p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo. No caso desse substrato, a quebra da ligação glicosídica forma o paranitrofenol que apresenta coloração amarela. O teste do pNPG permite quantificar quanto de p-nitrofenol é formado durante a reação, medindo a absorbância. O teste de pNPG utilizado neste trabalho foi adaptado do método de Zhang (ZHANG, 2009) para microplaca de 96 poços. Todos os ensaios tiveram 1 μ g de enzima, 1 mM de pNPG, período de incubação de 15 minutos, volume total de 90 μ L e sendo utilizados 100 μ L de tampão de glicina 0,4M pH10.8 para parar a reação. Todos os ensaios também tiveram a leitura da absorbância feita em leitor de microplacas a 415 nm. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de β -glucosidase necessária para liberar 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto nas condições do experimento. Atividade específica foi definida como U/mg de proteína.

Para o ensaio de pH, foram utilizados os tampões: Acetato de Amônio no pH 4, 5, 9 e 10; Acetato de Sódio no pH 4 e 5; Fosfato de Sódio, pH 6, 7 e 8; Tris-HCL, pH 7, 8 e 9; Carbonato de Sódio pH 9, 10, 11; Bis-Tris, pH 6 e 7 e HEPES pH 7 e 8. Todos os tampões a 100mM. A temperatura de incubação foi de 37°C.

Para o ensaio de temperatura, foi utilizado o tampão de fosfato de sódio 100mM pH 7. As reações foram incubadas em temperaturas diferentes (30°C, 37°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 75°C e 80°C).

Para o ensaio do efeito de íons na proteína foram utilizados o tampão fosfato de sódio 100mM pH 7, os sais CaCl_2 , MgCl_2 , CuSO_4 , o composto EDTA nas concentrações de 1mM e também BSA 0,1%, em reações separadas, para tentar visualizar se haveria mudança na atividade.

Para o ensaio de termoestabilidade utilizou-se tampão fosfato de sódio 100mM pH 7. Antes de ser adicionada à reação a enzima foi incubada por 30 minutos em diferentes temperaturas (0°, 30°, 35°, 40°, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C e 80°C) e depois se seguiu o ensaio padrão.

No ensaio de halotolerância foi utilizado o tampão fosfato de sódio 100mM pH 8, com variação na concentração de NaCl nas reações (0M, 0.5M, 1M, 2M, 3M, 5M e 6M).

Para o ensaio do efeito da concentração de pNPG foi utilizado tampão fosfato de sódio 100mM pH 7. Diferentes concentrações de pNPG foram utilizadas nas reações a partir da solução base de pNPG 20mM. O ensaio foi realizado a 37°C e 15 minutos. As constantes cinéticas foram calculadas por regressão não-linear usando o software GraphPad Prism 6.

3.5.2 Determinação da temperatura de melting da β -glucosidase

Para os ensaios de determinação da temperatura de melting foi utilizado tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7. A β -glucosidase foi utilizada em uma concentração final de 28 μM . O corante Sypro Orange da Invitrogen foi utilizado em uma concentração final de 10x (diluído 500X). As amostras foram preparadas em placas

de 96 poços, a fluorescência foi medida a cada aumento na temperatura de 0,3°C na faixa de 25 a 99°C no equipamento Step One Plus RT-PCR da Life Technologies e os dados analisados no software Step One v.2.0. A temperatura de melting (T_m) foi determinada como o ponto mais baixo da primeira derivada das curvas de melting, correspondendo à metade da fluorescência máxima da amostra.

3.5.3 Determinação da função da β -glucosidase em *Azospirillum brasilense*

Azospirillum brasilense é uma bactéria promotora de crescimento vegetal, o intuito deste ensaio é testar se a β -glucosidase achada em seu genoma altera a estrutura da parede celular das raízes vegetais, o que facilitaria a fixação desta bactéria na planta.

3.5.4 Esterilização e germinação das sementes de trigo

As sementes de trigo CD104 foram imersas em etanol 70% por 30 segundos sob agitação (100rpm). Em seguida, foram agitadas em solução de hipoclorito acidificado por cinco minutos e então lavadas quatro vezes em água estéril por um minuto cada, sob agitação. Após a lavagem, as sementes ficaram imersas por quatro horas em água estéril e então agitadas, novamente, em solução de hipoclorito acidificado por cinco minutos. Três novas lavagens de um minuto foram feitas em água estéril. As sementes foram então deixadas por cinco minutos em peróxido de hidrogênio (80 volumes) e lavadas quatro vezes em água estéril por um minuto cada. As sementes foram imersas por quatro horas em água estéril e então colocadas para germinar em placa de agar/água.

3.5.5 Ensaio da ação da β -glucosidase em raízes de trigo

A raiz do trigo germinado foi destacada e imersa, em um eppendorf de 1,5 ml, em tampão fosfato de sódio 100mM pH 8 contendo a enzima β -glucosidase, sendo a

reação incubada a 37°C por 48h. As raízes tratadas foram então fixadas para serem analisadas por microscopia eletrônica de varredura.

Para a microscopia eletrônica de varredura, após fixação em Karnovisky (paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M pH 7.2 a 4°C) (KARNOSVISKY, 1965). O material foi desidratado em série alcoólica crescente e acetona, sendo o ponto crítico obtido em um Bal-Tec CPD – 030 com gás carbônico. Em seguida ocorreu a metalização em ouro obtida em um Balzers SCD – 030. As análises e a documentação do material foram feitas no microscópio eletrônico de varredura JEOL-JSM 6360 LV do Centro de Microscopia Eletrônica – Universidade Federal do Paraná.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 β -GLUCOSIDASE DE *Azospirillum brasilense* Sp245

Neste trabalho foi utilizado o plasmídeo pMS_CelB, produzido por Scarduelli (2014), que contém o gene AZOBR_p140078 codificante de uma β -glucosidase da família GH1 da glicosil-hidrolases. Scarduelli isolou esse gene da estirpe Sp245 de *Azospirillum brasilense* descrita no trabalho de WISNIEWSKI-DYÉ e colaboradores (2011) e clonou no vetor de expressão pET28a, obtendo uma proteína de 55 kDa, com 482 aminoácidos. Assim, foi escolhida essa enzima para ser estudada neste projeto pois ainda não tinham conseguido obter atividade dela. A enzima foi denominada Bglid2.

4.2 PURIFICAÇÃO DA β -GLUCOSIDASE

A proteína Bglid2 foi expressa a partir do vetor pET28a em *E. coli* BL21 em 800 ml de meio LB e induzida por IPTG durante 3 horas a 37°C. As células foram coletadas por centrifugação e sonicadas como descrito no Material e Métodos. O extrato obtido foi purificado por cromatografia de afinidade em coluna HiTrap™ Chelating.

A figura 1 mostra o perfil eletroforético das amostras obtidas na purificação, a proteína com 55kDa foi eluída na concentração de 300 mM. As alíquotas com maior grau de pureza foram coletadas, unidas, dializadas e armazenadas a -20°C.

