



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
MESTRADO EM BIOQUÍMICA**

**ROBÉRIO MEDEIROS DO NASCIMENTO**

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UMA  $\beta$ -D-  
GLICOSIDASE DE *Artemia franciscana* COM AÇÃO SOBRE  
CELOBIOSE E LACTOSE.**

**NATAL/RN  
2008**

**ROBÉRIO MEDEIROS DO NASCIMENTO**

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UMA  $\beta$ -D-GLICOSIDASE DE *Artemia franciscana* COM AÇÃO SOBRE CELOBIOSE E LACTOSE.**

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Luiz Roberto Diz de Abreu.

**NATAL/RN  
2008**

Divisão de Serviços Técnicos  
Catalogação da Publicação na Fonte / Biblioteca Central Zila Mamede

Nascimento, Robério Medeiros do.

Purificação e caracterização parcial de uma  $\beta$ -D glicosidade de *Artemia franciscana* com ação sobre celobiose e lactose / Robério Medeiros do Nascimento. – Natal, 2008.

82 p. : il.

Orientador: Luiz Roberto Diz de Abreu.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Mestrado em Bioquímica.

1. Glicosidasas – Dissertação. 2. Invertebrados – Dissertação. 3. Celulose – Dissertação. 4. Bioetanol – Dissertação. 5. Lactose – Dissertação. I. Abreu, Luiz Roberto Diz de. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BCZM

CDU 577.15

Dedico este trabalho a minha família, em especial aos meus pais e a todos que sempre, com carinho, dedicação e muita paciência souberam me orientar, apoiar e incentivar em cada momento da minha vida acadêmica.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, aquele cuja sabedoria é infinita, de beleza incomparável, capaz de inspirar a toda criação a render-lhe louvor, minha eterna gratidão por proporcionar-me este momento.

A minha família, por ter me dado à base e a segurança que todos nós precisamos, apoiando-me em todos os sentidos de minha vida, seja ela profissional ou pessoal.

Aos meus pais Raimundo Manoel do Nascimento e Irene Medeiros do Nascimento e irmãos Solange Maria do Nascimento e Ednaldo do Nascimento por terem me apoiado e incentivado em todos os momentos de minha vida.

A minha noiva Daniele que está comigo em todos os momentos, sempre me incentivando.

Ao meu orientador, Luiz Roberto Diz de Abreu, pelas sugestões, apoio e incentivo.

Ao professor Hugo Alexandre Rocha, da banca de qualificação, um exemplo profissional. Obrigado pelos ensinamentos, contribuição a este trabalho e pelas importantes sugestões durante a qualificação.

À professora Luciana Duarte, da banca de qualificação, pelos ensinamentos, contribuição a este trabalho e pelas importantes sugestões durante a qualificação.

Ao professor Maurício Pereira Sales, por toda contribuição a este trabalho.

Ao professor Dr. Carlos Roberto Félix pela doação da celobiose.

Aos demais professores do Departamento de Bioquímica da UFRN, pelos conhecimentos transmitidos durante a minha vida acadêmica.

Aos amigos de laboratório Edilson Gomes, Djair, Ádila Lorena, Pablo Castro, Roberta, Nerivaldo, Marcelo, Adriana, Jan, Leandro, Duda e a Norberto pelo respeito, sinceridade e ajuda na realização de experimentos.

Aos funcionários do Departamento: Margarita, Marcos, Creuza, Itamar,  
Jonas e a Eliene.

A todos que contribuíram de alguma forma na realização deste trabalho.

A UFRN e agências financiadoras CAPES e CNPq.

*“Quanto mais aumenta nosso conhecimento,  
mais evidente fica nossa ignorância” .*

John Kennedy

## RESUMO

$\beta$ -D-glicosidase (EC 3.2.1.21) é uma das mais interessantes glicosidases, especialmente por hidrolisar celobiose liberando glicose, último passo de degradação de celulose. Esta função faz com que a  $\beta$ -D-glicosidase seja de grande interesse como um versátil biocatalizador industrial, sendo crítica para vários processos de bio-tratamento / biorrefinaria, como produção de bioetanol. Neste trabalho, uma  $\beta$ -D-glicosidase extraída de extratos protéicos do invertebrado marinho *Artemia franciscana* foi purificada e caracterizada com uma combinação de precipitação com sulfato de amônio (30; 50; 80%), a fração saturada na faixa de 50% (chamada F-II) foi aplicada em uma cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-200, as frações correspondentes ao primeiro pico de atividade da  $\beta$ -D-glicosidase foram reunidas e aplicadas numa cromatografia de troca iônica em Mono Q; o terceiro pico protéico obtido nessa cromatografia, o qual coincide com o pico de atividade da  $\beta$ -D-glicosidase, foi reunido e aplicado numa cromatografia gel filtração Superose 12 onde o primeiro pico protéico, o qual possui atividade da  $\beta$ -D-glicosidase, foi recromatografado em Superose 12. Esta enzima provavelmente é multimerica, constituída por três subunidades, de massa molecular de 52,7 kDa (determinado por SDS-PAGE) e com massa molecular nativa de 157 kDa (determinado por cromatografia gel filtração em Superose 12 sob o sistema FPLC). A enzima foi purificada 44,09 vezes com uma recuperação de 1,01%. Utilizando-se  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo como substrato obtivemos uma  $K_m$  aparente de 0,229 mM (12,7  $\mu$ M de produto/cm/hora) e  $V_{m\acute{a}x}$  de 1,109 mM.60min<sup>-1</sup>.mL<sup>-1</sup>. O pH ótimo e a temperatura ótima de catálise do substrato sintético foram 5,0 e 45°C, respectivamente. A atividade  $\beta$ -D-glicosidásica foi fortemente inibida por nitrato de prata e N-etilmaleimida, esta inibição indica o envolvimento de radicais sulfidríla na hidrólise do substrato sintético. A  $\beta$ -D-glicosidase de *Artemia franciscana* apresentou ação degradativa sobre celobiose, lactose e sobre o substrato sintético  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo, indicando potencial uso desta enzima na indústria principalmente para produção de bioetanol (produção de álcool a parti de celulose) e produção de leite hidrolisado (leite destituído de lactose).

Palavras-chave: Glicosidases, invertebrados, celulose, bioetanol e lactose.



## ABSTRACT

$\beta$ -D-glucosidase (EC 3.2.1.21) is one of the most interesting glycosidases, especially for hydrolysis cellobiose releasing glucose, is last step degradation of cellulose. This function makes the  $\beta$ -D-glucosidase is of great interest as a versatile industrial biocatalyst, being critical to various bio-treatment / biorefinery processes, such as bioethanol production. Hen in the report, a  $\beta$ -D-glucosidase was extracts from protein extracted of the invertebrate marine *Artemia franciscana* was purified and characterized with a combination of precipitation with ammonium sulfate (0 - 30%, 30 to 50%, 50 to 80%), the fraction saturated in the range of 30 to 50% (called F-II) was applied in a molecular exclusion chromatography, in Sephacryl S-200, the fractions corresponding to the first peak of activity of  $\beta$ -D-glucosidase were gathered and applied in a chromatography of ion exchange in Mono Q; the third peak this protein obtained chromatography, which coincides with the peak of activity of  $\beta$ -D-glucosidase was held and applied in a gel filtration chromatography Superose 12 where the first peak protein, which has activity of  $\beta$ -D-glucosidase was rechromatography on Superose 12. This enzyme is probably multimerica, consisting of three subunit molecular mass of 52.7 kDa (determined by SDS-PAGE) with native molecular mass of 157 kDa (determined by gel filtration chromatography on Superose 12 under the system FPLC). The enzyme was purified 44.09 times with a recovery of 1.01%. Using up *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopiranoside as substrate obtained a  $K_m$  apparent of 0.229 mM and a  $V_{max}$  of 1.109 mM.60min<sup>-1</sup>.mL<sup>-1</sup>mM. The optimum pH and optimum temperature of catalysis of the synthetic substrate were 5.0 and 45 °C, respectively. The activity of the  $\beta$ -D-glucosidase was strongly, inhibited by silver nitrate and N- etylmaleimide, this inhibition indicates the involvement of radical sulfidrila the hydrolysis of synthetic substrate. The  $\beta$ -D-glucosidase of *Artemia franciscana* presented degradativa action on celobiose, lactose and on the synthetic substrate *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopiranoside indicating potential use of this enzyme in the industry mainly for the production of bioethanol (production of alcohol from the participating cellulose), and production hydrolysate milk (devoid of milk lactose).

Keywords: Glucosidases, invertebrate, cellulose, bioethanol e lactose.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01: <i>Artemia franciscana</i> .....	28
FIGURA 02: Atividades específicas das frações enzimáticas de <i>Artemia franciscana</i> .....	45
FIGURA 03: Perfil de eluição de F-II em cromatografia de exclusão molecular – Sephacryl S-200.....	46
FIGURA 04: Perfil de eluição da $\beta$ -D-glicosidase em cromatografia de troca iônica MONO Q.....	48
FIGURA 05: Perfil de eluição da $\beta$ -D-glicosidase em cromatografia de exclusão molecular - Superose 12.....	49
FIGURA 06: Recromatografia da $\beta$ -D-glicosidase em cromatografia de exclusão molecular (Superose 12).....	50
FIGURA 07: Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS da $\beta$ -D-glicosidase.....	52
FIGURA 08: Cromatografia de exclusão molecular Superose 12 (Calibrada)..	53
FIGURA 09: (A)Efeito da concentração de substrato sobre a velocidade da reação enzimática; (B) Gráfico do duplo recíproco de Hanes (1932).....	55
FIGURA 10: Efeito do tempo na hidrólise do $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo	56
FIGURA 11: Influência da temperatura sobre a atividade catalítica da $\beta$ -D-glicosidase.....	57
FIGURA 12: Efeito da temperatura sobre a estabilidade térmica da $\beta$ -D-glicosidase.....	58

FIGURA 13: Influência do pH na hidrólise do $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo.....	59
FIGURA 14: Cromatograma descendente em papel dos ensaio de degradação de celobiose e lactose pela $\beta$ -D-glicosidase.....	63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Famílias de glicosidases que possuem atividade $\beta$ -D-glicosidásica.....	22
Tabela 02: Etapas de purificação da $\beta$ -D-glicosidase.....	51
Tabela 03: Efeito de diferentes sais sobre a atividade $\beta$ -D-glicosidase.....	60
Tabela 04: Efeito de inibidores enzimáticos.....	61
Tabela 05: Efeito de diferentes carboidratos sobre a atividade $\beta$ -D-glicosidase.....	62
Tabela 06: Atividade da $\beta$ -D-glicosidase de <i>Artemia franciscana</i> sobre celobiose e lactose em cromatografia de papel.....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b><math>\beta</math>-GLI</b>	$\beta$ -D-glicosidase
<b><math>^{\circ}</math>C</b>	Graus Celsius
<b>cm</b>	Centímetros
<b>F-I</b>	Extrato protéico precipitado com 0-30% de sulfato de amônio
<b>F-II</b>	Extrato protéico precipitado com 30-50% de sulfato de amônio
<b>F-III</b>	Extrato protéico precipitado com 50-80% de sulfato de amônio
<b>x g</b>	Gravidade
<b>g</b>	Gramas
<b>GH</b>	Glicosil hidrolases
<b>GH1</b>	Família glicosil hidrolases 1
<b>GH3</b>	Família glicosil hidrolases 3
<b>GH9</b>	Família glicosil hidrolases 9
<b>KDa</b>	Quilodaltons
<b><math>K_m</math></b>	Constante de Michaelis-Menten
<b>M</b>	Molar
<b>mM</b>	Milimolar
<b>min.</b>	Minuto
<b>mg</b>	Miligramas
<b><math>\mu</math>g</b>	Microgramas
<b>mL</b>	Mililitro
<b><math>\mu</math>l</b>	Micro litro
<b>nm</b>	Nanômetros
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico

<b>PMSF</b>	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>TEMED</b>	Tetra metileno diamino
<b>V<sub>máx.</sub></b>	Velocidade máxima
<b>∅</b>	Diâmetro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
1.1 GLICOSIDASES.....	19
<b>1.1.2 <math>\beta</math>-D-Glicosidase</b> .....	21
1.1.2.1 Distribuição e função da $\beta$ -D-glicosidase.....	22
1.1.2.2 Aplicações Biotecnológicas.....	24
1.2 <i>Artemia franciscana</i> .....	25
<b>2 MATERIAIS</b> .....	28
2.1 ESPÉCIE EM ESTUDO.....	28
<b>2.1.1 <i>Artêmia franciscana</i> (Kellogg, 1906)</b> .....	29
2.2 MONOSSACARÍDEOS E DISSACARÍDEOS.....	29
2.3 SUBSTRATOS SINTÉTICOS.....	29
2.4 OUTROS COMPOSTOS.....	30
2.5 EQUIPAMENTOS .....	31
2.6 MATRIZES PARA CROMATOGRAFIAS.....	32
<b>3 MÉTODOS</b> .....	33
3.1 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	33
<b>3.1.1 Com substratos sintéticos</b> .....	33
<b>3.1.2 Com substratos naturais</b> .....	33
3.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	34
3.3 PURIFICAÇÃO DA $\beta$ -D-GLICOSIDASE .....	34
<b>3.3.1 Obtenção dos extratos enzimáticos</b> .....	34
<b>3.3.2 Fracionamento com sulfato de amônio</b> .....	34
<b>3.3.3 Cromatografia de exclusão molecular - Sephacryl S-200</b> .....	35

<b>3.3.4 Cromatografia de troca iônica Mono Q .....</b>	<b>35</b>
<b>3.3.5 Cromatografia de exclusão molecular - Superose 12.....</b>	<b>36</b>
<b>3.3.6 Recromatografia em cromatografia de exclusão molecular – Superose 12.....</b>	<b>37</b>
<b>3.4 CROMATOGRAFIA DESCENDENTE EM PAPEL .....</b>	<b>37</b>
<b>3.5 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR.....</b>	<b>38</b>
<b>3.5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas – SDS – PAGE.....</b>	<b>38</b>
<b>3.5.2 Determinação da massa molecular da <math>\beta</math>-D-glicosidase: cromatografia de exclusão molecular.....</b>	<b>39</b>
<b>3.6 ESTUDOS CINÉTICOS.....</b>	<b>39</b>
<b>3.6.1 Determinação da constante de Michaelis-Menten (<math>K_m</math>) e da Velocidade máxima (<math>V_{m\acute{a}x}</math>) .....</b>	<b>40</b>
<b>3.6.2 Influência do tempo sobre a atividade enzimática.....</b>	<b>40</b>
<b>3.6.3 Influência da temperatura sobre a atividade da <math>\beta</math>-D-glicosidase .....</b>	<b>41</b>
<b>3.6.4 Influência do potencial hidrogeniônico (pH) sobre a atividade da <math>\beta</math>-gli. ....</b>	<b>41</b>
<b>3.6.5 Influência de diversos íons metálicos sobre a atividade da <math>\beta</math>-D- glicosidase.....</b>	<b>42</b>
<b>3.6.6 Determinação de grupos catalíticos envolvidos na hidrólise do <math>\rho</math>- nitrofenil-<math>\beta</math>-D-glicopiranosídeo.....</b>	<b>42</b>
<b>3.6.7 Influência de carboidratos sobre a atividade enzimática .....</b>	<b>43</b>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
<b>4.1 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADES GLICOSIDÁSICAS DAS FRAÇÕES PROVENIENTES DO FRACIONAMENTO COM SULFATO DE AMÔNIO.....</b>	<b>44</b>



4.2 PURIFICAÇÃO DA $\beta$ -D-GLICOSIDASE.....	45
<b>4.2.1 Cromatografia de exclusão molecular - Sephacryl S-200.....</b>	<b>46</b>
<b>4.2.2 Cromatografia de troca iônica MONO Q.....</b>	<b>47</b>
<b>4.2.3 Cromatografia de exclusão molecular - Superose 12.....</b>	<b>48</b>
<b>4.2.4 Recromatografia em Superose 12.....</b>	<b>49</b>
<b>4.2.5 Resumo das etapas de purificação protéica.....</b>	<b>50</b>
4.3 CARACTERIZAÇÃO DA $\beta$ -D-GLICOSIDASE.....	51
<b>4.3.1 Massa molecular.....</b>	<b>52</b>
<b>4.3.2 Estudos cinéticos da <math>\beta</math>-D-glicosidase.....</b>	<b>54</b>
4.3.2.1 Determinação da constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e Velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ).....	54
4.3.2.2 Influência do tempo sobre a atividade enzimática.....	56
4.3.2.3 Influência da temperatura sobre a $\beta$ -D-glicosidase.....	57
4.3.2.4 Influência do potencial hidrogeniônico (pH) sobre a atividade enzimática.....	58
4.3.2.5 Influência de diferentes íons metálicos sobre a atividade $\beta$ -D-glicosidase.....	59
4.3.2.6 Efeito de inibidores enzimáticos sobre atividade enzimática.....	60
4.3.2.7 Influência de carboidratos sobre atividade enzimática.....	61
<b>4.3.3 Degradação de lactose e celobiose.....</b>	<b>62</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>72</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>74</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 GLICOSIDASES

Glicosidases são enzimas amplamente distribuídas na natureza (SPENCER; DAVIES, 2001) e sendo responsáveis pela hidrólise da ligação glicosídica (BROOKS et al., 2006), do tipo *O*- e *N*- ligados (WINCHESTER, 2005) entre dois ou mais carboidratos ou entre um carboidrato e uma molécula não glicosídica (ANTRANIKIAN et al., 1997), em oligossacarídeos, polissacarídeos e glicoconjugados (STAM et al., 2005). A hidrólise da ligação glicosídica pode ocorrer por dois mecanismos de reação (MELO; CARVALHO, 2006): o mecanismo de inversão, onde o produto da reação apresenta a configuração estereoquímica oposta ao substrato e o mecanismo de retenção, onde o produto da reação retém a configuração estereoquímica do substrato (SPENCER; DAVIES, 2001).