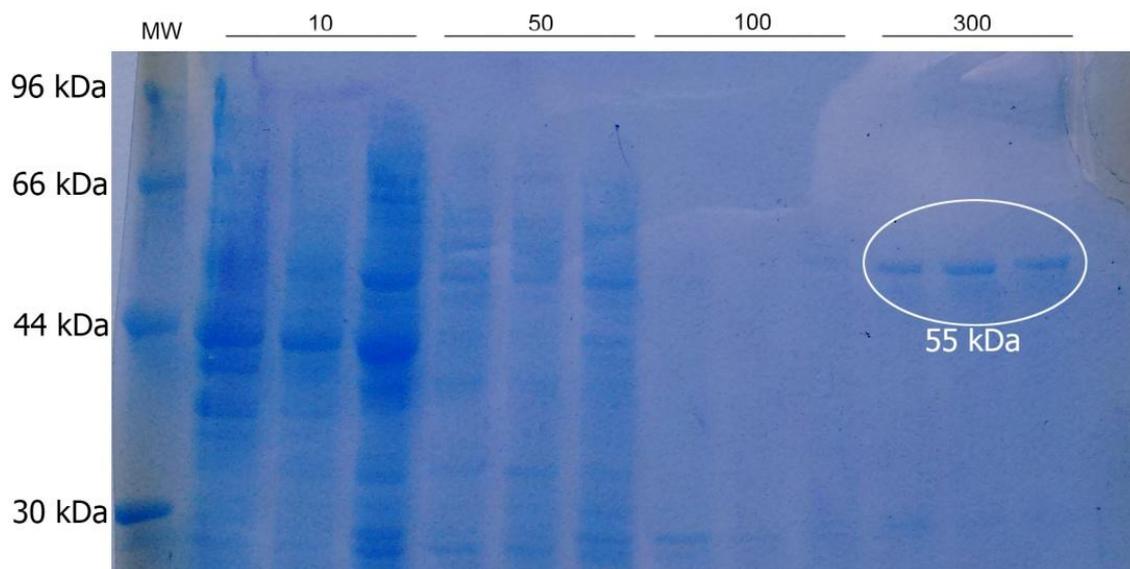


FIGURA 1 - Padrão eletroforético da purificação da Bglid2 mostrando as proteínas eluídas em diferentes concentrações de imizadol: 10mM, 50mM, 100mM, 300mM e 500mM. As frações com 500mM ficaram em outro gel que não apresentou nenhuma banda.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA β -GLUCOSIDASE

4.3.1 Ensaio de atividade enzimática com pNPG

β -glucosidases conseguem quebrar a ligação glicosídica β 1,4 presente no p-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (pNPG), liberando glucose e p-nitrofenol no meio. O p-nitrofenol apresenta coloração amarela, enquanto que o pNPG é incolor, sendo possível quantificar por absorvância a quantidade de p-nitrofenol liberado e determinar a atividade da enzima ao se comparar o resultado com uma curva padrão de p-nitrofenol.

Para caracterizar a Bglid2, desejávamos descobrir quais eram as melhores condições que a enzima funcionava. Para isso testamos a β -glucosidase do pH 4 ao 11 e conforme a figura 2 mostra, a enzima apresentou uma boa atividade relativa do pH 7 ao 9, tendo a máxima atividade no pH 8. *A.brasilense* e outras bactérias fixadoras de nitrogênio são pouco resistentes a acidez (SIQUEIRA & FRANCO, 1988), era de se esperar que as enzimas produzidas por elas apresentassem a mesma característica, funcionando melhor em um pH neutro a levemente básico. Segundo o database BRENDA, somente duas BGL microbiais já foram

caracterizadas com atividade ótima em pH igual ou maior a 8, sendo uma da bactéria *Bacillus halodurans* (NAZ et al., 2010) e outra do fungo *Rhizomucor miehei* (YOSHIOKA & HAYASHIDA, 1980).

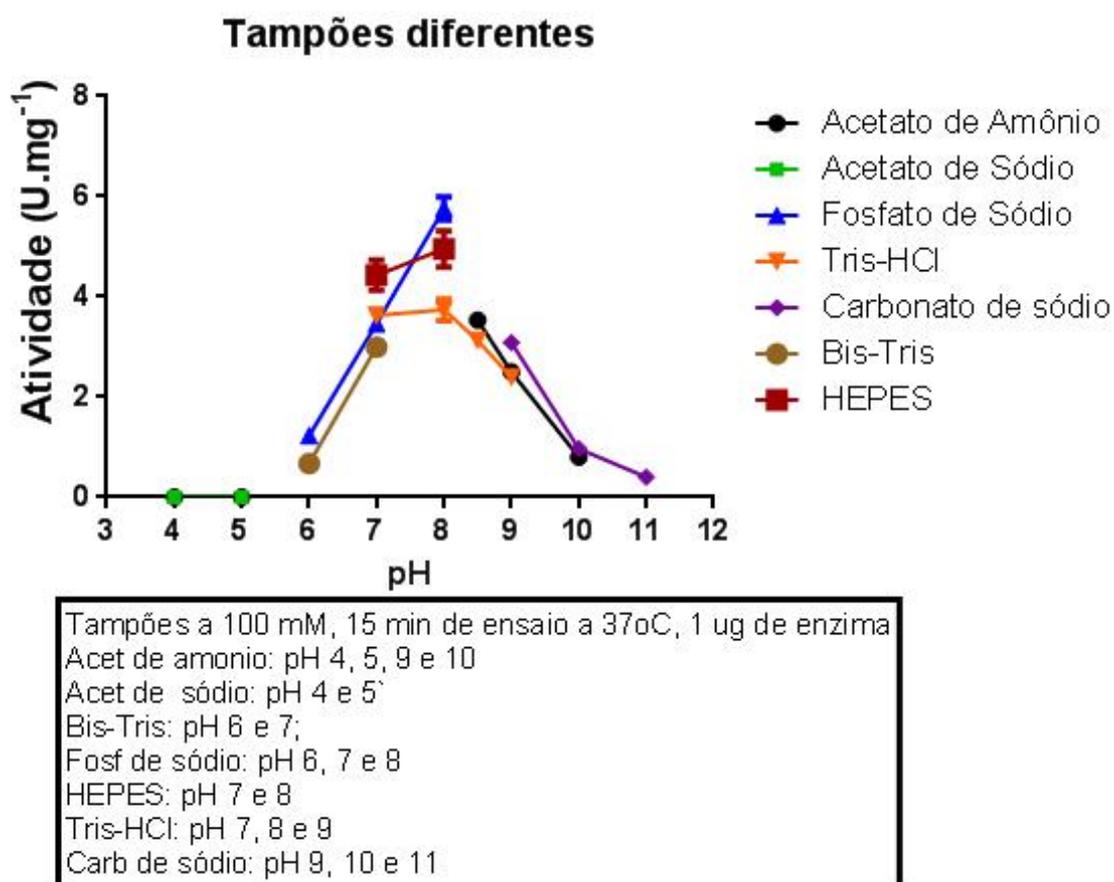


FIGURA 2 - Ensaio de pH usando pNPG como substrato e a enzima B-glucosidase. Realizado em triplicata.

Para descobrir o efeito da temperatura na atividade da Bglid2 foram feitos dois ensaios, no primeiro incubamos a reação em diversas temperaturas (30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 75 e 80°C) para descobrir em qual a enzima apresentava-se mais ativa. Conforme mostra a figura 3, a enzima teve a maior atividade em 55°C. No segundo ensaio, antes de adicionar a enzima na reação, incubamos ela em diversas temperaturas (30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 e 80°C) por 30 minutos, 0°C serviu de controle e depois fizemos a reação, que foi mantida a 37°C. Com isso tivemos o intuito de determinar a termoestabilidade de enzima. Na figura 4, notamos que a atividade da enzima foi maior quando saiu do gelo para a reação, e começou a declinar bastante entre 50 a 55°C, já tendo perdido toda a atividade em 60°C, por estar desnaturada, isso nos mostra a fraca termoestabilidade da Bglid2. Quanto

maior a temperatura do meio, mais energia a enzima recebe, aumentando a atividade até o ponto em que ela desnatura e não consegue mais se ligar ao substrato. No primeiro ensaio a Bglid2 teve maior atividade em 55°C e no segundo a 55°C a enzima já estava em parte desnaturada, isso foi devido ao fato do substrato proteger a enzima da desnaturação.

A Bglid2 se encaixa no espectro das BGL bacterianas, que exibem, na maioria dos casos, temperatura ótima para atividade entre 40-55°C. (KIM et al., 2007; FENG et al., 2009; FANG et al., 2010; MICHLMAYR et al., 2010; NAZ et al., 2010).

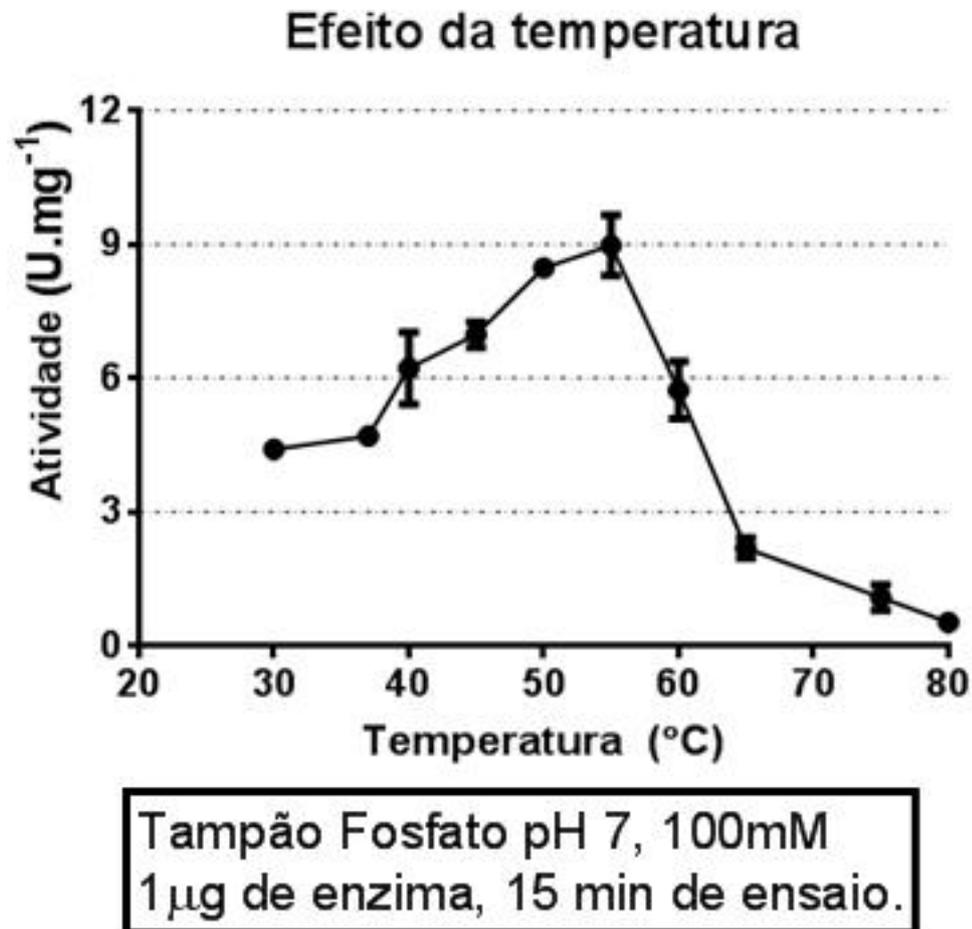
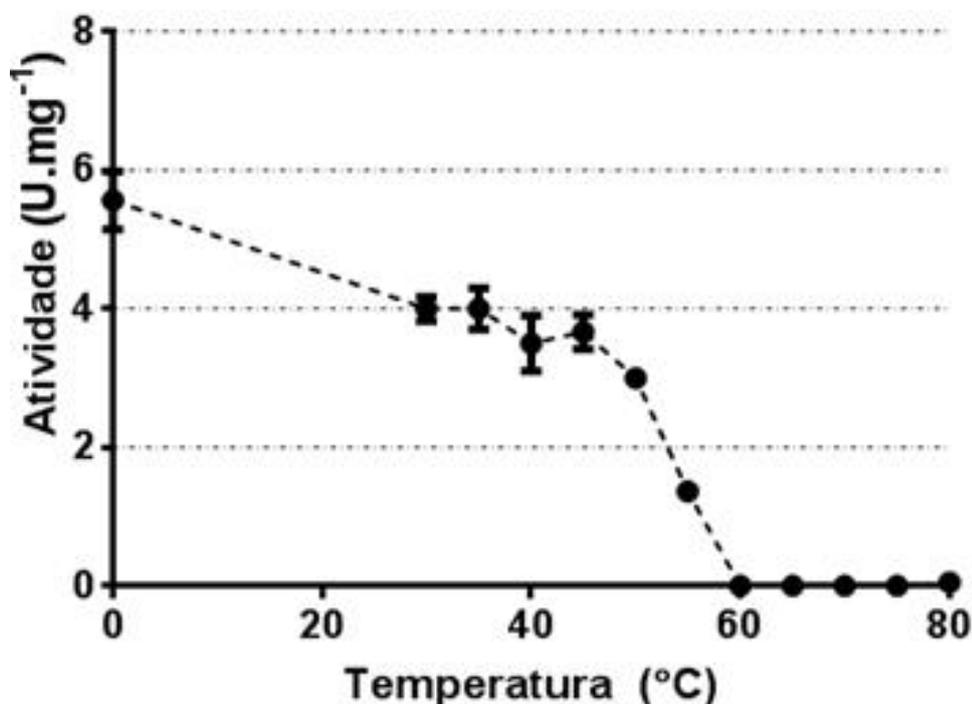


FIGURA 3 - Ensaio do efeito da temperatura na atividade da Bglid2, pNPG usado como substrato. Experimento realizado em duplicata.

Termoestabilidade



Incubação por 30min na temperature de teste (eixo x), depois ensaio padrão (Tp Fosfato 100mM pH7, 15 min a 37°C com 1 mM de pNPG e 1µg de enzima).

FIGURA 4 - Ensaio de termoestabilidade da Bglid2, pNPG usado como substrato. Experimento realizado em triplicata.

Para testar se a Bglid2 precisava de algum co-fator para funcionar usamos os íons com carga +2 que são mais comumente ligados a ativação de enzimas, na concentração de 1mM (Ca^{+2} , Mg^{+2} e Cu^{+2}), também usamos 1mM de EDTA para constatar se a Bglid2 era uma metaloproteína, se fosse, o EDTA iria quelar o íon metálico presente na enzima e esta apresentaria uma atividade diminuída ou nula. Testamos se BSA 0,1% teria algum efeito na enzima, porque YANG & WYMAN (2006) demonstraram que essa proteína poderia aumentar a atividade de celulasas, principalmente de β -glucosidasas. Nenhuma diferença significativa foi vista na atividade da enzima, conforme pode se ver na figura 5. Parece que a β -glucosidase estudada não precisa de co-fatores e nem apresenta algum tipo de íon metálico em sua conformação.