Essas enzimas podem ser denominadas de endoglicosidases, quando clivam internamente cadeias polissacarídicas liberando dissacarídeos e/ou oligossacarídeos ou de exoglicosidases quando clivam estas cadeias a partir de sua porção não redutora liberando monossacarídeos (MALEY et al, 1989). Elas são fundamentais em importantes funções biológicas como na digestão, modificações pós-traducionais de glicoproteínas e catabolismo de glicoconjugados nos lisossomos (HIRATAKE et al., 2003). Defeitos ou deficiência genética nestas enzimas estão associados a graves desordens do metabolismo de carboidratos (MELO; CARVALHO, 2006) como, por exemplo: a intolerância a lactose - que é ocasionada pela deficiência da lactase-florizina hidrolase (EC 3.2.1.62) (KROON et al., 2002; GLEW et al., 1996), a qual é responsável pela hidrólise da lactose do leite (DAY et

al., 2000) e a doença de Gaucher – que ocorre pela deficiência da glucocerebrosidase (EC 3.2.1.62), que hidrolisa glicosilceramida presente na membrana dos lisossomos (KROON et al., 2002; GLEW et al., 1996). Adicionalmente, as glicosidases promovem alterações da parede celular de bactérias e vegetais e hidrólise de polissacarídeos estruturais altamente insolúveis, como quitina e celulose (MELO; CARVALHO, 2006). Assim seu estudo constitui importante contribuição para o esclarecimento das características estruturais dos carboidratos (SPENCER; DAVIES, 2001).

Segundo Rigden (2002), para compensar a notável variedade de carboidratos e glicoconjugados que ocorrem naturalmente, uma correspondente diversidade de enzimas que atuam sobre eles também é produzida, e por este motivo, foi criado um sistema de classificação glicosil-hidrolase (GH), atualmente com 111 famílias, introduzido e desenvolvido por Henrissat (1991) e Henrissat e Bairoch (1993), o qual está disponível em um banco de dados geral (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html>) (COUTINHO; HENRISSAT, 1999). Este sistema é mais complexo do que a classificação E.C. visto não agrupar as enzimas somente pela função catalítica, mas também de acordo com suas seqüências aminoacídicas e os relacionamentos estruturais entre elas. Agrupando assim, as enzimas de origem evolutiva comum, independentemente das reações que elas catalisam (HENRISSAT, 1991; HENRISSAT; BAIROCH, 1993).

### 1.1.2 $\beta$ -D-Glicosidase

$\beta$ -D-glicosidase ( $\beta$ -glicosídeo glicohidrolases, EC 3.2.1.21) (DAYAN et al., 2003) catalisa a hidrólise da ligação  $\beta$ -O-glicosídica formada entre D-glicose e um outro açúcar ou aglicona (ARTHAN et al., 2006), hidrolisando di-e/ou oligossacarídeos, ou glicoconjugados (HSIEH; GRAHAM, 2001; CHANG; JUANG, 2007) do terminal não redutor, liberando resíduos de D-glicose (LOW; PONTOH, 2002).

Baseado na seqüência de aminoácidos, as enzimas que exibem atividade  $\beta$ -D-glicosidásica são classificadas em três famílias diferentes de glicosil hidrolases (GH): GH1, GH3 e GH9 (TURNER et al., 2007). As  $\beta$ -D-glicosidases família GH1 têm um mecanismo de retenção (TURNER et al., 2007) estando presentes em organismos de todos os reinos e possui uma característica distinta destas enzimas, que é sua baixa especificidade por substrato com respeito para a configuração C-4 (LI; LEE, 1999), podendo hidrolisar glicopiranosídeos de ambos epímeros na posição C-4 do açúcar (HAYS, et al., 1996) desta forma, elas são ativas sobre ambos,  $\beta$ -glicosídeo e  $\beta$ -galactosídeo (LI; LEE, 1999). As enzimas da família GH3 têm um mecanismo de retenção sendo encontradas em leveduras, bolor e bactérias do rúmex (KIM; SINGH; HAYASHI, 2006). As enzimas da família GH9 já foram encontradas até o momento em bactérias, essas enzimas apresentam um mecanismo de inversão (TURNER et al., 2007). A tabela 1 mostra as três famílias de glicosil hidrolases onde é encontrada a  $\beta$ -D-glicosidase.

Tabela 01-Famílias de glicosidases que possuem atividade  $\beta$ -D-glicosidásica.

Família	Atividades conhecidas
<b>GH1</b>	$\beta$ -glicosidase (EC 3.2.1.21); $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23); $\beta$ -manosidase (EC 3.2.1.25); $\beta$ -glicuronidase (EC 3.2.1.31); $\beta$ -D-fucosidase (EC 3.2.1.38); glucocerebrosidase (EC 3.2.1.62); 6-fosfo- $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.85); 6-fosfo- $\beta$ -glicosidase (EC 3.2.1.86); estrectosidine $\beta$ -glicosidase (EC 3.2.1.105); lactase (EC 3.2.1.108); amigdalina $\beta$ -glicosidase (EC 3.2.1.117); prunasin $\beta$ -glicosidase (EC 3.2.1.118); raucaffricina $\beta$ -glicosidase (EC 3.2.1.125); thioglucosidase (EC 3.2.1.147); $\beta$ -primeverosidase (EC 3.2.1.149); isoflavonoide 7-O- $\beta$ -apiosil- $\beta$ -glicosidase (EC 3.2.1.161); hidroxisourate hidrolase (EC 3.-.-.); $\beta$ -glycosidase (EC 3.2.1.-).
<b>GH3</b>	$\beta$ -glicosidase (EC 3.2.1. 21); xilano1,4- $\beta$ -xilosidase (EC 3.2.1. 37); $\beta$ -N-acetilhexosaminidase (EC 3.2.1. 52); glicano 1,3- $\beta$ -glicosidase (EC 3.2.1. 58); glucano 1,4- $\beta$ -glicosidase (EC 3.2.1. 74); exo-1,3-1,4-glicanase (EC 3.2.1. -); $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1. 55).
<b>GH9</b>	endoglucanase (EC 3.2.1.4); celobiohidrolase (EC 3.2.1.91); $\beta$ -glicosidase (EC 3.2.1.21).

Fonte: <<http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html>> (Coutinho; Henrissat, 1999).

#### 1.1.2.1 Distribuição e função da $\beta$ -D-glicosidase.

As  $\beta$ -D-glicosidases são amplamente distribuídas em bactérias, fungos, plantas e animais (YU et al., 2006), sendo vital para muitos processos biológicos, tal como na degradação da celulose (LANGSTON; SHEEHY; XU, 2006), um polissacarídeo linear de até quinze mil resíduos de D-glicose ligados por ligações glicosídicas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), sendo o principal componente da parede celular de plantas (VOET et al., 2000). Este composto é degradado pelo complexo enzimático das celulasas (LANGSTON; SHEEHY; XU, 2006).

Este complexo requer a ação coordenada de três tipos de atividades enzimáticas que são: a (I) endo-1,4- $\beta$ -D-glucan glicanohidrolase (EC 3.2.1.4), que clivam ligações glicosídicas internas da celulose liberando oligossacarídeos de vários comprimentos e, conseqüentemente, novas cadeias finais; em seguida, a (II) exo-1,4- $\beta$ -D-glucan celobiohidrolases (celobiohidrolases) (EC 3.2.1.91), atuam sobre o terminal não redutor de oligossacarídeos derivados da celulose, liberando celobiose (OYEKOLA; NGESI; WHITELEY, 2007; LYND et al., 2002); e, por último, a (III)  $\beta$ -D-glicosidase (EC 3.2.1.21) é requerida para o passo final da degradação da celulose (WALLECHA; MISHRA, 2003) quando ocorre à hidrólise da ligação  $\beta$ -1,4-glicosídica no terminal não redutor da celobiose (LOW; PONTOH, 2002) e assim, converte o intermediário celobiose em duas moléculas de glicose (WOLOSOWSKA; SYNOWIECKI, 2004). Esta reação é muito importante para uma eficiente hidrólise da celulose, pois celobiose é um forte inibidor da endo-1,4- $\beta$ -D-glucan glucanohidrolase e exo-1,4- $\beta$ -D-glucan celobiohidrolases (celobiohidrolases) no complexo enzimático das celulasas (WOLOSOWSKA; SYNOWIECKI, 2004).

Em tecidos de plantas,  $\beta$ -D-glicosidase possui importante papel em muitos processos biológicos como mecanismo de defesa contra fungos e patógenos onde (HSIEH; GRAHAM, 2001), a enzima hidrolisa isoflavonóides conjugados que, se encontram presentes em grande quantidade nas plantas, liberando glicose e aglicona, os isoflavonóides. A forma aglicona é tóxica para fungos patógenos (HSIEH; GRAHAM, 2001); outro processo de defesa química contra patógenos e herbívoros que estas enzimas estão envolvidas é o processo de cianogênese, onde ácido cianídrico (HCN) e outros compostos tóxicos são liberados pela hidrólise de glicosídeos cianogênicos O- $\beta$ -glicosídeos (LEAH et al., 1995; POULTON, 1990).

Também tem papel importante na lignificação (HOSEL; SURHOLT; BORGMANN, 1978) e decomposição da parede celular (HSIEH; GRAHAM, 2001).

Em mamíferos as  $\beta$ -D-glicosidases são importantes no metabolismo de flavonóides glicosídeos comuns da dieta, deglicosilando alguns, mas não todos os flavonóides (LAMBERT et al., 1999). Estes são uma grande classe de compostos polifenólicos que existem quase exclusivamente como  $\beta$ -glicosídeo, estando distribuídos nas plantas, conseqüentemente elas ocorrem em muitas comidas e bebidas, resultando no consumo humano (LAMBERT, et al., 1999), onde na sua deglicosilação liberam agliconas, compostos com ação anticancerígena (PANIZZI; BORDINGNON, 2000).

#### 1.1.2.2 Aplicações Biotecnológicas

Em adição a função fisiológica, a  $\beta$ -D-glicosidase é de grande interesse como biocatalizador industrial (LANGSTON; SHEEHY; XU, 2006), pois é indispensável para o eficiente sistema de degradação da celulose (LANGSTON; SHEEHY; XU, 2006) a açúcares fermentáveis (AGUIAR; MENEZES, 2002), uma vez que esta enzima degrada a celobiose que é o último intermediário da via de celulose e também inibidor retroativo das duas enzimas que agem anteriormente, sendo assim, a  $\beta$ -D-glicosidase não só participa do último passo da degradação da celulose, mas também degrada o produto que inibe a endoglucanase e a exoglucanase. Ambas as funções são críticas para vários processos de biotratamento / biorefinaria, como a produção de bioetanol (LANGSTON; SHEEHY; XU, 2006), tendo a celulose como fonte de carbono (FLACHNER; BRUMBAUER; RECZEY, 1999).

Na indústria alimentícia a  $\beta$ -D-glicosidase pode ser utilizada para desenvolvimento de novos produtos sem lactose na composição (PESSELA et al., 2003) Uma vez que  $\beta$ -GLI de muitos microorganismos como as bactérias *Sulfolobus shibatae* (WOLOSOWSKA; SYNOWIECKI, 2004) e *Thermus flavus* (KANG et al., 2005) mostra ampla especificidade por substrato, vista possuir atividade  $\beta$ -glicosidásica e  $\beta$ -galactosidásica (WOLOSOWSKA; SYNOWIECKI, 2004; KANG et al., 2005). Dentre seus substratos a celobiose é degradada a duas unidades de glicose e a lactose a uma unidade de glicose e uma de galactose (WOLOSOWSKA; SYNOWIECKI, 2004). Esta propriedade é conveniente para hidrólise de lactose (WOLOSOWSKA; SYNOWIECKI, 2004), sendo este um processo promissor. A eliminação de lactose no leite é requerida para resolver o problema de intolerância à lactose que afeta um grande percentual da população mundial (em torno de 70 %) (PESSELA et al., 2003).

## 1.2 *Artemia franciscana*

A *Artemia franciscana* é um microcrustáceo, branchiopoda, (HICKMAN; ROBERTS; LARSON, 2004) que é capaz de sobreviver em água quase doce ou em água contendo cloreto de sódio em saturação, chegando a suportar ambientes com salinidades de 340‰ e sendo por isso chamado de camarão de salmoura (WEAR; HASLETT, 1986). Filtradores e não seletivos alimentam-se de uma ampla variedade de microalgas (*Dunaliella tertiolecta* e *Tetraselmis suecica*) (MARQUES et al., 2004), bactérias (*Halobacterium* e *Halococcus*), pequenos protozoários e detritos presentes no meio aquático em que vive (AMAT, 1985). São utilizados mundialmente como alimento de peixes e camarões de criadouros (SILVA; MENDES, 2006).



Não existem estudos sobre glicosidases nessa espécie de invertebrado marinho. Os trabalhos existentes abrangem: crescimento da *Artemia* quanto à digestibilidade com fungos e microalgas (MARQUES et al., 2004), avaliação do efeito da *Artemia* como forma de alimentação na sobrevivência e crescimento de camarão (SILVA; MENDES, 2006; PONTES; ANDREATA, 2003) e caracterização da arilsulfatase da *Artemia* (MATUSIEWICZ; KORPACKA; DARBROWSKI, 2005).

Os estudos já realizados em nosso grupo de pesquisa sugerem uma ampla perspectiva de trabalhos a serem realizados com endo-, exoglicosidases e sulfatases encontradas em invertebrados marinhos. Os resultados até agora obtidos apontam para a existência de muitas diferenças, no que diz respeito a estas enzimas, entre as classes de invertebrados marinhos já estudados. O estudo e purificação de atividades glicosidásicas e sulfatásicas destes organismos servirão como ferramenta molecular na elucidação da estrutura química de glicoconjugados, de di e/ou oligossacarídeos e de polissacarídeos de invertebrados marinho e de algas marinhas. Assim como moduladoras da atividade biológica de carboidratos complexos.

Com base nas razões acima discutidas, os objetivos do presente estudo consistem em:

Objetivos Gerais:

- Identificar glicosidases em extratos protéicos da *Artemia franciscana*;
- Purificar e caracterizar a enzima com maior potencial para uso biotecnológico.

### Objetivos Específicos:

- Identificar exoglicosidases em extratos protéicos da *Artemia franciscana*;
- Purificar através de métodos cromatográficos a  $\beta$ -D-glicosidase;
- Determinação do  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  da  $\beta$ -D-glicosidase;
- Testar a atividade catalítica da  $\beta$ -D-glicosidase sobre celobiose e lactose;
- Verificar a influência do tempo sobre a atividade enzimática;
- Verificar a influência da temperatura sobre a atividade enzimática;
- Verificar a influência do pH sobre a atividade enzimática;
- Verificar a influência de íons sobre a atividade enzimática;
- Verificar a influência de carboidratos sobre a atividade enzimática.

## 2 MATERIAIS

### 2.1 ESPÉCIE EM ESTUDO

#### POSIÇÃO SISTEMÁTICA:

Filo: Arthropoda

Subfilo: Crustacea

Classe: Branchiopoda

Ordem: Anostraca

Família: Artemiide

Gênero: *Artemia*

Espécie: *Artemia franciscana*



Figura 1: *Artemia franciscana* – corresponde a animal adulto que mede 10 a 12mm de comprimento.

Fonte: [www.brineshrimpdirect.com](http://www.brineshrimpdirect.com)

### 2.1.1 *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906).

A biomassa congelada de *Artemia franciscana* foi adquirida junto à empresa distribuidora Henrique Lage Salineira do Nordeste, Macau / RN. O material foi mantido a – 20°C até o momento do processamento. A biomassa utilizada neste estudo corresponde, principalmente a adultos desta espécie capturados com uma malha seletiva (1 mm) nos evaporadores das salinas.

## 2.2 MONOSSACARÍDEOS E DISSACARÍDEOS

D-glicose, D-galactose, lactose e celobiose foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA).

## 2.3 SUBSTRATOS SINTÉTICOS

$\rho$ -nitrofenil sulfato;  $\rho$ -nitrofenil N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminídeo,  $\rho$ -nitrofenil  $\beta$ -D-manopiranosídeo;  $\rho$ -nitrofenil  $\alpha$ -D-manopiranosídeo;  $\rho$ -nitrofenil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo;  $\rho$ -nitrofenil N-acetil- $\beta$ -D-galactosaminídeo;  $\rho$ -nitrofenil-N-acetil- $\alpha$ -D-galactosaminídeo;  $\rho$ -nitrofenil  $\beta$ -D-fucopiranosídeo;  $\rho$ -nitrofenil  $\alpha$ -D-fucopiranosídeo;  $\rho$ -nitrofenil  $\beta$ -D-xilopiranosídeo foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St Louis, MO, EUA).