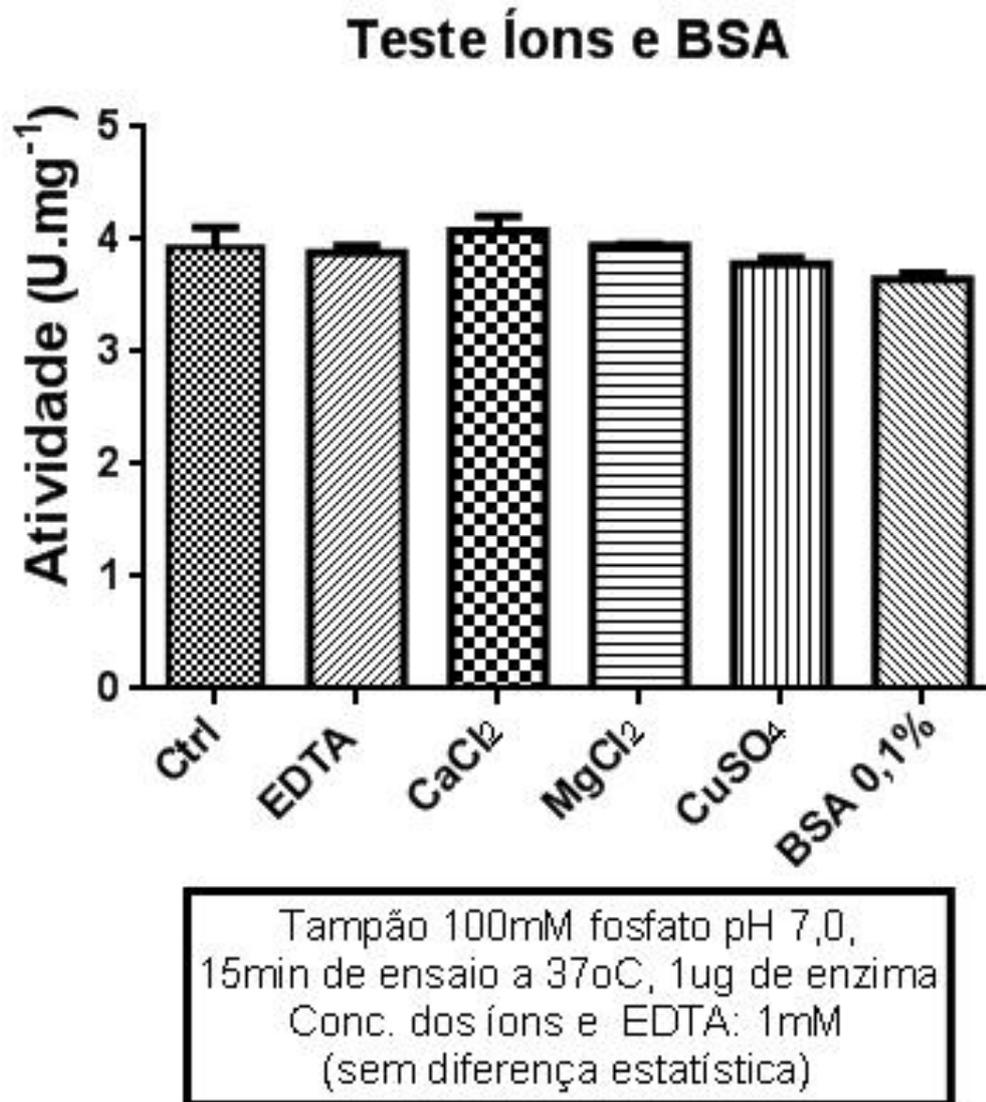


FIGURA 5 - Ensaio de íons, EDTA e BSA, pNPG usado como substrato. Experimento realizado em triplicata.

Foi realizado um ensaio de halotolerância para descobrir como a enzima se comportava em determinados níveis de sal. Utilizou-se várias concentrações de NaCl (0, 0.5, 1, 2, 3, 5 e 6 M). Foi observado (figura 6) que concentrações de até 1M de NaCl não diminuíam muito a atividade da Bglid2, em 2M a enzima ainda apresentava 67% da atividade e em 3M 55%. Esses dados permitem nos dizer que a β -glucosidase estudada apresenta uma boa tolerância ao sal, sendo, inclusive, mais tolerante do que uma β -glucosidase proveniente de uma bactéria de águas marinhas, que em 500mM de NaCl já havia perdido 86% da atividade (FANG et al., 2010).

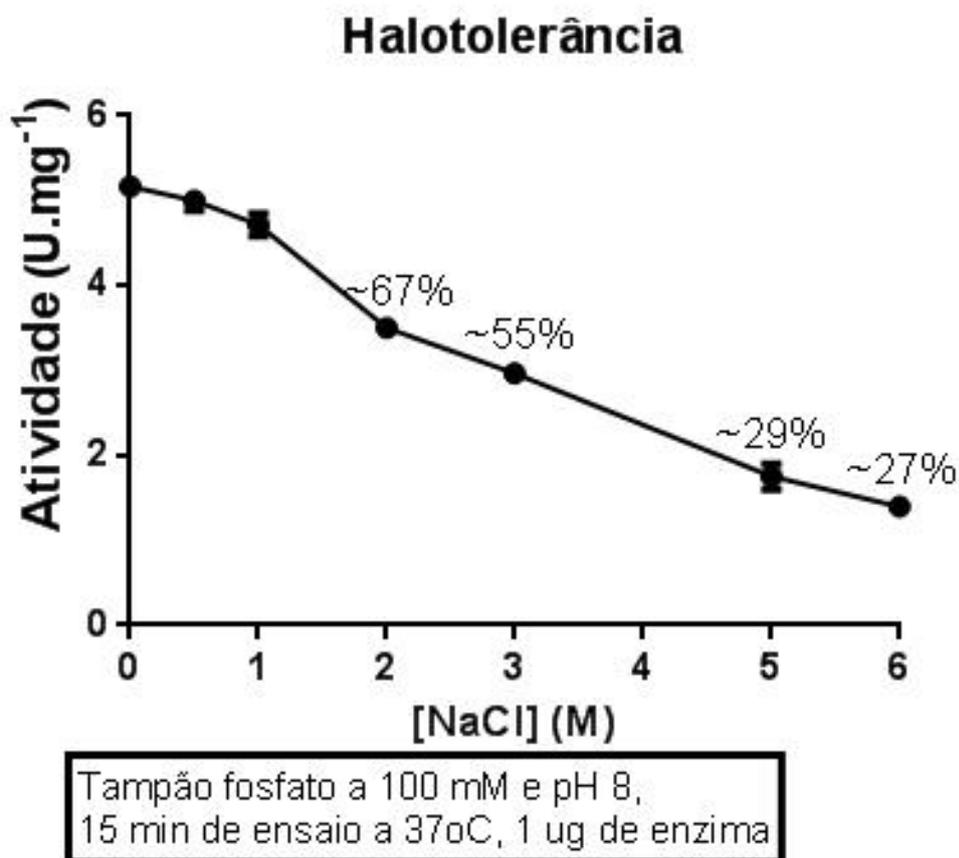
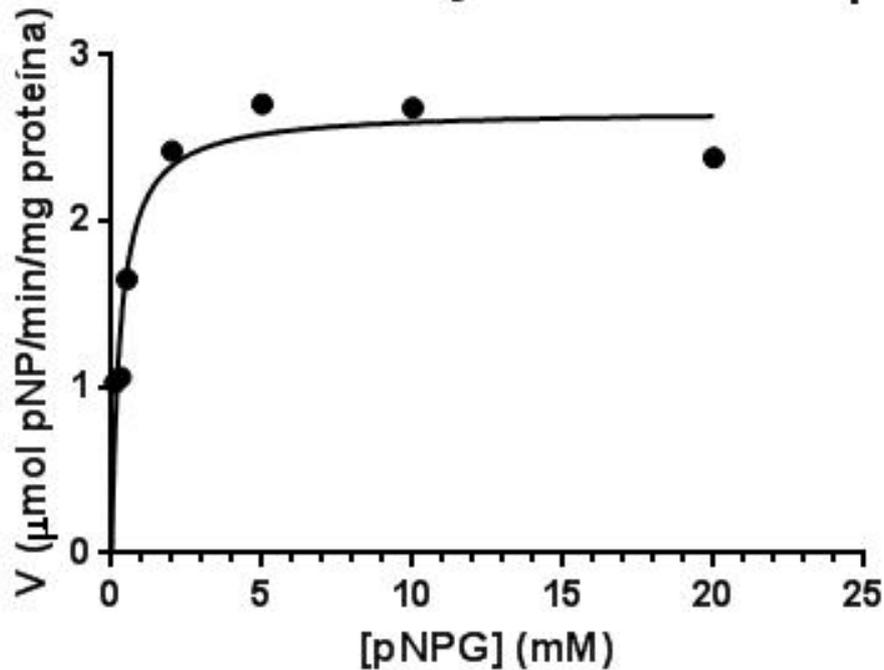


FIGURA 6 - Ensaio de halotolerância da Bglid2, pNPG usado como substrato. Experimento realizado em duplicata.

Foi testado o efeito da concentração de pNPG na atividade da enzima, para comprovar que nos ensaios feitos, baseados no protocolo de ZHANG (2009), usando o substrato na concentração de 1mM, estavam ocorrendo uma catálise significativa, para isso calculamos a constante cinética K_m que é caracterizada como a concentração de substrato na qual metade dos sítios ativos estão ligados (BERG et al., 2002). A condição da reação foi escolhida como pH 7 e 37°C, pois foi nessa que a maioria dos ensaios foram feitos. Conforme a figura 7 mostra, a concentração de 1mM de substrato encontra-se perto do platô de saturação, o K_m da reação foi de 0,2901 mM, então pode-se afirmar que nos ensaios realizados a maioria dos sítios ativos estão ligados ao substrato. Também se notou na concentração mais elevada de pNPG (20mM) a ocorrência de certa inibição enzimática, o que já havia sido observado por alguns autores (CHRISTAKOPOULOS et al., 1994; CAI et al., 1998; YAN et al., 1998; WALLECHA & MISHRA, 2003).

Efeito da concentração do substrato pNPG



Tampão Fosfato 100mM, pH 7
15 mins de ensaio a 37°C, 1 μg de enzima

Figura 7 – Ensaio do efeito da concentração do substrato pNPG sobre a atividade enzimática da BGL estudada. Experimento realizado em triplicata.

4.3.2 Ensaio para determinação da temperatura de desnaturação da enzima

Por ensaios com pNPG determinamos que a 60°C a Bglid2 já se encontrava totalmente desnaturada e que entre 50°C a 60°C ocorria a desnaturação da proteína. Usamos o corante fluorescente Sypro Orange da Invitrogen para determinar com maior exatidão a temperatura de desnaturação da enzima estudada. O corante funciona parecido como uma sonda, ele se liga as regiões hidrofóbicas da proteína que vão sendo expostas conforme ocorre o desenovelamento e emite fluorescência. Conforme a proteína se desenovela, a fluorescência aumenta e é captada pelo aparelho (NIESEN et al., 2007). A T_M é a temperatura de desnaturação e se caracteriza como a temperatura em que as concentrações de proteína enovelada e desenovelada são iguais, a fluorescência emitida é a metade de seu valor máximo. O programa de análise de dados do equipamento usado fornece um gráfico de

primeira derivada da fluorescência que permite visualizar a T_M facilmente, por esta ser o ponto mais baixo da curva. (NIESEN et al., 2007). A figura 8 mostra o resultado obtido para a Bglid2, a T_M foi de 58,7°C, o que está de acordo com o resultados obtidos pelo teste de termoestabilidade com pNPG.

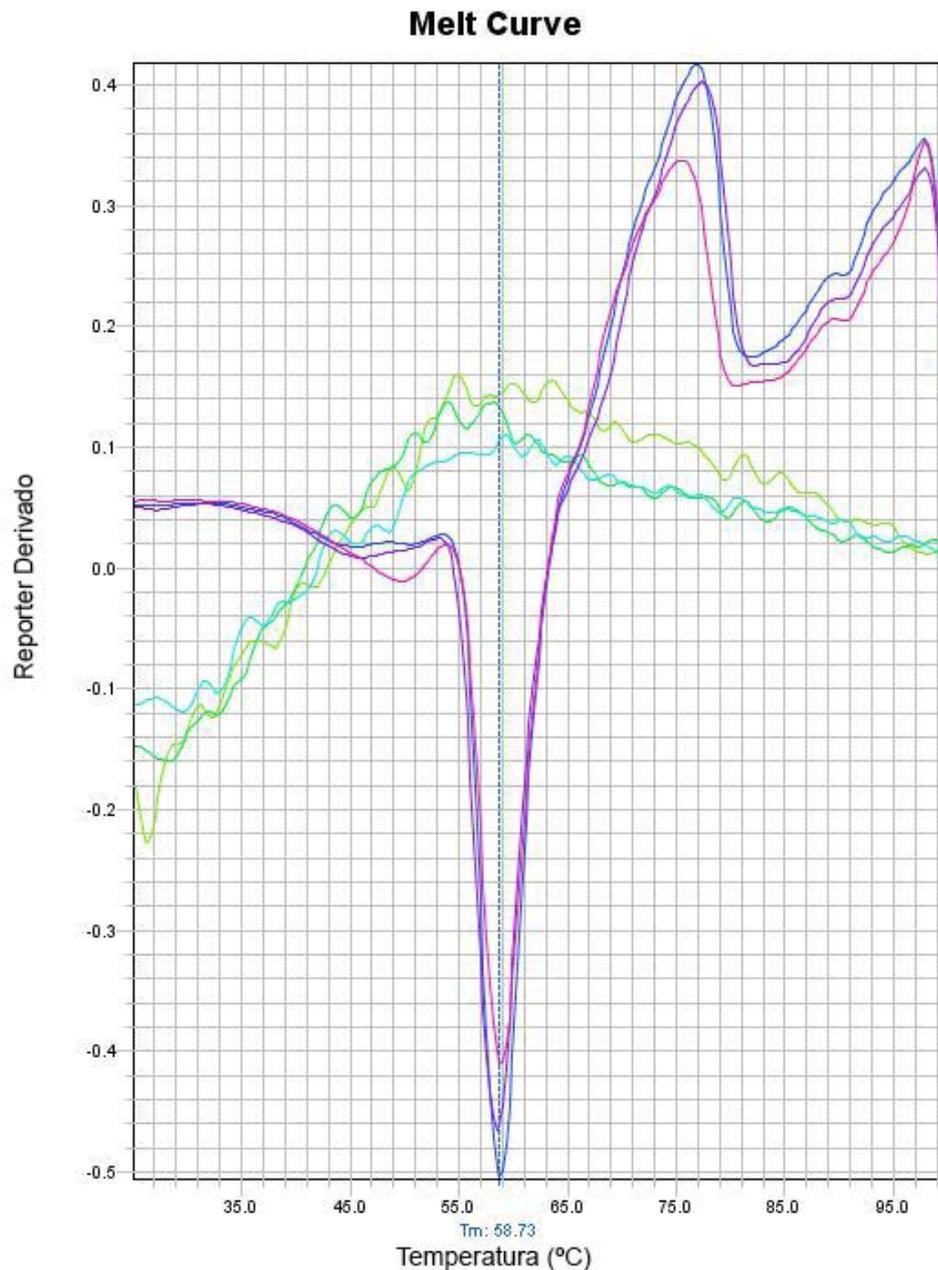


FIGURA 8 - Ensaio de temperatura de desnaturação da Bglid2. As curvas azul, rosa e roxa são a triplicata da enzima. As curvas verdes são o controle. FONTE: O autor (2015).