## 2.4 OUTROS COMPOSTOS

- Acrilamida e bisacrilamida da Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EUA), dodecil sulfato de sódio (SDS) e ácido acético ( $C_2H_4O_2$ ) da Reagen (Quimibrás Indústrias Químicas S.A. Indústria Brasileira - Rio de Janeiro).

- Acetato de etila e piridina, Hidróxido de sódio (NaOH), Álcool etílico ( $C_2H_6O$ ) foi obtido da CIRQ - Cromato Produtos Químicos LTDA (São Paulo, SP, Brasil).

- Albumina sérica bovina, persulfato de amônio, glicina, N, N, N', N'tetra-metileno diamino (TEMED), nitrato de prata, "Coomassie brilhante blue" R 250, "Coomassie brilhante blue" G 250; padrões de massa molecular para cromatografia da Sigma Chemical Company ( $\beta$ -amilase - 200 kDa, álcool desidrogenase - 150 kDa, albumina bovina - 66 kDa e anidrase carbônica - 29 kDa ) foram obtidos da Sigma Chemical Co. (Fair Lawn, NY, EUA).

- Papel Whatman nº 01 para cromatografia, distribuído por Fisher Scientific Pittsburgh (UK)

- Padrões de massa molecular para eletroforese da Fermentas Life Sciences ( $\beta$ -galactosidase - 116 kDa, albumina - 66,2 kDa, ovoalbumina - 45 kDa, lactato desidrogenase - 35 kDa, endonuclease de restrição - 25 kDa,  $\beta$ -lactoglobulina - 18,4 kDa e lisozima - 14,4 kDa).

- Tiosulfato de sódio ( $Na_2S_2O_3$ ), cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ), cloreto de cálcio ( $CaCl_2$ ), sulfato de zinco ( $ZnSO_4$ ), acetato de sódio ( $NaC_2H_3O_2$ ), cloreto de sódio

(NaCl), ácido clorídrico (HCl), cloreto de potássio (KCl), sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), e fosfato de sódio monobásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) foram adquiridos da VETEC Química Fina LTDA – RJ; ácido tricloroacético (CCl<sub>3</sub>COOH)-MERCK – Rio de Janeiro.

## 2.5 EQUIPAMENTOS

- Agitador orbital, modelo 2525, FANEM Ltda (São Paulo, SP, Brasil);
- Balança analítica – SCIENTCH, obtidos da QUIMIS Aparelhos Científicos Ltda – Diadema – SP, Brasil;
- Banhos e estufas de temperaturas constantes FANEM Ltda. (São Paulo, SP, Brasil);
- Bomba peristáltica modelo 18-1110-91 e coletor de frações modelo 18-1003-64, Pharmacia Biotech, (Uppsala, Sweden);
- Capela de fluxo laminar Baker (Sanford, Maine EUA);
- Centrífuga refrigerada modelo CR 21 da Hitachi Koki Co., Ltda. (Tóquio, Japão);
- Densitômetro Jr. TLC plus da Helena Laboratoris (Beaumont, Tx, EUA);
- Espectrofotômetro Hitachi U 2000 (Japão);

- Fonte de corrente contínua regulável, desenvolvidas pelo Dr. H. Rzeppa, Técnica Permatron Ltda., Indústria e Comércio (São Paulo, SP, Brasil);
- FPLC AKTA PURIFIER obtido da GE Healthcare Life Sciences, (Uppsala, Sweden);
- Medidor de pH Digimed (São Paulo, SP, Brasil);
- Sistema de eletroforese em gel vertical, modelo Mini-VE da Amersham Biosciences (EUA).

## 2.6 MATRIZES PARA CROMATOGRAFIAS

- Sephacryl S-200 da Sigma Chemical Company;
- MONO Q da GE Healthcare Life Sciences, (Uppsala, Sweden);
- Superose 12 10 300 da GE Healthcare Life Sciences, (Uppsala, Sweden).

## 3 MÉTODOS

### 3.1 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

#### 3.1.1 Com substratos sintéticos

Alíquotas de 20  $\mu\text{l}$  das frações enzimáticas foram incubadas a 45°C durante uma hora com os diferentes *p*-nitrofenís a uma concentração final de 0,15 mM dos substratos em um volume final de 100  $\mu\text{l}$ . As reações foram interrompidas após a adição de 1 mL de NaOH 0,25N e o *p*-nitrofenol liberado foi lido em espectrofotômetro a 405 nm. Para cada ensaio foram feitos controles negativos dos substratos (substrato com tampão) e das frações protéicas (fração com tampão).

Uma unidade (U) de atividade  $\beta$ -D-glicosidase é definida como quantidade de enzima requerida para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitrofenol do substrato por minutos. A 45°C em 0,1M tampão acetato de sódio a pH 5,0. As atividades específicas foram calculadas pela relação entre a unidade de atividade enzimática (U) e a massa em mg da fração.

#### 3.1.2 Com substratos naturais

Alíquota de 50 $\mu\text{l}$  (1,65  $\mu\text{g}$ ) da  $\beta$ -GLI foi incubada com 50  $\mu\text{g}$  dos dissacarídeos: celobiose e lactose a 45°C por 6 e 18 horas. Também foram feitas frações controles, possuindo 50  $\mu\text{g}$  (celobiose e lactose) e 50 $\mu\text{l}$  do tampão, estes foram incubados a 45°C



por 6 e 18 horas. Após esse período a reação foi interrompida submetendo os ensaios a 100°C por 2 minutos, em seguida as amostras foram secas em bomba a vácuo e posteriormente dissolvidas em 20 µl de água destilada, e submetidas à cromatografia descendente em papel (item 3.4). A degradação dos carboidratos foi quantificada por densitometria dos cromatogramas revelados.

### 3.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Em cada passo de purificação foi realizada a dosagem de proteínas pelo método SEEDMAK e GROSSBERG (1977), tendo a albumina bovina como padrão.

### 3.3 PURIFICAÇÃO DA $\beta$ -D-GLICOSIDASE

#### 3.3.1 Obtenção dos extratos enzimáticos

Cerca de 100 gramas do invertebrado marinho *Artemia franciscana* foram homogeneizadas com dois volumes de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0 e centrifugadas a 7.300 x g durante 30 min. A fase solúvel (extrato bruto) foi reservada para posterior fracionamento com sulfato de amônio.

#### 3.3.2 Fracionamento com sulfato de amônio

O fracionamento com sulfato de amônio foi realizado em três etapas de saturação: 0-30%, 30-50% e 50-80%. Os precipitados resultantes de cada saturação

após centrifugação a 7.300 x g por 30 minutos foram solubilizados em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0 e submetidos à diálise contra o mesmo tampão durante 18 horas a 4°C, nesse processo foram realizadas quatro trocas de tampão. As frações referindo-se aos percentuais de saturação 0-30%, 30-50% e 50-80%, foram denominadas de F-I, F-II e F-III, respectivamente.

### **3.3.3 Cromatografia de exclusão molecular - Sephacryl S-200**

Cerca de 1 mL (3 mg de proteínas), obtido da fração F-II (30 – 50%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), foi aplicado em uma cromatografia de exclusão molecular Sephacryl S-200 (  $\varnothing$  2,0 cm x 67,5 cm), equilibrada com tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,0. As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão, com fluxo de 0,4 mL por minuto, sendo coletadas frações de 2 mL e armazenada a 4°C até o uso. O perfil de eluição protéica foi monitorado em espectrofotômetro a 280 nm, e o perfil de atividade enzimática contra o  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo foi obtido como será descrito no item 3.1.1. Este procedimento foi realizado 13 vezes.

### **3.3.4 Cromatografia de troca iônica Mono Q**

As frações que corresponde ao primeiro pico de atividade enzimática da  $\beta$ -D-glicosidase ( $\beta$ -GLI), eluídas da Sephacryl S-200 foram reunidas e precipitadas com 90% de sulfato de amônio e após 18 horas, submetidas a uma centrifugação a 7.300 x g durante 30 minutos, o precipitado foi solubilizado em 1 mL de tampão Tris-HCl 0,02 M,

pH 8,0 e dialisado contra o mesmo tampão por 6 horas sob agitação, com 4 trocas de tampão. Cerca de 0,9 mg de proteína, foi então submetida a cromatografia de troca iônica MONO Q (  $\varnothing$  0,7 cm x 2,5 cm), sob o sistema FPLC AKTA Purifier, que foi pré-equilibrada com o tampão Tris-HCl 0,02 M pH 8,0, eluída com o mesmo tampão acrescido com um gradiente de cloreto de sódio (0,0 – 0,7 M). Frações de 0,5 mL foram coletadas num fluxo de 1 mL/minuto e armazenadas a 4°C até o uso. O perfil de eluição protéica foi monitorado em absorbância a 280 nm, enquanto o perfil de atividade enzimática foi obtido como será descrito no item 3.1.1. Este procedimento foi realizado 9 vezes.

### **3.3.5 Cromatografia de exclusão molecular - Superose 12**

As frações com maior atividade  $\beta$ -D-glicosidásica, eluídas da MONO Q, foram reunidas e concentradas com 90% de sulfato de amônio e, após 18 horas, submetidas a uma centrifugação a 7.300 x g durante 30 minutos. O precipitado foi solubilizado em 1 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 e dialisado contra o mesmo tampão por 6 horas sob agitação e com 4 trocas do tampão. Cerca de 1,760 mg de proteínas, foi submetida à cromatografia de exclusão molecular Superose 12 ( $\varnothing$  1,0 cm x 30 cm) sob o sistema FPLC AKTA Purifier, pré-equilibrada com tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0. Frações de 0,5 mL foram coletadas, com o mesmo tampão, num fluxo de 0,8 mL/minuto e armazenadas a 4°C até o uso. O perfil de eluição protéica foi monitorado em absorbância a 280 nm, o perfil de atividade enzimática foi obtido como será descrito no item 3.1.1. Este procedimento foi realizado 1 vez.

### 3.3.6 Recromatografia em cromatografia de exclusão molecular-Superose 12

O pico contendo atividade da  $\beta$ -GLI, com cerca de 0,083 mg de proteínas, foi recromatografado em Superose 12 (  $\varnothing$  1,0 cm X 30 cm) sob o sistema FPLC AKTA Purifier nas mesmas condições já descritas em 3.3.5. Frações de 0,5 mL foram coletadas num fluxo de 0,8 mL/minuto e armazenadas a 4°C ate o uso. O perfil de eluição protéica foi monitorado em absorbância a 280 nm e o perfil de atividade enzimática foi obtido como será descrito no item 3.1.1. Este procedimento foi realizado 1 vez.

### 3.4 CROMATOGRAFIA DESCENDENTE EM PAPEL

O material incubado com celobiose e lactose como descrito no item 3.1.2, foi cuidadosamente aplicado a 10 cm da margem do papel Whatman nº 01 (16 cm x 57 cm) e submetido a cromatografia descendente com solvente acetato de etila: piridina: água (8:2:1) v/v.

Os compostos com poder redutor foram visualizados através de revelação com prata em meio alcalino (TRAVELYN; PROCTER; HARRISON , 1950).

### 3.5 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR

#### 3.5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas – SDS-PAGE

Para avaliar o grau de pureza e determinar a massa molecular aproximada da  $\beta$ -GLI 16  $\mu$ g da enzima obtida da recromatografia em Superose 12, foi submetido a uma eletroforese em gel de poliacrilamida 12% em presença de SDS, de acordo com a metodologia descrita por LAEMMLI, (1970). Depois de diluída em tampão de amostra (azul de bromofenol 5%, SDS 20% e sacarose 10%), a alíquota (16  $\mu$ g de proteína) foi aplicada no gel (09 cm x 09 cm), o qual foi submetido a uma corrente constante de 30 mA por 2 horas. O gel foi corado em solução de "Coomassie brilhante blue" R 250 0,1%, metanol 40% e ácido acético a 10%. A banda de proteína foi revelada após imersão do gel em uma solução descorante (metanol 30% e ácido acético 10%). Para a detecção de proteínas na ordem de nanogramas, foi desidratado com etanol a 50 % (três trocas a cada 20 min), posteriormente, mergulhado em solução de tiosulfato de sódio 0,02 % e mantido sob suave agitação durante 1 minuto. Após este tempo, o gel foi submetido a três lavagens rápidas com água destilada e imerso em solução de nitrato de prata (100 mL de solução de nitrato de prata 0,2%, 74  $\mu$ l de formaldeído 37 %) por 20 minutos. Novamente o gel foi lavado 3 vezes com água destilada e por fim, adicionada solução reveladora (100 mL solução de carbonato de sódio 6 %, 50  $\mu$ l de formaldeído 37 % e 2 mL de solução de tiosulfato de sódio 0,02 %). A reação foi interrompida com ácido acético 13%. Para acompanhar a migração eletroforética da proteína isolada, foram utilizados padrões de proteínas com massas moleculares conhecidas ( $\beta$ -galactosidase - 116 kDa, albumina - 66,2 kDa, ovoalbumina - 45 kDa,

lactato desidrogenase - 35 kDa, endonuclease de restrição - 25 kDa,  $\beta$ -lactoglobulina - 18,4 kDa e lisozima – 14,4 kDa) da "Ferments Life Sciences".

### **3.5.2 Determinação da massa molecular da $\beta$ -D-glicosidase: cromatografia de exclusão molecular**

Proteínas com massas moleculares conhecidas ( $\beta$ -amilase - 200 kDa; álcool desidrogenase - 150 kDa; albumina sérica bovina - 66 kDa e anidrase carbônica - 29 kDa), foram aplicadas na Superose 12 sob o sistema FPLC AKTA Purifier ( $\varnothing$  1 cm x 30 cm) equilibrada com tampão Tris HCl 0,05M, pH 7,5; sendo coletadas frações de 0,8 mL por minuto. O perfil de eluição protéica foi monitorado com detector UV a 280 nm. O mesmo foi feito com a fração proveniente da MONO Q, sendo que esta antes de ser aplicada na coluna superose 12, foi dialisada contra tampão TRIS HCl 0,05M, pH 7,5. Uma vez relacionada a eluição desta fração com as de proteínas de massa molecular conhecida, inferimos a massa molecular da  $\beta$ -GLI.

### **3.6 ESTUDOS CINÉTICOS**

A fração com atividade  $\beta$ -GLI obtida após a cromatografia em Superose 12, foi submetida aos testes cinéticos frente a diferentes condições de temperatura, concentrações de substrato, concentrações de enzima e pH. Foram também analisados a influência do tempo, efeito de íons, grupos catalíticos e de carboidratos sobre a atividade enzimática.

### 3.6.1 Determinação da constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e da Velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ )

Com o objetivo de se determinar a constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e a velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ), para a hidrólise do  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo alíquotas de 10  $\mu$ l (0,33  $\mu$ g) da  $\beta$ -GLI, foram incubadas a 45°C durante 1 h em pH 5,0, junto a concentrações crescentes de  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (0,1 a 1,0 mM). Os ensaios foram feitos em triplicatas, sendo interrompidos com 1 mL de NaOH 0,25 N e o  $p$ -nitrofenol liberado lido em espectrofotômetro a 405 nm. Os valores de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  foram calculados pela plotagem de Hanes (1932). Este gráfico representa a relação da [S] (concentração do substrato) com [S]/V (razão da concentração do substrato pela velocidade da reação). O ponto que toca o eixo X corresponde a  $-K_m$  e a inclinação da reta é o inverso da velocidade máxima ( $1/V_{m\acute{a}x}$ ).

### 3.6.2 Influência do tempo sobre a atividade enzimática

A hidrólise do  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (concentração final de 0,7 mM) foi realizada com diferentes tempos de incubação (1, 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 210 minutos), com 10  $\mu$ l (0,33  $\mu$ g) da  $\beta$ -GLI a 45°C, pH 5,0. Decorrido cada intervalo de tempo, a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de NaOH 0,25 N e o  $p$ -nitrofenol liberado, lido em espectrofotômetro a 405 nm.

### 3.6.3 Influência da temperatura sobre a atividade da $\beta$ -D-glicosidase

Para avaliarmos o efeito da temperatura sobre a atividade enzimática, alíquotas de 10  $\mu$ l da  $\beta$ -GLI (0,33  $\mu$ g), foram incubadas em pH 5,0, a diferentes temperaturas (5, 25, 37, 45, 60, 70 e 80°C) em uma concentração final de 0,7 mM do substrato. Após 1 hora, os ensaios foram interrompidos com 1 mL de NaOH 0,25 N e o *p*-nitrofenol liberado, lido em espectrofotômetro a 405 nm.

A estabilidade térmica da  $\beta$ -GLI foi realizada, pré-incubando-se frações de 10  $\mu$ l da enzima por tempos diferentes (0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 6; 9; 12; 18 e 24 horas) a diferentes temperaturas (20, 37, 45, 60 e 70 °C) na ausência do substrato. Após o tempo especificado as frações foram colocadas a 4°C e em seguida foi adicionado *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo para uma concentração final de 0,7 mM. Os ensaios enzimáticos ocorreram então em pH 5,0 a 45°C por 1 hora, as reações foram interrompidas com 1mL de NaOH 0,25 N e o *p*-nitrofenol liberado foi lido em espectrofotômetro a 405 nm.

### 3.6.4 Influência do potencial hidrogeniônico (pH) sobre a atividade da $\beta$ -D-glicosidásica

Com o objetivo de avaliar a influência do pH sobre a hidrólise do substrato sintético, foram preparados tampões em diferentes pH: acetato de sódio 0,1 M pH 3,0, 3,5, 4,0, 5,0 e 5,5; fosfato de sódio 0,1 M pH 6,8 e tris-HCl 0,1 M pH 7,5 e 8,5. Alíquotas



de 100  $\mu\text{l}$  (3,3  $\mu\text{g}$ ) da  $\beta$ -GLI foram dialisadas durante 18 horas contra os tampões acima citados com 4 trocas de tampão. Em seguida, foram realizados ensaios enzimáticos com 10  $\mu\text{l}$  (0,33  $\mu\text{g}$ ) de cada fração com o substrato sintético em concentração final de 0,7 mM, a 45°C, no pH desejado por 1 hora. Os ensaios foram interrompidos com 1 mL de NaOH 0,25 N e o *p*-nitrofenol liberado, lido em espectrofotômetro a 405 nm.

### **3.6.5 Influência de diversos íons metálicos sobre a atividade da $\beta$ -D-glicosidase**

Alíquotas de 10  $\mu\text{l}$  (0,33  $\mu\text{g}$ ) da  $\beta$ -GLI, foram pré-incubadas a 45°C, durante 15 minutos, na presença de diversos sais: sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4$ ), sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ), nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ), cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), cloreto de potássio (KCl) e cloreto de manganês ( $\text{MnCl}_2$ ) a uma concentração final de 5 mM. Transcorrido esse tempo, foi adicionado o *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo numa concentração final de 0,7 mM e procedemos com o ensaio a 45°C, em pH 5,0 e após 1 hora, os ensaios foram interrompidos com 1 mL de NaOH 0,25 N, em seguida os ensaios foram centrifugados em microcentrífugas e o sobrenadante lido em espectrofotômetro a 405 nm.

### **3.6.6 Determinação de grupos catalíticos envolvidos na hidrólise do *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo**

Alíquotas de 10  $\mu\text{l}$  (0,33  $\mu\text{g}$ ) da  $\beta$ -GLI, foram pré-incubadas a 45°C, durante 15 minutos, na presença dos compostos iodoacetamida ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{INO}$ ) e PMSF - fluoreto de

fenilmetilsulfonil ( $C_7H_7FO_2S$ ) em concentração final de 1 mM e N-etilmaleimida ( $C_6H_7NO_2$ ) em concentração final de 5 mM que inibem especificamente radicais aminoacídicos. Transcorrido esse tempo, foi adicionado o  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo numa concentração final de 0,7 mM e procedeu-se com um ensaio a 45°C, em pH 5,0 e após 1 hora, os ensaios foram interrompidos com 1 mL de NaOH 0,25 N e o  $p$ -nitrofenol liberado, lido em espectrofotômetro a 405 nm.

### **3.6.7 Influência de carboidratos sobre a atividade enzimática**

Neste experimento, alíquotas de 10  $\mu$ l (0,33  $\mu$ g) da  $\beta$ -GLI, foram pré-incubadas com os carboidratos – monossacarídeos: D-galactose e D-glicose e dissacarídeos: celobiose e lactose em concentrações finais de 1 mM, 5mM e 10 mM durante 15 minutos a 45°C e em seguida adicionou-se  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo numa concentração final de 0,7 mM. Os ensaios foram realizados a 45°C, em pH 5,0 durante 1 hora, e após este período, foram interrompidos pela adição de 1 mL de NaOH 0,25 N e o  $p$ -nitrofenol liberado foi lido em espectrofotômetro a 405 nm.

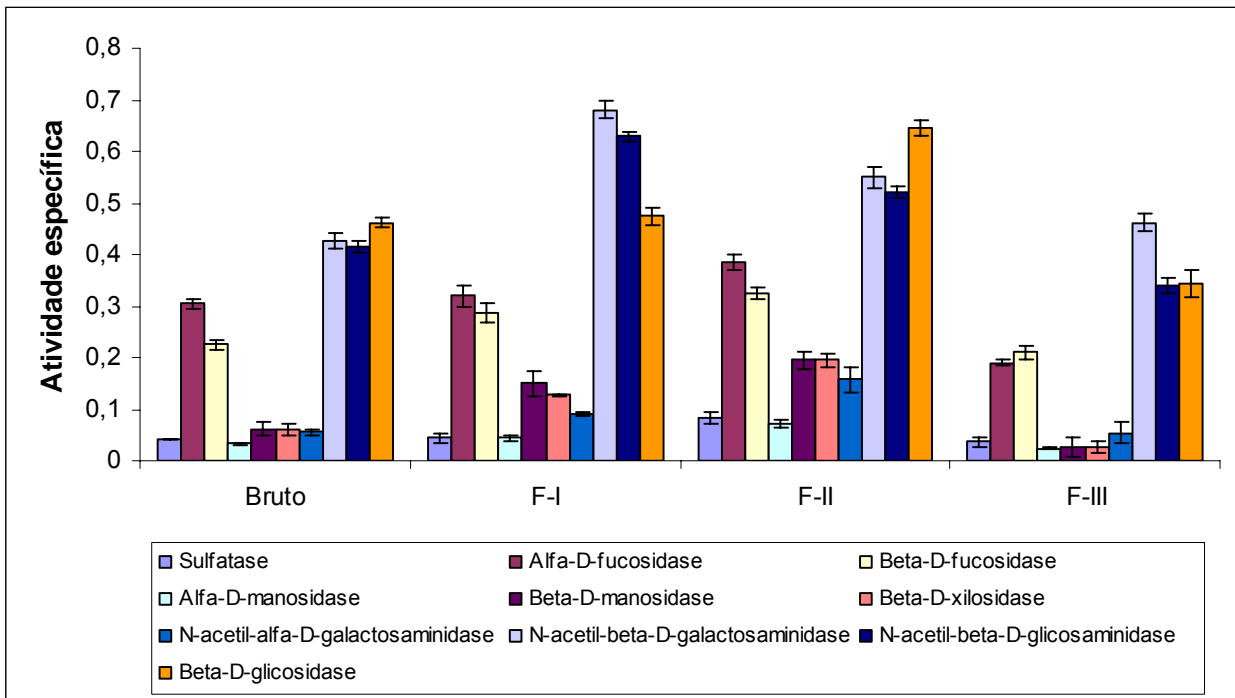
## 4 RESULTADOS

### 4.1 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADES GLICOSIDÁSICAS DAS FRAÇÕES PROVENIENTES DO FRACIONAMENTO COM SULFATO DE AMÔNIO

A exclusão das atividades glicosidásicas de *A. franciscana* foi pesquisada no extrato bruto e nas frações precipitadas com sulfato de amônio. Para isso utilizaram-se vários substratos sintéticos *p*-nitrofenil derivados de açúcares.

Os resultados obtidos através de ensaios utilizando as frações do extrato bruto F-I, F-II e F-III demonstraram que todas as atividades testadas foram precipitadas em todas as frações, sendo maiores atividades específicas encontradas foram  $\alpha$ -D-fucosidase,  $\beta$ -D-fucosidase, N-acetil- $\beta$ -D-galactosaminidase, N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase e  $\beta$ -D-glicosidase (Figura 02).

Com relação à  $\beta$ -GLI, que é o objetivo do estudo, sua maior atividade específica é encontrada na F-II, sendo esta fração submetida ao fracionamento em cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-200).



**Figura 02: Atividades específicas das frações enzimáticas de *Artemia franciscana*.**

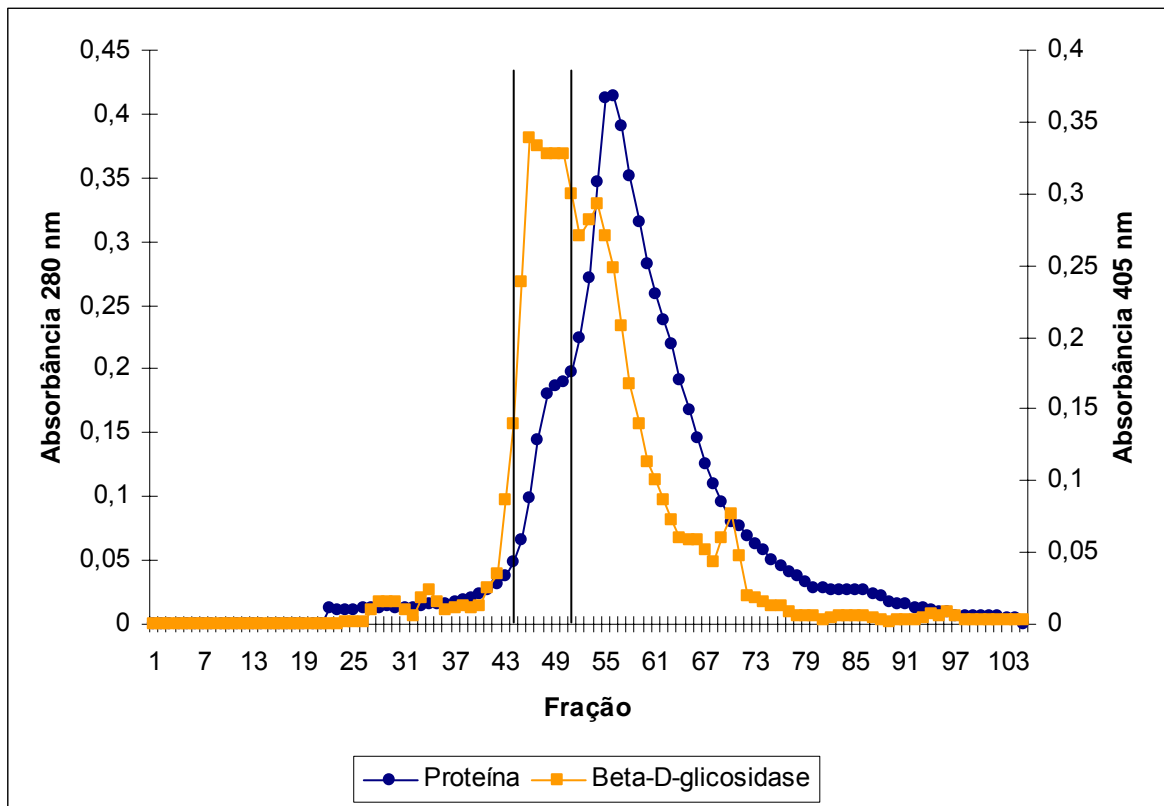
Frações do extrato bruto, F-I, F-II e F-III foram incubadas com cada  $\rho$ -nitrofenil para uma concentração final de 0,15 mM a 45°C, durante 1 hora. As incubações foram interrompidas pela adição de 1mL de NaOH 0,25N e o  $\rho$ -nitrofenol liberado lido em espectrofotômetro a 405 nm. Onde: F-I, F-II e F-III, frações precipitadas com 0-30%, 30-50% e 50-80% de sulfato de amônio, respectivamente.

#### 4.2 PURIFICAÇÃO DA $\beta$ -D-GLICOSIDASE

Como já descrito em métodos, para a purificação da  $\beta$ -GLI utilizou-se cinco passos: fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia de exclusão molecular - Sephacryl S-200, cromatografia de troca iônica - MONO Q sob o sistema FPLC AKTA PURIFIER, cromatografia de exclusão molecular - Superose 12 sob o sistema FPLC AKTA PURIFIER e recromatografia em Superose 12. As frações com altas atividades específicas foram escolhidas para serem utilizadas nos experimentos subseqüentes levando a uma boa purificação da  $\beta$ -GLI.

#### 4.2.1 Cromatografia de exclusão molecular - Sephacryl S-200

A fração F-II apresentou maior atividade específica sobre  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo. Assim, esta fração foi submetida à cromatografia de exclusão molecular Sephacryl S-200. Esta cromatografia apresentou um perfil contendo três picos de atividade  $\beta$ -D-glicosidásica (Figura 03). As frações referentes ao primeiro e maior pico de atividade da  $\beta$ -GLI (frações de 44 a 51) foram reunidas, concentradas, dialisadas contra tampão Tris-HCl 0,02M pH 8,0 e submetidas a uma cromatografia de troca iônica Mono Q sob o sistema FPLC AKTA PURIFIER.

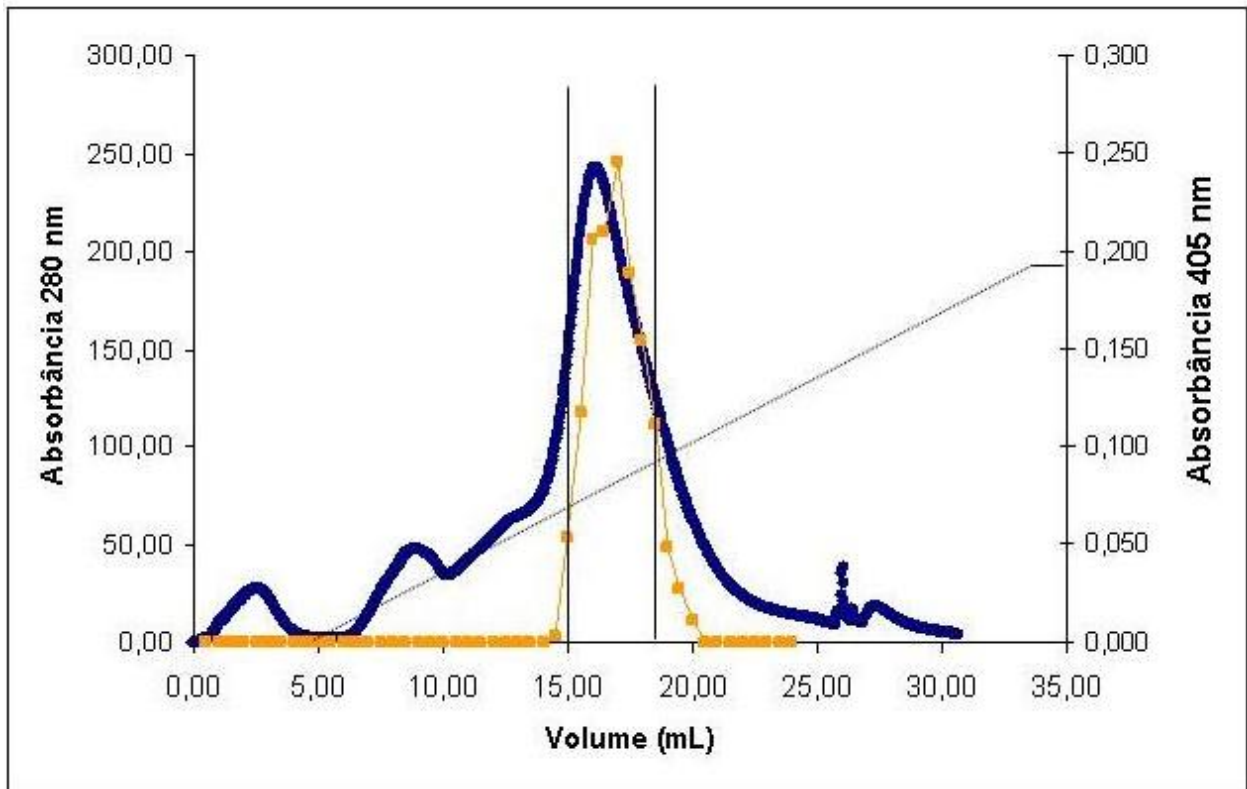


**Figura 03: Perfil de eluição de F-II em cromatografia de exclusão molecular - Sephacryl S-200**

A coluna foi equilibrada e eluída com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0. Foram coletadas frações de 2mL, num fluxo de 0,4 mL/minuto. A eluição das proteínas foi monitorada em espectrofotômetro a 280 nm (●) e o perfil de atividade com o  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo determinadas por leitura a 405 nm (■).

#### 4.2.2 Cromatografia de troca iônica MONO Q

A fração proveniente do primeiro pico de atividade da enzima  $\beta$ -GLI na cromatografia Superose 12, que foi eluída nas frações 44 – 51, foi aplicada na cromatografia Mono Q sob o sistema FPLC, resultando em um perfil de eluição que revelou quatro picos protéicos. Após realização da atividade enzimática observou-se um único pico de atividade  $\beta$ -D-glicosidásica que coincide com o terceiro pico de proteína, a qual foi eluída com 0,4 M de NaCl (Figura 04). As frações entre 15 e 18mL foram reunidas, concentradas, dialisadas contra tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,0 e submetidas à cromatografia de exclusão molecular em Superose 12 no sistema FPLC AKTA PURIFIER.