4.3.3 Ensaio para possível ação da Bglid2 de *A. brasilense* em raízes de planta

Ainda não se conhece como ocorre a invasão de *A. brasilense* Sp245 na planta, mas se acredita que essa colonização seja por degradação enzimática (pectinolítica e celulótica) (MEHDIPOUR-MOGHADDAM et al., 2010). Tentamos testar se a Bglid2 possui algum papel na colonização ao tratar raízes de trigo CD104 com a enzima e ver por microscopia eletrônica de varredura se havia alguma mudança na estrutura do tecido das raízes. Incubamos, por 48 horas a 37°C, uma raiz em enzima e tampão fosfato 100mM pH 8 e outra só em tampão, como controle. Conforme pode se notar nas figuras 9; 10; 11; 12 e 13, não parece que a β -glucosidase provocou alguma alteração na estrutura da raiz, a coifa, a zona pilífera parecem estar iguais entre raízes. Com a microscopia eletrônica de varredura não foi possível afirmar que a enzima exerce algum papel na colonização de *A. brasilense* Sp245, mas também não é possível afirmar que ela não exerce. Endoglucanase, exoglucanase e β -glucosidases agem sinergicamente para degradar a celulose, WISNIEWSKI-DYE et al. (2011) mostrou que no genoma de *A. brasilense* Sp245 existem genes para essas celulasas e também para hemicelulasas, é plausível que a bactéria necessite de todas essas enzimas para a degradação enzimática da raiz, não sendo só uma responsável por todo o processo.

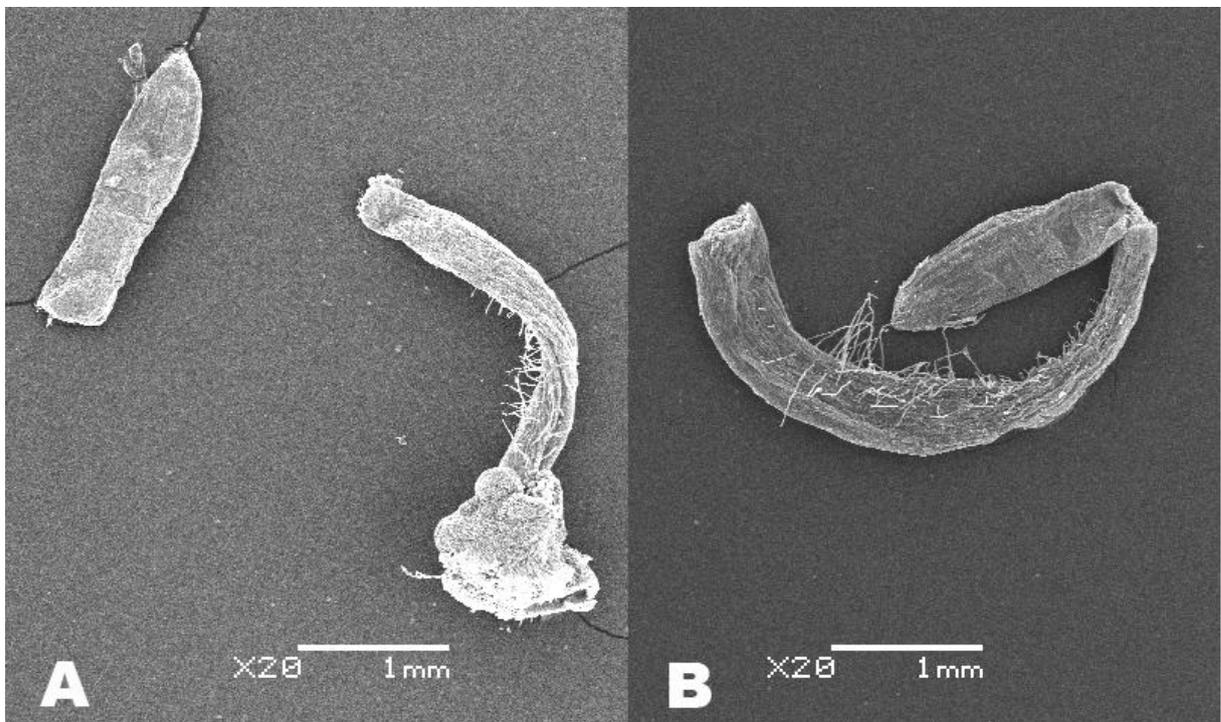


Figura 9 – Microscopia eletrônica de varredura, aumento x20. Raiz A: controle, raiz B: tratada β -glucosidase.

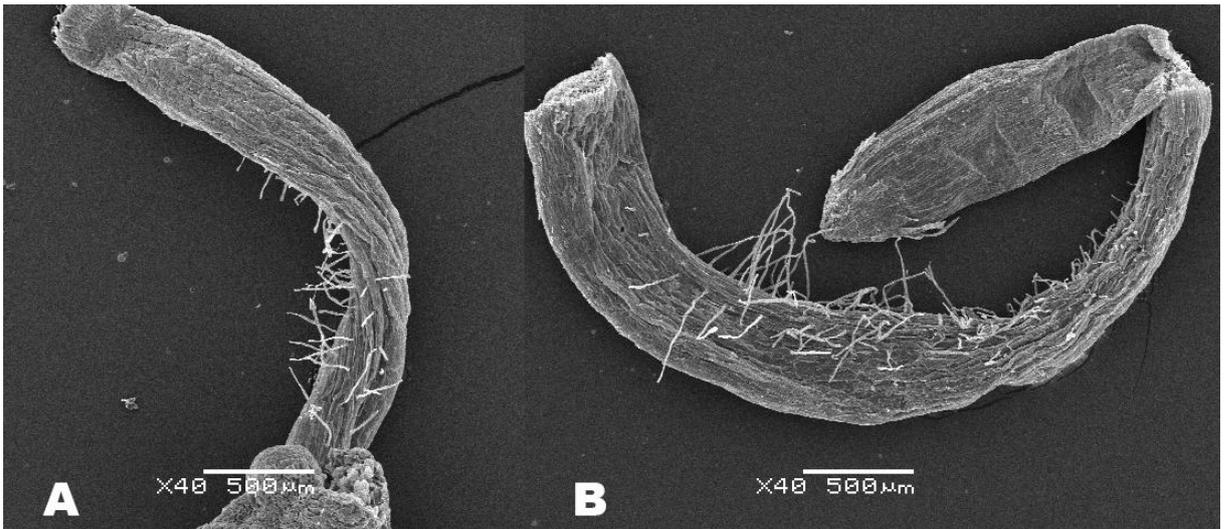


Figura 10 - Microscopia eletrônica de varredura, aumento x40. Raiz A: controle, raiz B: tratada com β -glucosidase.

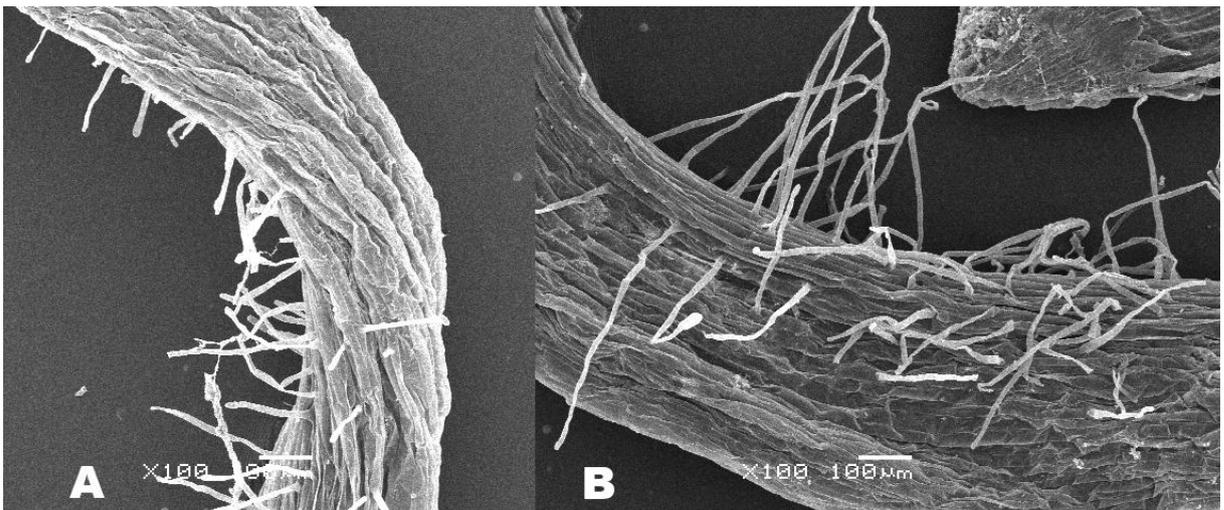


Figura 11 - Microscopia eletrônica de varredura, aumento x100. Raiz A: controle, raiz B: tratada com β -glucosidase.

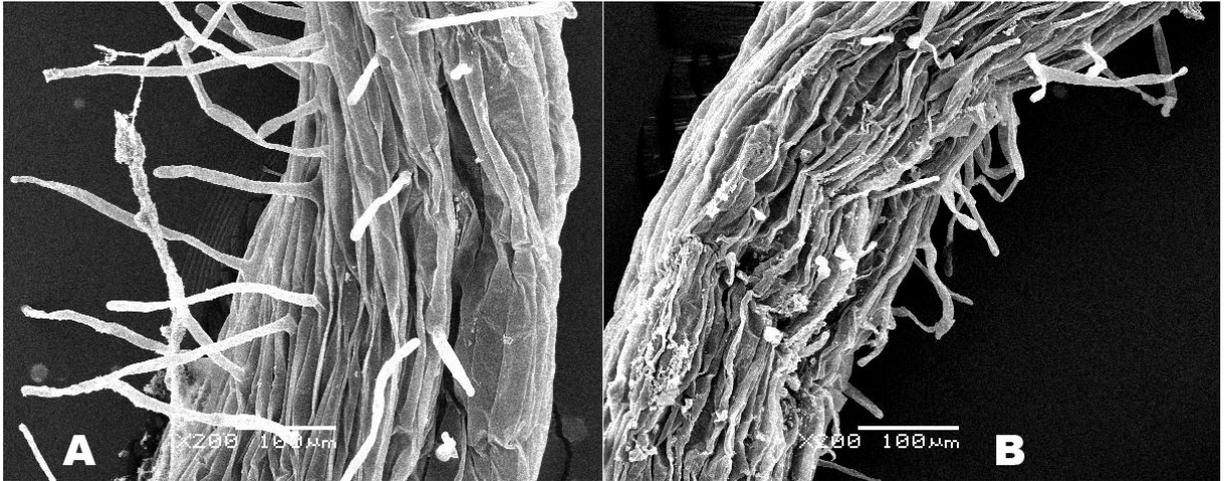


Figura 12 - Microscopia eletrônica de varredura, aumento x200. Raiz A: controle, raiz B: tratada com β -glucosidase.

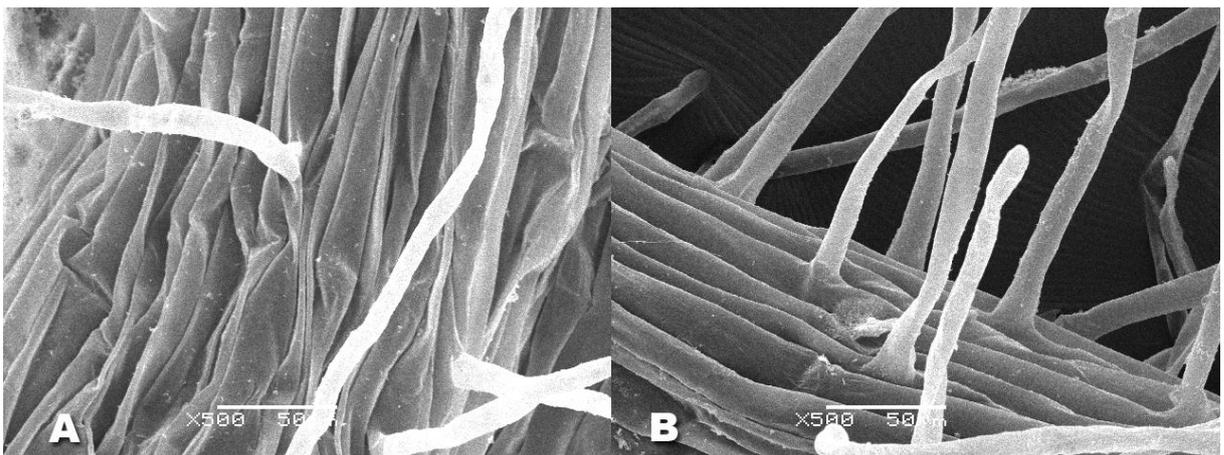


Figura 13 - Microscopia eletrônica de varredura, aumento x500. Raiz A: controle, raiz B: tratada com β -glucosidase.

5 CONCLUSÃO

Foi possível, usando o método de cromatografia de afinidade, purificar a β -glucosidase. A Bglid2 teve uma atividade baixa se comparada a β -glucosidases de fungos, mas ficou ativa em uma ampla faixa temperatura, com o pH 8 com sendo o ideal. A enzima demonstrou ser pouco termoestável, com a temperatura de desnaturação de 58,7°C, mas pareceu ser bastante halotolerante. A bglid2 também não aparentou precisar de um co-fator para exercer atividade e não possui um íon metálico em sua estrutura. A enzima não causou nenhuma alteração na estrutura do tecido da raiz, não sendo possível relacioná-la com o processo de colonização *do A. brasilense* na planta.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 29, p. 719-739, 2005.
- BAYER, E. A.; CHANZY, H.; LAMED, R.; YUVAL, S. Cellulose, cellulases and cellulosomes. **Current Opinion in Structural Biology**, v.8, issue 5, p. 548-557, 1998.
- BÉGUIN, P.; AUBERT, J.P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Reviews**, vol.13, p. 25-58, 1993.
- BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. The Michaelis-Menten Model Accounts for the Kinetic Properties of Many Enzymes. In: **Biochemistry**. 5th ed. New York: W.H Freeman, 2002. p. 212- 220.
- BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 15, p. 583-620, 1997.
- BHATIA, Y.; MISHIRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial β -glucosidases: cloning, properties and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, Philadelphia, v. 22, p. 375-407, 2002.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilization: the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p. 248-254, 1976.
- BUSTO, M. D.; ORTEGA, N.; PEREZ-MATEOS, M. Induction of β -glucosidase in fungal and soil bacterial cultures. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 27, p. 949-954, 1995.
- CAI, Y.J.; BUSWELL, J.A.; CHANG, S. T. β -Glucosidase components of the cellulolytic system of the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.22, p. 122-129, 1998.
- CHENG, J., SUN, Y. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1-11, 2001.
- CHRISTAKOPOULOS, P.; GOODENOUGH, P.W.; KEKOS, D.; MACRIS, B.J.; CLAEYSSSENS, M.; BHAT, M.K. Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase with transglycosylation and exo-glucosidase activities from *Fusarium oxysporum*. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v.224, p. 379-385, 1994.
- COUGHLAN, M. P. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. In: **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, Vol 3, Interscience, Newcastle-upon-Tyne, p. 39-109, 1985.
- COUGHLAN, M. P.; LJUNGDAHL, L. G. Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme system. In: AUBERT, J. P.; BEGUIN, P.; MILLET, J. **Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation**, p. 11-30, 1988.

COULON, S.; CHEMARDIN, P.; GUEGUEN, Y.; ARNAUD, A.; GALZY, P. Purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from *Lactobacillus casei* ATCC 393. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 74, p. 105-114, 1998.