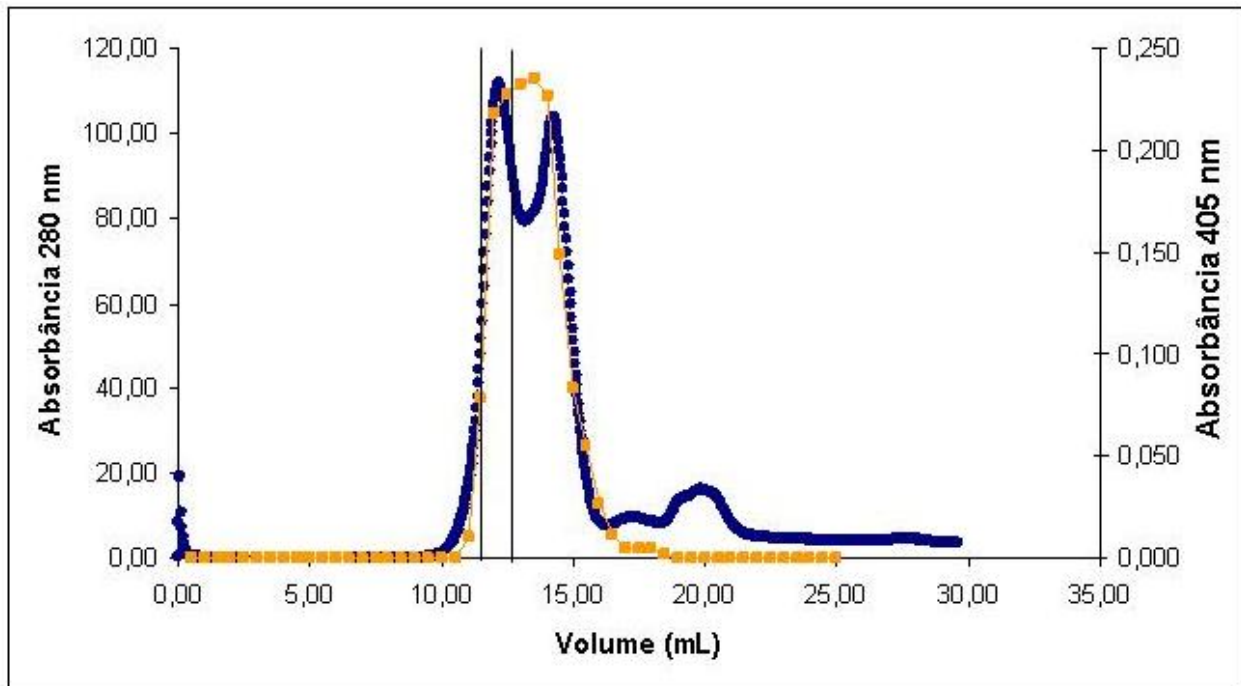


**Figura 04: Perfil de eluição da  $\beta$ -D-glicosidase em cromatografia de troca iônica MONO Q.**

A coluna foi equilibrada e eluída com tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 8,0. Foram coletadas frações de 0,5mL num fluxo de 1mL/min. A eluição das proteínas foi monitorada com detector UV a 280 nm (●) e o perfil de atividade com o  $p$ -nitrofenil  $\beta$ -D-glicopiranosídeo determinada por leitura a 405 nm (■).

#### 4.2.3 Cromatografia de exclusão molecular - Superose 12

As frações da MONO Q (15 – 18mL) com atividade  $\beta$ -D-glicosidásica foram reunidas e submetidas a uma cromatografia de exclusão molecular Superose-12 sob o sistema FPLC. O perfil de eluição desta coluna revelou dois picos protéicos (Figura 05). Após realização de ensaios enzimáticos observou-se a atividade de  $\beta$ -GLI nestes dois picos. O primeiro pico protéico (11,5 – 13,5mL) foi reunido para posterior caracterização enzimática, ensaio enzimático contra carboidratos (celobiose e lactose) e Recromatografia em Superose 12.



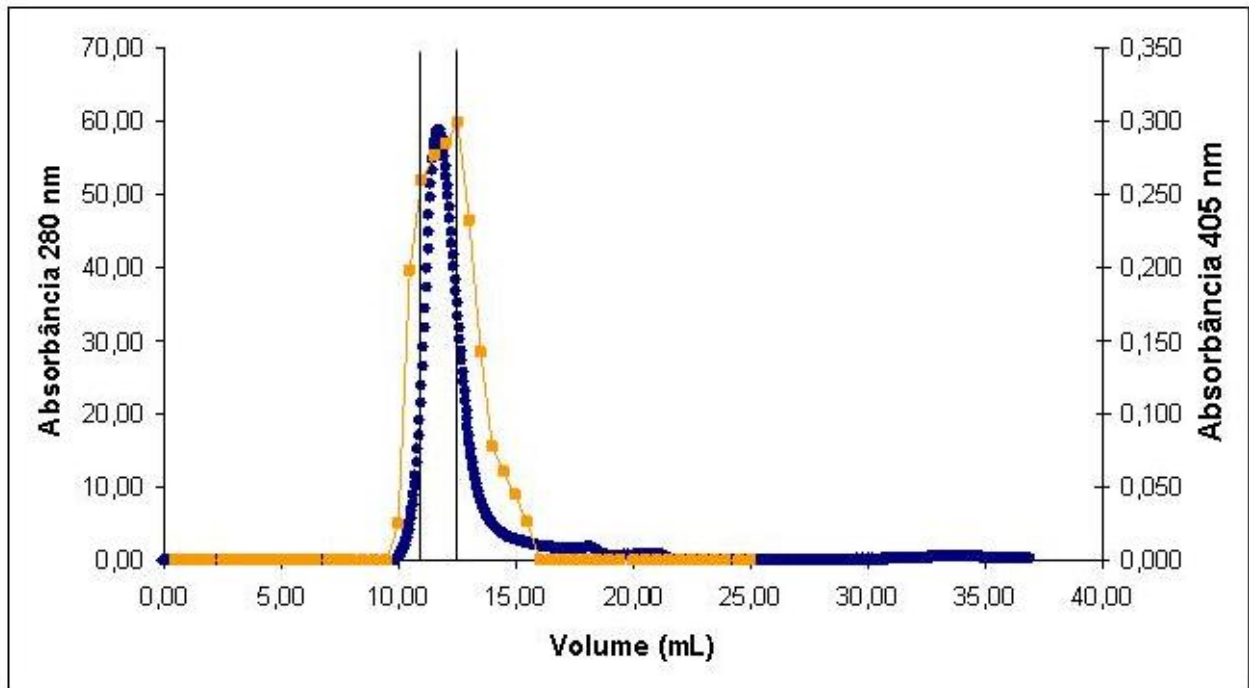
**Figura 05: Perfil de eluição da  $\beta$ -D-glicosidase em cromatografia de exclusão molecular - Superose 12**

A coluna foi equilibrada e eluída com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0. Foram coletadas frações de 0,5 mL num fluxo de 0,8 mL/min. A eluição das proteínas foi monitorada com detector UV a 280 nm (●) e o perfil de atividade com o  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo determinadas por leitura a 405 nm (■).

#### 4.2.4 Recromatografia em Superose 12

A fração que corresponde ao primeiro pico protéico (11,5 – 13,5) da Superose 12 foi reunida e submetida a uma Recromatografia em Superose sob o sistema FPLC. O perfil de eluição desta coluna revelou um único pico protéico que, após testes enzimáticos foi observado que o pico de atividade da  $\beta$ -GLI coincide com o pico protéico (Figura 06). As frações (11 – 12,5) foram unidas e concentradas no liofilizador para posterior eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).





**Figura 06: Recromatografia da  $\beta$ -D-glicosidase em cromatografia de exclusão molecular (Superose 12)**

A coluna foi equilibrada e eluída com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5.0. Foram coletadas frações de 0,5 mL num fluxo de 0,8 mL/min. A eluição das proteínas foi monitorada com detector UV a 280 nm (●) e o perfil de atividade com o *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo determinadas por leitura a 405 nm (■).

#### 4.2.5 Resumo das etapas de purificação protéica

A tabela 02 resume as etapas utilizadas na purificação da  $\beta$ -GLI. Analisando-se esta tabela observou-se um índice de purificação final de 44,09 vezes e uma recuperação de 1,01%.

Tabela 02: Etapas de purificação da  $\beta$ -D-glicosidase

Fração	Volume	Proteína	Atividade	Atividade	Recuperação	Purificação
	Total (mL)	Total (mg)	Total (U)	Específica (U/mg)	(%)	(X)
<b>Bruto</b>	150,00	291,75	54,10	0,185	100	1
<b>F-II</b>	13	39,00	4,368	0,112	8,08	0,61
<b>S-200</b>	9	9,45	2,880	0,304	5,30	1,64
<b>MONO Q</b>	6	1,76	1,362	0,776	2,53	4,20
<b>S- 12</b>	2,50	0,083	0,550	6,584	1,01	35,59
<b>*S- 12</b>	2,00	0,067	0,546	8,156	1,01	44,09

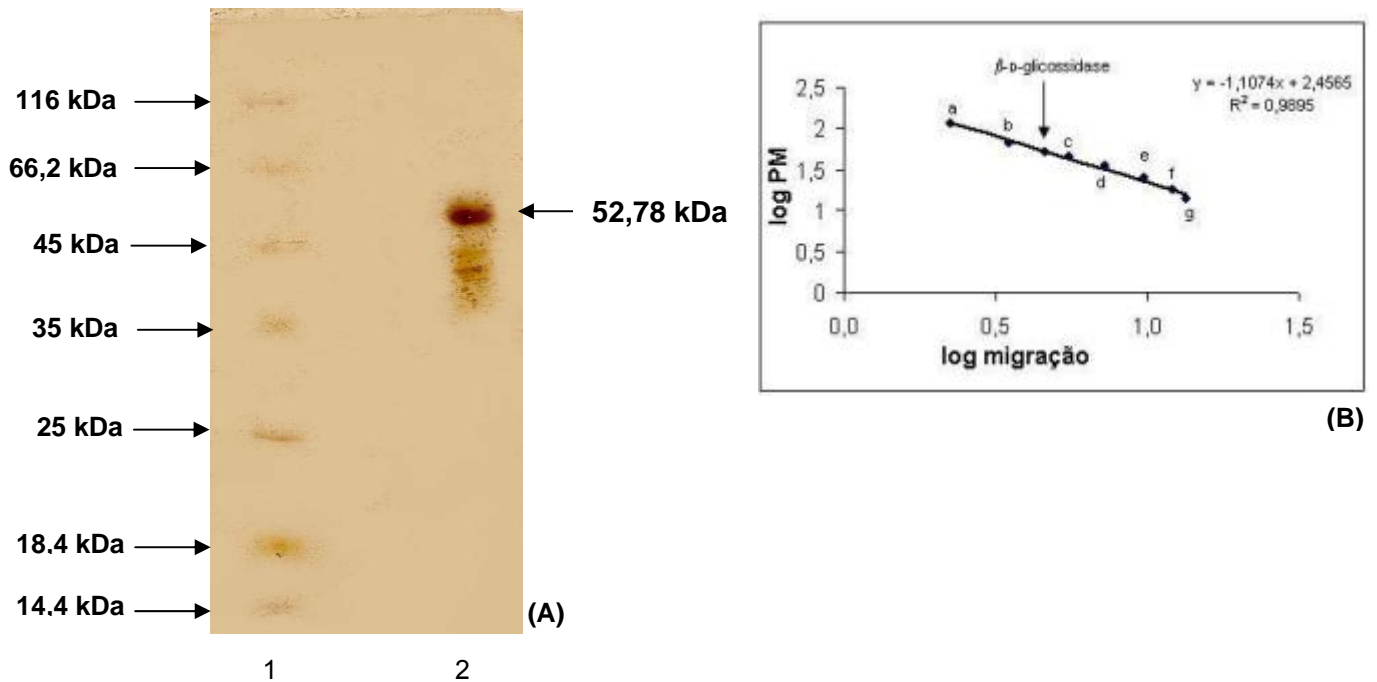
Onde: S-12= Superose; \* S-12 = recromatografia em Superose 12; S-200 = Sephacryl S-200; Proteína total = volume total x concentração protéica da fração determinada pelo método de SEEDMAK e GROSSBERG 1977; atividade total (U) = é definida como a quantidade de enzima requerida para liberar 1  $\mu$ mol p-nitrofenol do por minutos x volume total; atividade específica = atividade total (U)/ proteína total (mg); purificação = Razão entre a atividade específica em cada passo de purificação e a atividade específica do extrato bruto; Recuperação = Percentual de atividade total em cada passo de purificação em relação a atividade total (U) no extrato bruto (100%).

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DA $\beta$ -D-GLICOSIDASE

Para a caracterização da  $\beta$ -GLI foi utilizada a fração (11,5 – 13,5mL) obtida da cromatografia em Superose 12, determinando com esta, como descrito em métodos, a caracterização enzimática e ensaios contra carboidratos (celobiose e lactose) e com fração (11 – 12,5) obtida na Recromatografia foi feito a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

### 4.3.1 Massa molecular

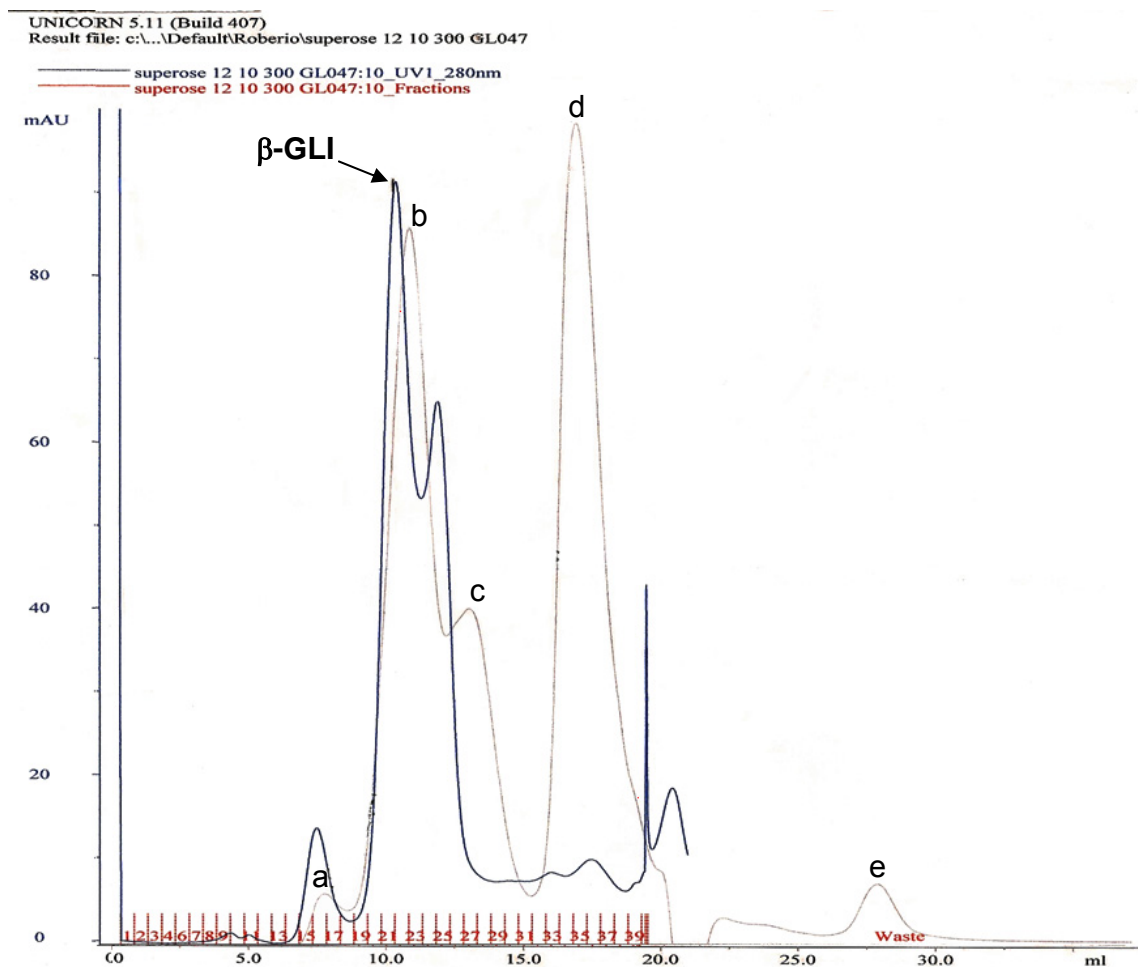
Para avaliar o grau de pureza e determinar a massa molecular aproximada da  $\beta$ -GLI, 9  $\mu$ g da enzima foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e, posteriormente, corada com prata. A análise do gel mostrou uma banda com massa molecular de aproximadamente 52,78 kDa (Figura 07 – (A)). Esse valor foi determinado pela correlação entre o logaritmo do peso molecular versus logaritmo de migração das proteínas (Figura 07 – (B)).



**Figura 07: Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS da  $\beta$ -glicosidase**

**(A)** Gel de poliacrilamida corado com prata, onde: 1- Marcador; 2- Fração com atividade  $\beta$ -D glicosidásica da recromatografia em Superose 12. **(B)** Correlação entre log do peso molecular e o log de migração das proteínas, onde: a ( $\beta$ -galactosidase 116 kDa); b (albumina 66,2 kDa); c (ovoalbumina 45 kDa); d (lactato desidrogenase 35 kDa); e (endonuclease de restrição 25 kDa); f ( $\beta$ -lactoglobulina 18,4 kDa); g (lisozima 14,4 kDa).

A massa molecular da  $\beta$ -GLI determinada pela cromatografia Superose 12 (descrito no item 3.5.2), de acordo com a curva de calibração representa um peso molecular aparente de aproximadamente 157 kDa. Portanto, deduz-se que a  $\beta$ -GLI é uma proteína com três subunidades homólogas, onde cada subunidade tem peso de aproximadamente 52,78 kDa. A figura 08 mostra a eluição das proteínas com peso molecular conhecidos, a  $\beta$ -GLI é eluída a 10,057 mL.



**Figura 08: Cromatografia de exclusão molecular Superose 12 (Calibrada)**

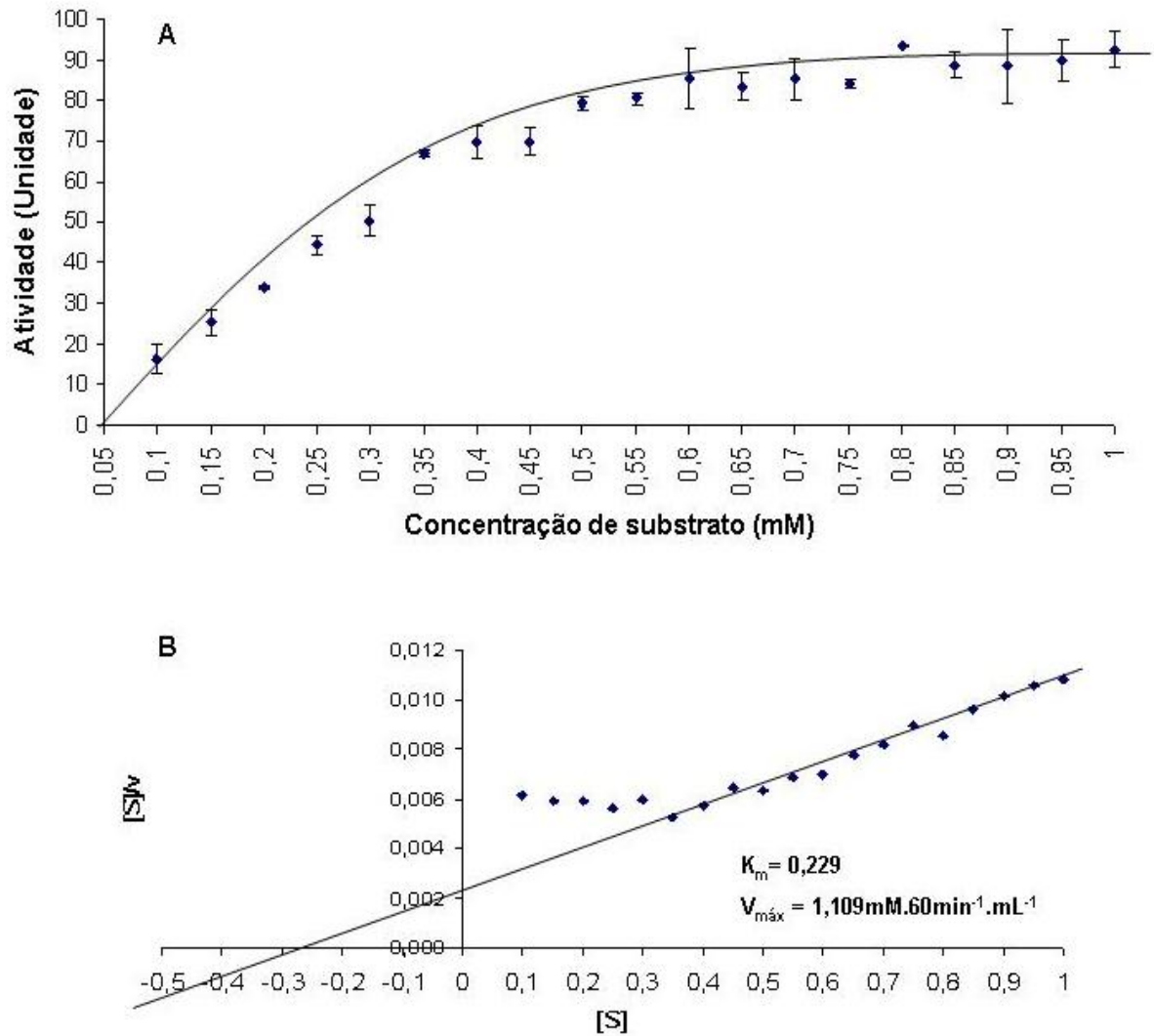
A coluna foi calibrada com proteínas de massas moleculares conhecidas ((a)  $\beta$ -Amilase (200 kDa, 7,449 mL); (b) Álcool Desidrogenase (150 kDa, 10,549 mL); (c) Albumina (66 kDa, 12,718 mL); (d) Anidrase carbônica (29 kDa, 16,612 mL) e (e) Aprotinina (6,5 kDa, 27,572 mL) e pré-equilibrada e eluída com tampão Tris HCl 0,05M, pH 7,5. Foram coletadas frações de 0,5 mL num fluxo de 0,8 mL/min. A eluição das proteínas com pesos moleculares conhecidos foi monitorada com detector UV a 280 nm (—), a eluição da  $\beta$ -D-glicosidase foi monitorada com detector UV a 280 nm (—).

### 4.3.2 Estudos cinéticos da $\beta$ -D-glicosidase

Para os estudos cinéticos foi utilizado a fração com atividade  $\beta$ -D-glicosidásica da Superose 12. A hidrólise do  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo foi avaliada com diferentes concentrações do substrato sintético, tempos de ensaio enzimático, sob a influência de diferentes temperaturas, pH, concentrações de proteína e de prováveis inibidores e competidores.

#### 4.3.2.1 Determinação da constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e Velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ )

Pode - se observar a atividade enzimática sob diferentes concentrações de  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo na figura 09 (A). Após a linearização dos resultados utilizando-se o gráfico de Hanes (Figura 09 (B)) obteve - se um  $K_m$  aparente de 0,229 mM (12,7  $\mu$ M de produto/cm/hora) e  $V_{m\acute{a}x}$  de 1,109 mM.60min<sup>-1</sup>.mL<sup>-1</sup>.

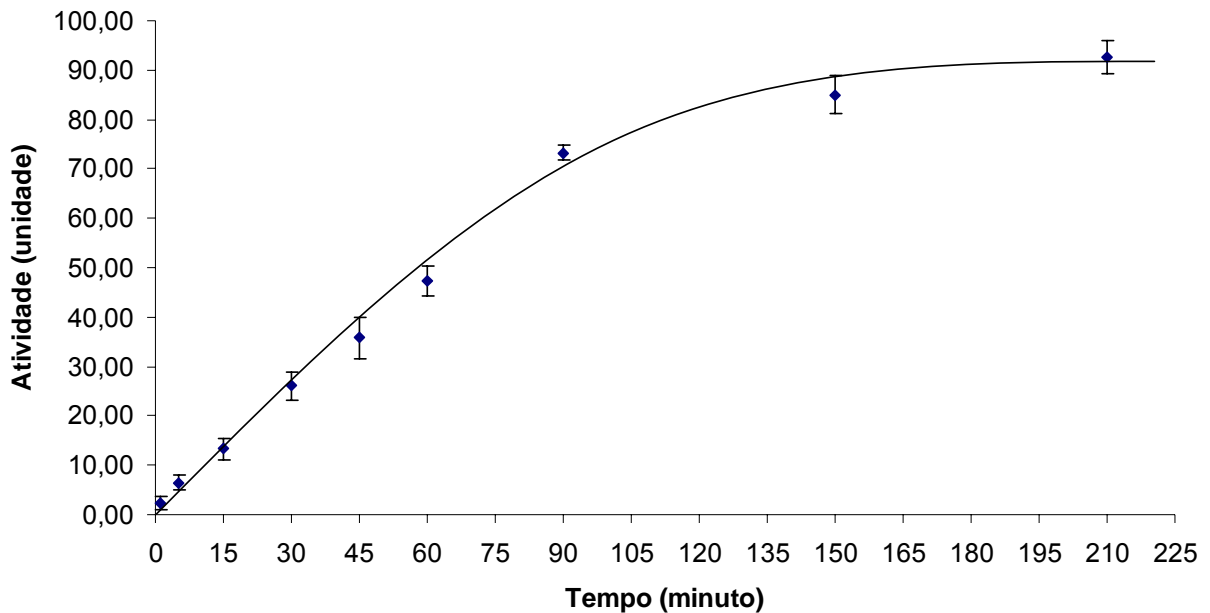


**Figura 09: (A) Efeito da concentração de substrato sobre a velocidade da reação enzimática; (B) Gráfico do duplo recíproco de Hanes (1932).**

Dez  $\mu\text{l}$  da  $\beta$ -GLI, foram incubados junto a concentrações crescentes de *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3; 0,35; 0,4; 0,45; 0,5; 0,55; 0,6; 0,65; 0,7; 0,75; 0,8; 0,85; 0,9; 0,95 e 1 mM) durante uma hora a  $45^\circ\text{C}$ , em pH 5,0. Transcorrido esse tempo, as reações foram interrompidas como descrito no item 3.1.1. 1U corresponde a 0,01 unidade de absorbância a 405nm. (●) Atividade  $\beta$ -D-glicosidase; (—) linha tendência.

#### 4.3.2.2 Influência do tempo sobre a atividade enzimática

O efeito do tempo sobre a atividade da enzima, mostrou que após 150 minutos iniciais de ensaio ocorre diminuição na velocidade da reação (Figura 10). Este fenômeno geralmente se deve a três fatores: consumo de substrato, presença de produtos no sistema ou perda de atividade enzimática.

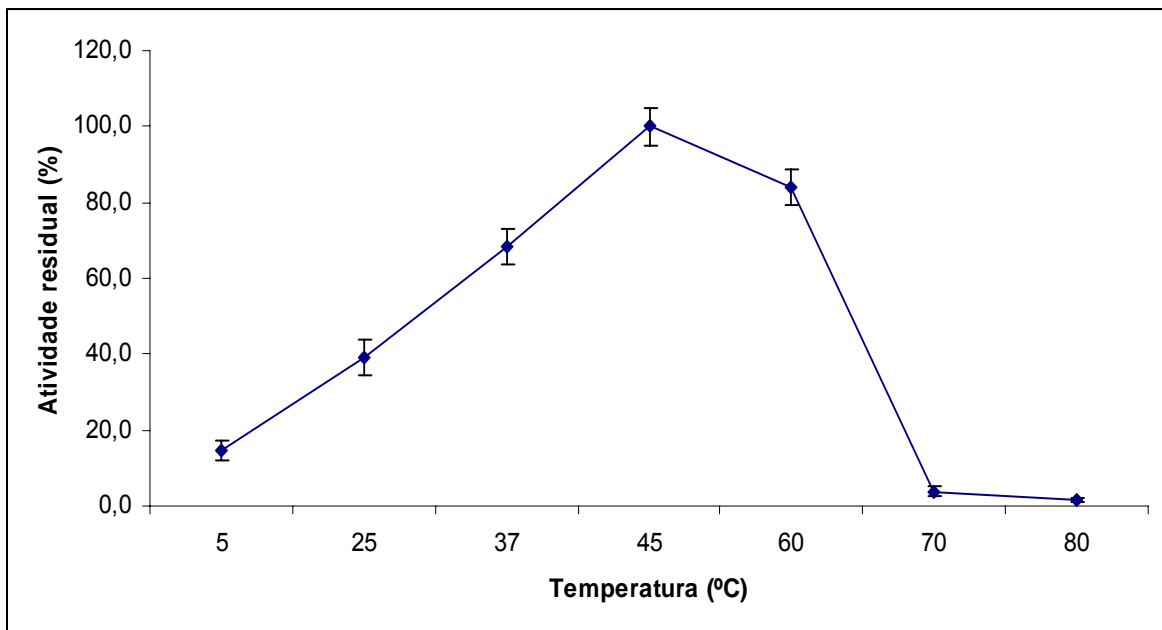


**Figura 10: Efeito do tempo na hidrólise do *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo.**

Cerca de 10 $\mu$ l da  $\beta$ -GLI, foi incubado com 0,7 mM de *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo a 45°C em pH 5,0, durante diferentes intervalos de tempo. Transcorrido cada período, as reações foram interrompidas e o *p*-nitrofenol lido a 405 nm como descrito no item 3.1.1. 1U corresponde a 0,01 unidade de absorbância a 405nm. (•) Atividade  $\beta$ -D-glicosidase; (—) linha tendência.

#### 4.3.2.3 Influência da temperatura sobre a $\beta$ -D-glicosidase

No estudo do efeito da temperatura sobre a atividade da enzima, incubou-se a  $\beta$ -GLI com *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo sob diferentes temperaturas. Após uma hora de ensaio, foi verificado que a 45°C ocorre maior atividade  $\beta$ -D-glicosidásica. Essa atividade decaiu acima e abaixo deste ponto (Figura 11). No entanto, a 37°C e 60°C mais de 50% da atividade enzimática estava presente.



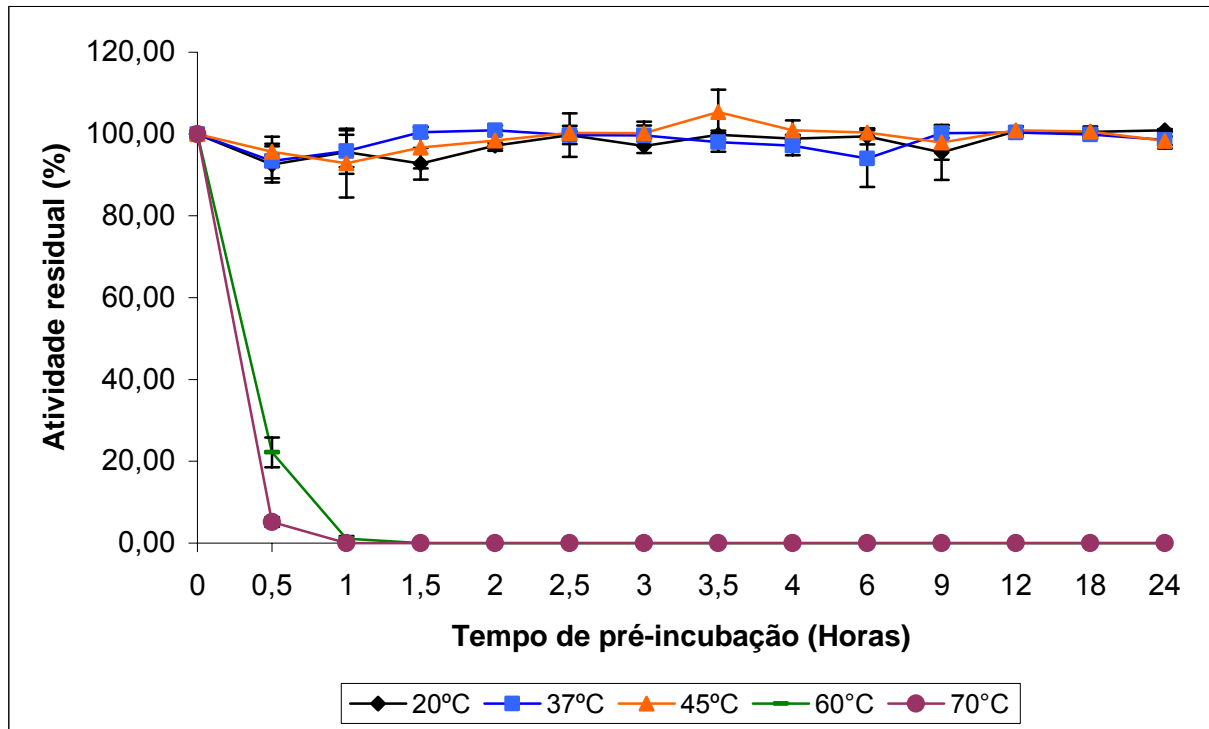
**Figura 11: Influência da temperatura sobre a atividade catalítica da  $\beta$ -D-glicosidase.**

Frações de 10 $\mu$ l da  $\beta$ -GLI, foram incubados com 0,7 mM de *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glicosapiranosídeo durante 1 hora, em pH 5,0 em diferentes temperaturas. Transcorrido esse tempo, as reações foram interrompidas e o *p*-nitrofenol lido a 405 nm como descrito no item 3.1.1. A atividade máxima a 45°C foi considerada como sendo 100%.

A estabilidade térmica da  $\beta$ -GLI (item 3.6.3) foi testada pré-incubando a enzima a diferentes temperaturas (20°C a 70°C) por diferentes tempos (0 à 24h) na ausência do substrato, e a atividade residual foi medida incubando-se a enzima com *p*-nitrofenil-



$\beta$ -D-glicopiranosídeo a 45°C durante uma hora. O resultado mostrou que a  $\beta$ -GLI é estável a 45°C por 24 horas ao passo que, desde os primeiros 30 min. a 60°C e 70°C ocorreu decréscimo considerável na atividade da enzima chegando a total desnaturação térmica da mesma ao final de uma hora (Figura 12).