DAROIT, D. J. **Caracterização de uma beta-glicosidase de *Monascus purpureus***. Porto Alegre, 2007. Tese de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

DIENES, D.; EGYHÁZI, A.; RÉCZEY, K. Treatment of recycled fiber with *Trichoderma* cellulases. **Industrial Crops and Products**, v. 20, No. 1, p. 11–21, 2004.

DÖBEREINER, J; BALDANI, V.L.D; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. EMBRAPA-SPI: Itaguaí, RJ: EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60p.

FANG, Z.; FANG, W.; LIU, J.; HONG, Y.; PENG, H.; ZHANG, X.; SUN, B.; XIAO, Y. Cloning and Characterization of a β -Glucosidase from Marine Microbial Metagenome with Excellent Glucose Tolerance. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20. P. 1351-1358, 2010.

FENG, Y.; DUAN, C.; LIU, L.; TANG, J.; FENG, J. Properties of a metagenome-derived β -glucosidase from the contents of rabbit cecum. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. v.73, No 7, p.1470-1473. 2009.

GALANTE, Y.M.; DE CONTI, A.; MONTEVERDI, R. Application of *Trichoderma* enzymes in food and feed industries. In: HARMAN, G.F.; KUBICEK, C.P. **Trichoderma & Gliocladium – enzymes, biological control and commercial applications**. V. 2, Londres: Taylor & Francis, p. 327-342, 1998.

HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochem. J.**, v. 280, p. 309-316, 1991.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **J Cell. Biol.** 27: 137-138. 1965

KIM, S.; CHANG-MUK, L.; MIN-YOUNG, KIM.; YUN-SOO, Y.; SANG-HONG, Y.; HAN-CHEOL, K.; BON-SUNG, K. Screening and Characterization of an Enzyme with β -glucosidase activity from Environmental DNA. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.17, p.905-912, 2007.

KUHAD, R.C.; MEHTA, G.; GUPTA, R.; SHARMA, K.K. Fed batch enzymatic saccharification of newspaper cellulose improves the sugar content in the hydrolysates and eventually the ethanol fermentation by *Saccharomyces Cerevisiae*. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, No. 8, p. 1189-1194, 2010.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. **Enzyme Research**, 2011, 280696.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T7. **Nature**. v. 227, p. 680-685, 1970.

LIU, D.; ZHANG, R.; YANG, X.; ZHANG, Z.; SONG, S.; MIAO, Y.; SHEN, Q. Characterization of a thermostable β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X33. **Microb Cell Factories**. 2012; 11:25.

MANDELS, M. Applications of cellulases. **Biochemical Society Transactions**, vol 13, No. 2, p. 414- 416, 1985.

MAVINGUI, P., ZHULIN, I. B. *Azospirillum* genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments. **Plos genetics**, v. 7, 2011.

MCMILLAN, J.D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: HIMMEL, M.E., BAKER, J.O., OVEREND, R.P. **Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production**. American Chemical Society, p. 292–324, 1994.

MEHDIPOUR-MOGHADDAM, M. J.; GITI, E.; BOUZARI, M.; MOSTAJERAN, A.; SALEHI, Z. Novel phytase and cellulase activities in endophytic *azospirilla*. **World App. Sci. J.**, v. 10, p. 1129-1135, 2010.

MICHLMAYR, H. SCHUMANN, C.; DA SILVA, N.M.B.B.; KULBE, K.D.; DEL HIERRO, A.M. Isolation and basic characterization of a β -glucosidase from a strain of *Lactobacillus brevis* isolated from a malolactic start culture. **Journal of Applied Microbiology**. v.108, No 2, p.550-559. 2010.

MIETTINEN-OINONEN, A. PALOHEIMO, M.; LANTTO, R.; SUOMINEN, P. Enhanced production of cellobiohydrolases in *Trichoderma reesei* and evaluation of the new preparations in biofinishing of cotton. **J. of Biotech.**, v. 116 (3), p. 305-317, 2005.

NAZ, S.; IKRAM, N.; RAJOKA, M.I.; SADAF, S.; AKHTAR, M.W. Enhanced production and characterization of a beta-glucosidase from *Bacillus halodurans* expressed in *Escherichia coli*. **Biochemistry (Moscow)**. v.74, No 4, p.513-525. 2010.

NIESEN, F; BERGLUND, H.; VEDADI, M. The use of differential scanning calorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. **Nature protocols**, v.2, n.9, p. 2212-2221, 2007.

PANG, H., ZHANG, P., DUAN, C., MO, X., TANG, J., FENG, J. Identification of cellulase genes from the metagenomes of compost soils and functional characterization of one novel endoglucanase. **Curr. Microbiol.**, v. 58, p. 404–408, 2009.

RYU, D. D. Y.; MANDELS, M. Cellulases: biosynthesis and applications. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 2, p. 91-102, 1980.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed. **Cold Spring Harbor**, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press., 1989.

SCARDUELLI, M. **Identificação e clonagem de genes de celulases e hemicelulases de *Azospirillum brasilense***. Curitiba, 2014. Tese de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica. Universidade Federal do Paraná.

SINGH, A.; HAYASHI, K. Construction of Chimeric β -Glucosidases with Improved Enzymatic Properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, No. 37, p. 21928-21933, 1995.

SIQUEIRA, J.O., FRANCO, A.A. **Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas**. Brasília: MEC Ministério da Educação, ABEAS, Lavras: ESAL, FAEPE, 1988. 236p.

SUKUMARAN, R.K; SINGHANIA, R.R; PANDEY, A. Microbial Cellulases - production, applications and challenges. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 64, No. 11, p. 832- 844, 2005.

TIWARI, P.; MISRA, B.N.; SANGWAN, N.S. β -Glucosidases from the fungus *Trichoderma*: an efficient cellulase machinery in biotechnological applications. **Biomed Res Int**, vol. 2013, 10 pages, 2013.

WALLECHA, A.; MISHRA, S. Purification and characterization of two β -glucosidases from a thermo-tolerant yeast *Pichia etchellsii*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1649, p.74-84, 2003.

WILSON, D. B. Cellulases and biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, issue 3, p. 295-299, 2009.

WISNIEWSKI-DYE, F., BORZIAK, K., KHALSA-MOYERS, G., ALEXANDRE, G., SUKHARNIKOV, L. O., WUICHET, K., HURST, G. B., MCDONALD, W. H., ROBERTSON, J. S., BARBE, V., CALTEAU, A., ROUY, Z., MANGENOT, S., PRIGENT-COMBARET, C., NORMAND, P., BOYER, M. L., SIGUIER, P., DESSAUX, Y., ELMERICH, C., CONDEMINE, G., KRISHNEN, G., KENNEDY, I., PATERSON, A. H., GONZALEZ, V., MAVINGUI, P., ZHULIN, I. B. *Azospirillum* genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments. **Plos genetics**, v. 7, 2011.

WITHERS, S. G. Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 44, p. 325-337, 2001.

YAN, T.R.; LIAU, J.C. Synthesis of cello-oligosaccharides from cellobiose with β -glucosidase II from *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v.20, p.591-594, 1998.

YOSHIOKA, H.; HAYASHIDA, S. Production and purification of thermostable beta-glucosidase from *Mucor miehei* YH-10. **Journal of Agricultural and Biological Chemistry**. v. 44, No 12, p.2817-2824. 1980.

ZHANG, Y.H., LYND, L.R. A functionally based model for hydrolysis of cellulose by fungal cellulase. **Biotech. Bioeng.**, v. 94, n. 5, p. 888–898, 2006.

ZHANG, Y.H.; HONG, J.; YE, X. Cellulase Assays. **Biofuels Methods in Molecular Biology**, v. 581, p. 213-231, 2009.