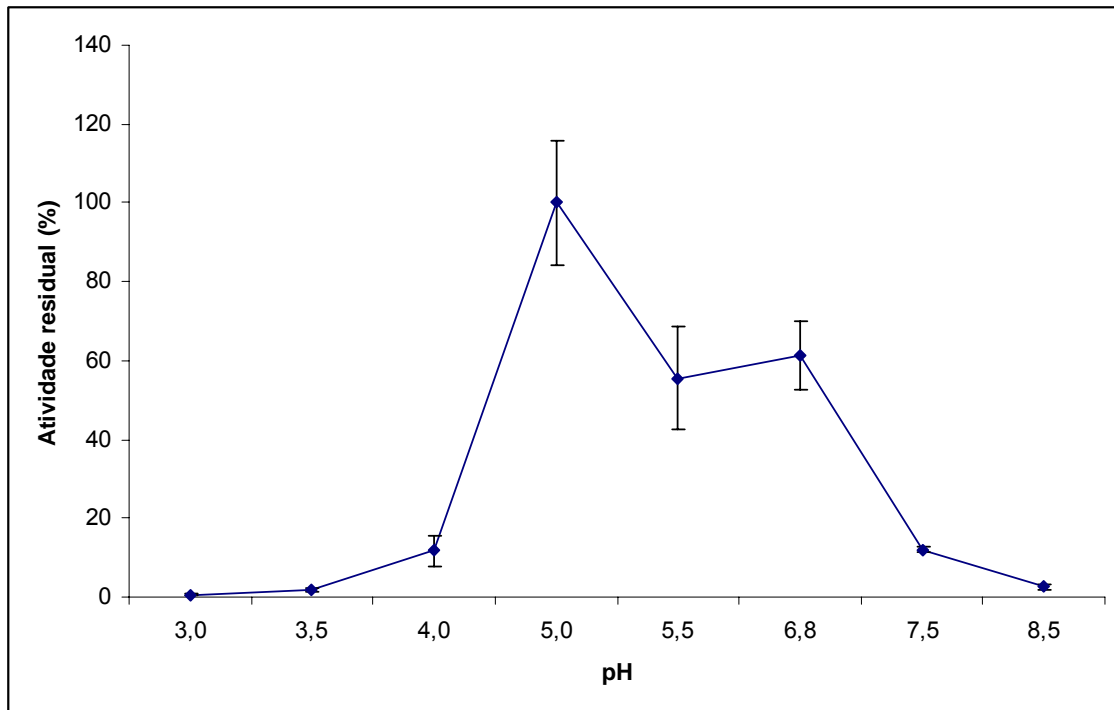
**Figura 12: Efeito da temperatura sobre a estabilidade térmica da  $\beta$ -D-glicosidase.**

Cerca de 10 $\mu$ l da  $\beta$ -GLI, após pré-incubação a diferentes temperaturas, por diferentes períodos, foram submetidos a incubações com 0,7 mM de  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo durante 1 hora a 45°C em pH 5,0. Transcorrido esse tempo, as reações foram interrompidas e o  $p$ -nitrofenol lido a 405 nm como descrito no item 3.1.1.

#### 4.3.2.4 Influência do potencial hidrogeniônico (pH) sobre a atividade enzimática

Nesse experimento observou-se que a maior atividade sobre o substrato sintético ocorreu em pH 5,0 (Figura 13). Essa atividade decaiu consideravelmente em

pHs abaixo e acima deste ponto. No entanto, em pH 5,5 e 6,8 cerca de 50% da atividade ainda está presente.



**Figura 13: Influência do pH na hidrólise do *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo.**

Cerca de 10 $\mu$ l da  $\beta$ -gli, submetida a diferentes pHs, foram incubados com 0,7 mM de *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo durante 1 hora a 45°C, no pH desejado. Transcorrido esse tempo, as reações foram interrompidas e o *p*-nitrofenol lido a 405 nm como descrito no item 3.1.1. A atividade máxima pH 5,0 foi considerada como sendo 100%.

#### 4.3.2.5 Influência de diferentes íons metálicos sobre a atividade $\beta$ -D-glicosidase

Na tabela 03 observa-se a ação de diversos sais sobre a atividade  $\beta$ -D-glicosidásica. Verificou-se que o cloreto de magnésio, cloreto de manganês, cloreto de potássio, cloreto de cálcio potencializaram a ação da enzima. O sulfato de cobre e o nitrato de prata não apresentaram a mesma ação, pelo contrário, o primeiro inibiu 67%

e o segundo inibiu completamente a atividade e o sulfato de zinco não interferiu sobre a atividade enzimática.

**Tabela 03: Efeito de diferentes sais sobre a atividade  $\beta$ -D-glicosidase**

<b>SAIS INORGÂNICOS</b>	<b>ATIVIDADE RESIDUAL (%)</b>
Controle	100
MnCl <sub>2</sub>	155,6 ± 11,0
MgCl <sub>2</sub>	142,2 ± 14,1
KCl	136,1 ± 7,8
CaCl <sub>2</sub>	128,8 ± 19,1
ZnSO <sub>4</sub>	98,0 ± 11,0
CuSO <sub>4</sub>	33,2 ± 4,8
AgNO <sub>3</sub>	0

Alíquotas de 10 $\mu$ l da  $\beta$ -GLI, foram pré-incubadas durante 15 minutos a 45°C com diferentes sais a uma concentração final de 5 mM. Transcorrido este período, foi adicionado o substrato *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo para uma concentração final de 0,7 mM. Novamente o material foi colocado a temperatura de 45°C em pH 5,0, durante 1 hora e as incubações foram interrompidas e o *p*-nitrofenol liberado lido em espectrofotômetro a 405 nm como descrito no item 3.1.1.

#### 4.3.2.6 Efeito de inibidores enzimáticos sobre atividade enzimática

Para verificar a participação de grupos catalíticos da  $\beta$ -GLI envolvidos na degradação do *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo utilizou-se diferentes compostos que possuem atuação em radicais específicos das proteínas. Dos compostos testados o N-

etilmaleimida inibiu a catálise enzimática, o PMSF e o iodoacetamida não modificaram significativamente a atividade de hidrólise da  $\beta$ -GLI sobre o *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (Tabela 04).

**Tabela 04 - Efeito de inibidores enzimáticos**

COMPOSTO	ATIVIDADE RESIDUAL (%)
Controle	100
Iodoacetamida	115,4 $\pm$ 23,4
PMSF	111,4 $\pm$ 17,6
N-etilmaleimida	3,1 $\pm$ 2,7

Alíquotas de 10 $\mu$ l da  $\beta$ -GLI, foram pré-incubadas durante 15 minutos a 45°C na presença de diferentes compostos (iodoacetamida (1mM); PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonil (1mM) e N-etilmaleimida (5mM)). Transcorrido o tempo de pré-incubação adicionou-se *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo para uma concentração final de 0,7 mM. Novamente o material foi colocado a 45°C em pH 5,0 e após uma hora os ensaios foram interrompidos e o *p*-nitrofenol liberado lido em espectrofotômetro a 405 nm como descrito no item 3.1.1.

#### 4.3.2.7 Influência de carboidratos sobre atividade enzimática

Na intenção de verificar a especificidade da  $\beta$ -GLI, a enzima foi ensaiada com *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo na presença de diferentes carboidratos (Tabela 05). A tabela mostra que nenhum dos carboidratos nas diferentes concentrações inibiu a atividade enzimática.

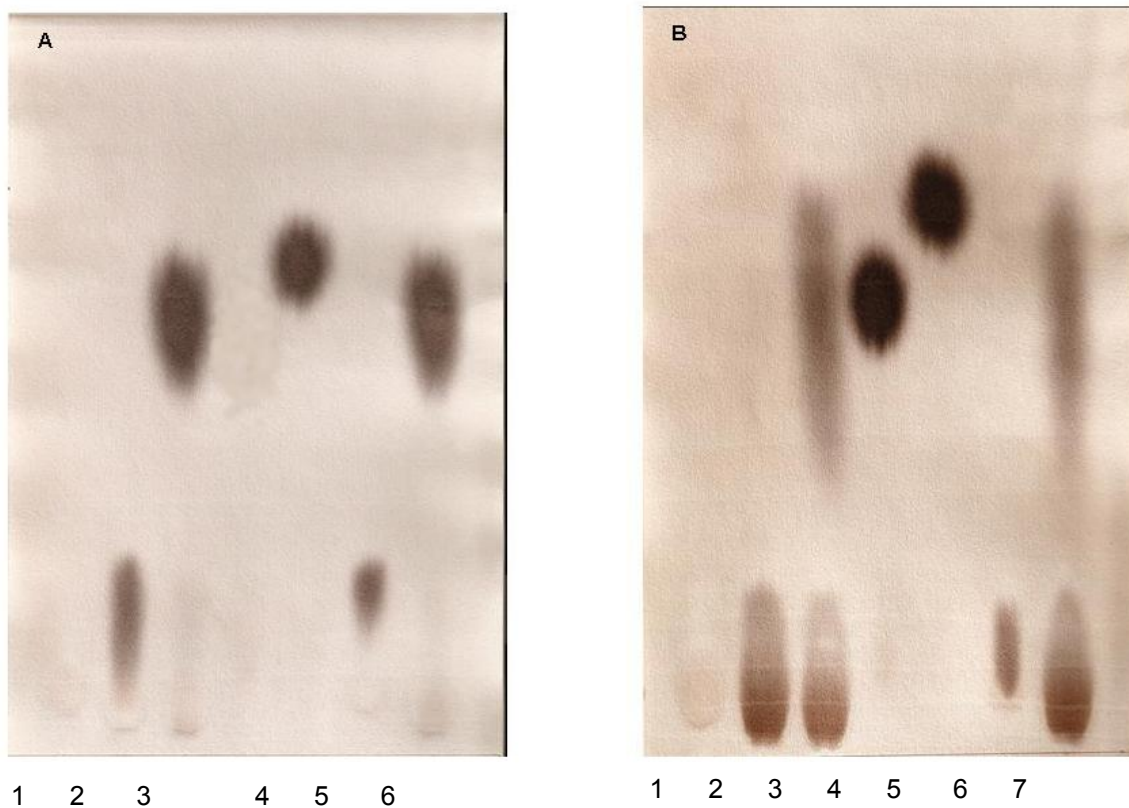
Tabela 05 - Efeito de diferentes carboidratos sobre a atividade  $\beta$ -D-glicosidase.

CARBOIDRATOS	ATIVIDADE RESIDUAL (%)		
	(1 mM)	(5 mM)	(10 mM)
Controle	100	100	100
Glicose	102 $\pm$ 7,8	102 $\pm$ 3,20	96 $\pm$ 1,94
Galactose	102 $\pm$ 4,0	96 $\pm$ 3,12	94 $\pm$ 1,51
Lactose	91 $\pm$ 8,4	101 $\pm$ 3,18	98 $\pm$ 0,52
celobiose	93 $\pm$ 6,4	99 $\pm$ 1,21	96 $\pm$ 1,21

Alíquotas de 10 $\mu$ l da  $\beta$ -GLI, foram pré-incubadas durante 15 minutos a 45°C com mono e dissacarídeos em concentrações finais de 1; 5 e 10 mM. Transcorrido este período, foi adicionado o substrato *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo para uma concentração final de 0,7 mM. Novamente o material foi colocado a temperatura de 45°C em pH 5,0, durante 1 hora e as incubações foram interrompidas e o *p*-nitrofenol liberado lido em espectrofotômetro a 405 nm como descrito no item 3.1.1.

#### 4.3.3 Degradação de lactose e celobiose

Com a  $\beta$ -GLI, foram realizadas incubações com celobiose e lactose por 6 e 18 horas, seguida de cromatografia em papel (sistema descendente) para a visualização da degradação destes carboidratos (Figura 14). A análise quantitativa dessa degradação foi realizada por densitometria dos cromatogramas revelados (Tabela 06). A  $\beta$ -GLI hidrolisa parcialmente esses substratos em 6 horas (dados não mostrados), enquanto que em 18 horas observa-se uma hidrólise total da celobiose e hidrólise parcial da lactose.



**Figura 14 Cromatograma descendente em papel do ensaio de degradação de celobiose e lactose pela  $\beta$ -D-glicosidase**

Cerca de 50 $\mu$ g de carboidratos foram incubados com 50 $\mu$ l da  $\beta$ -D-gli, a 45°C em pH 5,0, durante 18 horas. As misturas de incubação foram submetidas à cromatografia de papel (sistema descendente) conforme descrito no item 3.4. Onde: **(A)**: 1- Enzima (branco da enzima); 2- Celobiose com tampão acetato de sódio 0,1M pH5,0 (branco da celobiose); 3- Celobiose com enzima; 4-Glicose (branco produto); 5- Celobiose com água destilada, sem o efeito do tampão (branco da celobiose); 6- Celobiose com enzima (duplicata). **(B)**: 1- Enzima (branco da enzima); 2- Lactose com tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0 (branco da lactose); 3- lactose com enzima; 4- Galactose (branco do produto); 5-Glicose (branco do produto); 6- Lactose com água destilada, sem o efeito do tampão (branco da lactose); 7- Lactose com enzima (duplicata).

**Tabela 06: Atividade da  $\beta$ -D-glicosidase de *Artemia franciscana* sobre celbiose e lactose em cromatografia de papel**

Substrato	Taxa relativa de hidrolise (%)	
	(6 horas)	(18 horas)
Celbiose	0	0
Celbiose com enzima	56,3	100
Lactose	0	0
Lactose com enzima	23,31	41,42

## 5 DISCUSSÃO

Glicosidases e Sulfatases são importantes ferramentas para estudos de características estruturais de grupos de polissacarídeos e seu papel biológico (KUSAYKIN et al., 2003). O ambiente marinho apresenta uma variedade de fatores abióticos que impulsionam os seres que vivem nesse ambiente desenvolverem adaptações (mutações) para melhor sobreviverem é de se esperar que glicosidases e sulfatases de organismos marinhos apresentem características diferentes daquelas encontradas em organismos terrestres por exemplo.

Dentro deste contexto o grupo de Laboratório de Química em Função de Proteína da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) vem ao longo dos últimos anos, realizando um trabalho de prospecção em busca dessas enzimas que apresenta potencial biotecnológicos (MATTA; ABREU, 2005). Glicosidases (SOUZA, 2003; GOMES, 2006) e sulfatases (MATTA; ABREU, 2005) já foram purificadas pelo grupo e atualmente estudos de caracterização estrutural estão sendo realizados com elas.

Os resultados iniciais obtidos com os ensaios na presença de vários *p*-nitrofenis derivados de açúcar mostraram positividade para todos os *p*-nitrofenis derivados. Esse resultado não foi tão surpreendente assim, pois extratos enzimáticos nos primeiros passos de purificação, geralmente são ricos em diversas atividades. Fato semelhante já foi observado quando soluções protéicas obtidos após fracionamento com sulfato de amônio extraído dos celenterados *Palythae coribaeroum* (SOUZA, 2003); *Palythoa voriabitis* (FERREIRA, 2003); nos moluscos *Chiton sp* (VIEIRA, 2002), *Aplysia cervina* (MATA; ABREU, 2005); Equinoderma *Echinometra lucunter* (LIMA, 2006), foram encontrados frente a diferentes *p*-nitrofenis. Contudo das atividades do extrato de *Artemia franciscana* chamou atenção a  $\beta$ -D-glicosidase.

Atividade  $\beta$ -D-glicosidásica já foi identificada em outros organismos marinhos, como: celenterados, anelídeos, artrópodes, moluscos e equinodermos (KUSAYKIN et al., 2003). Uma possível função dessa enzima seria a degradação de polissacarídeos de reserva de algas, como as laminarinas (1,3; 1,6- $\beta$ -D-glucanas)



(PITSON; SEVIOUR; McDOUGALL, 1997; VILLELA et al., 2006), que seriam a base da alimentação dos invertebrados estudados.  $\beta$ -D-glicosidase de microorganismos vem sendo estudadas a mais de 20 anos (WALLLECHA; MISHRA, 2003) e o foco geral é a descoberta daquelas que possam ser aplicadas biotecnologicamente, principalmente em processos de obtenção de álcool a partir de celulose (CHO; YOO; KANG, 1999).

Após diferentes passos de purificação que combinou gel filtração e cromatografia de troca iônica, foi obtida uma  $\beta$ -D-glicosidase que foi purificada 44,09 vezes com rendimento de 1,01%. Este baixo rendimento pode ter sido causado pela perda de atividade enzimática ao longo do processo de purificação. Este protocolo resultou numa purificação semelhante a um trabalho encontrado na literatura, onde a  $\beta$ -D-glicosidase de semente de maçã (YU et al., 2007) foi purificada 46,1 vezes. Pitson, Seviour e McDougall (1997) utilizando metodologia semelhante purificou uma  $\beta$ -D-glicosidase do fungo *Acremonium persicinum* com purificação de 47 vezes e com rendimento de 13%.

A  $\beta$ -D-glicosidase de *A. franciscana* é uma proteína multimérica com 3 subunidades de similar peso molecular de 52,78 kDa, determinado por SDS-PAGE (Figura 07) e exibe peso molecular de 157 kDa, determinado por cromatografia Superose 12 sob o sistema FPLC AKTA PURIFIER (Figura 08). Esta característica, trimeros, faz com que a  $\beta$ -D-glicosidase de *Artemia franciscana* seja uma proteína rara pois glicosidases com três subunidades é difícil de ser encontrada na natureza. Em geral, a literatura traz exemplos de  $\beta$ -D-glicosidase com massas moleculares variando em uma ampla faixa que vai de 45 a 380 kDa (RODIONOVA et al., 1987; KOHCHI; HAYASHI; NAGAI, 1985; UMEZURIKE, 1991; TEUNISSEN et al., 1992; YU et al., 2007; MARANA; TERRA; FERREIRA, 2000), sendo encontrados como uma, duas, quatro e oito subunidades (TEUNISSEN et al., 1992; YU et al., 2007; MARANA; TERRA; FERREIRA, 2000; RODIONOVA et al., 1987; KOHCHI; HAYASHI; NAGAI, 1985; UMEZURIKE, 1991). Assim, há uma considerável diversidade na estrutura enzimática para diferentes fontes de  $\beta$ -D-glicosidase o que torna, por enquanto, difícil tentar agrupar-la utilizando apenas a massa molecular ou a quantidade de subunidades como parâmetros.

O  $K_m$  da  $\beta$ -D-glicosidase de *A. franciscana* para o  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo foi de 0,229 mM demonstrando que essa enzima possui grande afinidade pelo substrato. Este valor não difere significativamente de alguns valores encontrados em outros organismos, como no caso da  $\beta$ -D-glicosidase isolada da laranja *Tarocco* (BARBAGALLO et al., 2007) onde foi observado um  $K_m$  de 0,267 mM, do fungo *Acremonium persicinum* (PITSON; SERVIOUR; McDOUGALL, 1997) com  $K_m$  de 0,3 mM e em *Spodoptera frugiperda* (MARANA; TERRA; FERREIRA, 2000) com  $K_m$  de 0,32 mM. Entretanto, outros estudos encontram valores de  $K_m$  mais elevados como no caso da  $\beta$ -D-glicosidase extraída da abelha *Apis mellifera* (LOW; PONTOH, 2002) onde se observou  $K_m$  de 11,3 mM e em mamíferos (LAMBERT et al., 1999) que apresentou  $K_m$  de 1,3mM.

A influência do tempo sobre a atividade catalítica da  $\beta$ -D-glicosidase de *A. franciscana* mostrou que após 150 minutos iniciais de ensaio ocorreu diminuição na velocidade da reação (Figura 10. Fato este pode ter ocorrido devido a três fatores: ao consumo de todo o substrato sintético, perda da atividade enzimática ou inibição pelo produto de reação. Relacionando-se a concentração de  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (0,7mM) utilizada, com o valor máximo de absorvância observado no experimento (0,800) e o coeficiente de extinção molar deste substrato ( $18,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), menos de meio por cento foi degradado. Desta forma existe ainda substrato no sistema e a quantidade de produtos é mínima, não interferindo na velocidade da reação. Portanto, a diminuição na velocidade da reação provavelmente deve-se a perda de atividade enzimática.

A temperatura ótima de catálise da  $\beta$ -D-glicosidase de *A. franciscana* (após uma hora de ensaio a diferentes temperaturas) foi 45°C. Essa atividade decaiu em temperatura acima e abaixo deste ponto (Figura 11. No entanto a 37°C cerca de 70% e em 60°C cerca de 80% de atividade ainda estavam presentes. A pré-incubação da enzima em diferentes temperaturas revelou que a  $\beta$ -D-glicosidase do invertebrado em estudo é estável por 24h a 45°C. A 60°C ocorre perda de 80% da atividade catalítica, após 30 min de pré-incubação, chegando essa atividade ser inibida após uma hora, enquanto que a 70°C a enzima fica praticamente inativa após 30 minutos de pré-incubação. Esse resultado mostra que a enzima em estudo possui características quanto à temperatura ótima, semelhante a  $\beta$ -D-glicosidase

extraída do limão *Podophyllum peltatum* a qual possui atividade ótima na temperatura ótima de 45°C (DAYAN et al. 2003). Entretanto existem relatos na literatura de outras  $\beta$ -D-glicosidase com temperaturas ótimas, diferentes da encontrada para a *A. franciscana*. Algumas possuem temperatura ótima acima do valor encontrado para  $\beta$ -D-glicosidase de *A. franciscana* como no caso da  $\beta$ -D-glicosidase extraída da bactéria *Sulfolobus shibatae* (98°C) (WOLOSOWSKA; SYNOWIECKI, 2004) do fungo *Talaromyces emersonii* (71,5°C) (MURRAY et al., 2004) e *Pichia etchellsii* (50°C) (WALLECHA; MISHRA, 2003), outras possuem temperatura ótima abaixo dos valores encontrados para a  $\beta$ -D-glicosidase de *A. franciscana* como nas leveduras *Debaryomyces pseudopolymorphus* 40°C (VILLENA et al., 2006) e *Saccharomyces cerevisiae* (20°C) (SPAGNA, 2002). Esses dados mostram que existe diferença de  $\beta$ -D-glicosidase quanto a temperatura ótima de catálise, de acordo com a fonte de  $\beta$ -D-glicosidase.

O pH ótimo encontrado para a hidrólise, do  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo foi 5,0; essa atividade diminuiu em pH abaixo e acima deste ponto. No entanto, em pH 5,5 e 6,8 mais de 50% da atividade estava presente. A enzima foi totalmente inibida em pH 3,0 (Figura 13). Um pH ótimo em torno de 5,0 também foi registrado para  $\beta$ -D-glicosidase extraída do limão *Podophyllum peltatum* (DAYAN et al., 2003), para  $\beta$ -D-glicosidase da abelha *Apis mellifera* (LAW; PONTOH, 2002) e para  $\beta$ -D-glicosidase do molusco *Achatina fulica* (HU et al., 2007). Entretanto há relatos na literatura de outros valores de pH ótimo. Algumas  $\beta$ -D-glicosidase são ativas em pH ácido como a  $\beta$ -D-glicosidase termoestável do fungo *Talaromyces emersonii* com pH ótimo de 4,02 (MURROY et al., 2004) e  $\beta$ -D-glicosidase da bactéria *Thermotoga marítima* com pH ótimo entre 3,2 e 3,5 (KIM; SINGH; HAYASHI, 2006). Outras enzimas com mesma atividade são ativas em pH básico como a  $\beta$ -D-glicosidase extraída do fungo *Pichia et chellsii* com pH ótimo de 6,0 e da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* com pH ótimo entre 6,5 e 8,0 (KIM; SINGH; HAYASHI, 2006). Assim como ocorre com a temperatura, as  $\beta$ -D-glicosidase apresentaram um espectro muito grande em relação ao seu pH ótimo. Esta variabilidade é muito dependente da fonte que foi extraída a enzima. Provavelmente, no futuro, quando as estruturas 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> de muitas dessas enzimas estiverem resolvidas, muitas das

características estruturais que determinam o pH e a temperatura ótimos das  $\beta$ -D-glicosidase serão conhecidas.

Vários íons metálicos informados para efetores da  $\beta$ -GLI foram examinados. De todos os testes químicos para inibição da atividade enzimática, somente o cobre e a prata inibiram a atividade catalítica sobre o  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (Tabela 4). Duas isoformas da  $\beta$ -D-glicosidase extraídas da levedura *Pichia et chellsii* foram inibidas pelo cobre (WALLECHA; MISHRA, 2003), uma  $\beta$ -D-glicosidase do limão *Podophyllum peltatum* (DAYAN et al., 2003), da bactéria *Sulfolobus shibatae* (WOLOSOWSKA; SYMOWIECKI, 2003) e da soja *Glycine max* (HSIEH; GRAHAM, 2001) foram inibidos pelo cobre e pela prata. Esses dados na literatura mostram que é comum a inibição da  $\beta$ -D-glicosidase por esses íons. Grupos Sufidril (SH) na estrutura da enzima geralmente são necessários para que esses íons possam inibir a enzima (WALLECHA; MISHRA, 2003; HSIEH; GRAHAM, 2001), indicando a participação direta do aminoácido cisteína para atividade enzimática.

Este fato foi confirmado pela inibição da  $\beta$ -GLI em estudo pelo N-etilmaleimida (Tabela 4), estas substâncias reagem com grupos SH. A importância dos grupos SH consiste no fato dos resíduos de cisteína estarem envolvidos na estabilidade e atividade enzimática da  $\beta$ -D-glicosidase (HSIEH; GRAHAM, 2001). PMSF, que atua como um eficiente inibidor enzimático que interage com histidina e serina no sítio ativo (WOLOSOWSKA; SYMOWIECKI, 2003) não afetou a atividade da  $\beta$ -GLI, indicando que estes aminoácidos não possuem um papel essencial na atividade da  $\beta$ -GLI de *A. franciscana*.

A não inibição da enzima por cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) é um ponto positivo, pois esta enzima pode ser utilizada para quebrar a lactose, diminuindo assim os efeitos causados por este açúcar por indivíduos com intolerância à lactose.

O efeito de vários carboidratos (glicose, galactose, lactose e celobiose na concentração final 1,0; 5,0 e 10 mM) sobre a hidrólise do  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo pela  $\beta$ -D-glicosidase de *A. franciscana* foi estudada (Figura 5), nenhum carboidrato inibiu a atividade enzimática. Um resultado contrário foi

encontrado na  $\beta$ -D-glicosidase do fungo *Talaromyces thermophilus* (NAKKHARAT; HALTRICH, 2006) onde glicose e galactose inibiram 42% e 13%, respectivamente. Entretanto uma  $\beta$ -D-glicosidase extraída da levedura *Saccharomyces cerevisiae* não é inibida pela glicose (SPAGNA et al., 2002). A maioria das  $\beta$ -D-glicosidases de microorganismos que catalizam a hidrólise de celobiose são inibidas por glicose, que limita sua atividade. Além disso, a enzima é também inibida por seu próprio substrato (SAHA; BOTHAST, 1996). A não inibição da  $\beta$ -GLI de *A. franciscana* pela glicose e celobiose é favorável para uma possível aplicação na produção de bioetanol, produzindo glicose a partir de celobiose e assim potencializando um sistema de produção de açúcar fermentáveis a partir da celulose.

A  $\beta$ -GLI purificada apresentou atividade degradativa sobre celobiose, lactose e  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo. Mostrando que atividade  $\beta$ -glicosidásica e  $\beta$ -galactosidásica residem na mesma enzima, mostrando ampla especificidade da enzima, por atuar em ligações entre duas glicose e glicose e galactose. Esse fenômeno é bastante comum, sendo encontrado em  $\beta$ -D-glicosidase das bactérias *Sulfolobus shibatae* (WOLOSOWSKA; SYNOWIECKI, 2004), *Thermus flavus* (KANG et al., 2005), fígado de porco da Índia *Cavia porcellus* (HAYS et al., 1996) e lepidoptera *Spodoptera frugiperda* (MARANA; TERRA; FERREIRA, 2000). Essa característica de atividade sobre ambos,  $\beta$ -glicosídeos e  $\beta$ -galactosídeos, é comum da  $\beta$ -D-glicosidase da família GH – 1 (LI; LEE, 1999), entretanto não se pode afirmar que a  $\beta$ -GLI de *A. franciscana* pertence a esta família, pois para isso é necessário determinar a seqüência de aminoácidos, e até o momento isso não foi feito, sendo essa etapa a próxima meta a ser realizada com a  $\beta$ -GLI da *A. franciscana*.

Este estudo corrobora com outros estudos que mostram que glicosidases e sulfatases são comuns em invertebrados marinhos. Isto tem sido confirmado em estudos do laboratório onde foram identificadas nos celenterados *Palythae coribaeroum* (SOUZA, 2003); *Palythoa voriabitis* (FERREIRA, 2003); nos moluscos *Chiton sp* (VIEIRA, 2002), *Aplysia cervina* (MATA; ABREU, 2005); Equinoderma *Echinometra lucunter* (LIMA, 2006), e também em Celenterados, Anelídeos, Artrópodes, moluscos e Equinodermas pelo Laboratory of Enzyme Chemistry of the Pacific Institute of Bioorganic Chemistry (KUSAYKIN et al., 2003). Além disso,

conseguiu-se purificar uma  $\beta$ -GLI, com atividade  $\beta$ -D-galactosidásica, que apresenta uma excelente estabilidade térmica e tolerância a altas concentrações de glicose. Propriedades que estão sendo procuradas atualmente em glicosidasas por grupos que tentam desenvolver tecnologia para obtenção de etanol a partir de celulose.

## 6 CONCLUSÕES

- *Artemia franciscana* possui diversas glicosidases, que provavelmente, estão envolvidas no metabolismo de carboidratos e glicoconjugados;
- A  $\beta$ -D-glicosidase de *A. franciscana* é, provavelmente, uma proteína multimérica constituída por três subunidades idênticas de massa molecular de aproximadamente 53 kDa (determinada por SDS-PAGE), totalizando uma massa molecular total de 157 kDa determinada por cromatografia de gel filtração;
- Refletindo a remoção de proteínas do sistema e a atividade enzimática detectada em todas as etapas utilizadas para a purificação das enzimas, a  $\beta$ -D-glicosidase foi purificada 44,09 vezes e com recuperação de 1,01%;
- Possui um  $K_m$  aparente de 0,229 mM e  $V_{m\acute{a}x.}$  de 1,109 mM.60min<sup>-1</sup>.mL<sup>-1</sup> na catálise do substrato sintético;
- A  $\beta$ -D-glicosidase, apresentou uma excelente estabilidade térmica durante 24 horas a 20°C, 37°C e 45°C. Tendo temperatura ótima a 45°C;
- Apresenta um pH ótimo de 5,0;
- Radicais sulfidríla estão envolvidos na catalise enzimática do substrato sintético, devido à alta sensibilidade da enzima a N-etilmaleimida e prata;

- $\beta$ -D-glicosidase não foi inibida por glicose, galactose, celobiose e lactose, pois estes não interferem na hidrólise do substrato sintético;
- A  $\beta$ -D-glicosidase possui alta atividade degradativa sobre a celobiose e parcial atividade sobre a lactose, indicando potencial uso industrial desta enzima.



## REFERÊNCIAS

AGUIAR, C.L.; MENEZES, T.J.B. Conversão enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n°26, p.52 – 55, 2002.

AMAT, F. Biología de *Artemia*. Instituto de Acuicultura de Torres de la Sal. Ribera de Cabanes (Castellon), **Int.Tecn.Inv.Pesq.**,1985.

ANTRANIKIAN, G.; SUNNA, A.; MORACI, M.; ROSSI, M. Glycosil hydrolases from hyperthermophiles. **Extremophiles**, v.1, p.2 – 13, 1997.

ARTHAN, D.; KITTAKOOP, P.; ESEN, A.; SVASTI, J. Furostanol glycoside 26-O- $\beta$ -glucosidase from the leaves of *Solanum torvum*. **Phytochemistry**, v.67, p.27 –33, 2006.

BARBAGALLO, R.N.; PALMERI, R.; FABIANO, S.; RAPISARBA, P.; SPAGNA, G. Characteristic of  $\beta$ -glucosidase from Sicilian blood oranges in relation to anthocyanin degradation. **Enzyme and Microbial Technology**, v.41, p.570 – 575, 2007.

BRINES SHRIMP. Disponível em: <[www.brineshrimpdirect.com](http://www.brineshrimpdirect.com)>. Acesso em: 20 fev 2008.

BROOKS, D.A.; KAKAVANOS, R.; LEHN, P.; CALLEBAUT, I.; MEIKLE, P.J.; LAWRENCE, E.J.P.; HOPWOOD, J.J. Common antigenicity for two glycosidases. **FEBS Letters**, v.580, p.87 – 92, 2006.

CAI, Y.J.; BUSWELL, J.A.; CHANG S.T.  $\beta$ -Glucosidase components of the cellulolytic system of the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.22, p.122 – 129, 1998.

CHO, K. M.; YOO, Y. J.; KANG, H. S.  $\delta$ -Integration of endo/exo-glucanase and  $\beta$ -glucosidase genes into the yeast chromosomes for direct conversion of cellulose to ethanol. **Enzyme and Microbial Technology**, v.25, p. 23 – 30, 1999.

CHANG, M.Y.; JUANG, R.S. Use of chitosan-clay composite as immobilization support for improved activity and stability of  $\beta$ -glucosidase. **Biochemical Engineering Journal**, v.35, p.93 – 98, 2007.

COUTINHO, P.M.; HENRISSAT, B. **Carbohydrate-Active Enzymes** server at URL. Disponível em: <<http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html>> Acesso em: 19 fev 2008.

DAYAN, F.E.; KUHAJEK, J.M.; CANEL, C.; WATSON, S.B.; MORAES, R.M. *Podophyllum peltatum* possesses a  $\beta$ -glucosidase with high substrate specificity for the aryltetralin lignan podophyllotoxin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1646, p.157 – 163, 2003.

DAY, A.J.; CANADA F.J.; DÍAZ, J.C.; KROOM, P.A.; MCLAUCHLAN, R.; FAULDS, C.B.; PLUMB, G.W.; MORGAN, M.R.A.; WILLIAMSON, G. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. **FEBS Letters**, v.468, p.166 – 170, 2000.

FERREIRA, P.A. **Purificação parcial e caracterização de uma  $\beta$ -N-acetilglucosaminidase de *Palythoa variabilis***. Dissertação de Mestrado em bioquímica - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte-RN, 2003.

FLACHNER, B.; BRUMBAUER, A.; RECZEY, K. Stabilization of  $\beta$ -glucosidase in *Aspergillus phoenicis* QM 329 pellets. **Enzyme and Microbial Technology**, v.24, p.362–367, 1999.

GLEW, R.H.; HAYS, W.S.; JENISON, S.A.; YAMADA, T.; PASTUSZYN, A. Primary structure of the cytosolic  $\beta$ -glucosidase of guinea pig liver. **Biochemistry journal**, v.319, p.829 – 837, 1996.

HAKULINEN, N.; PAAVILAINEN, S.; KORPELA, T.; ROUVINEN, J. The crystal structure of  $\beta$ -glucosidase from *Bacillus circulans* sp. *Alkalophilus*: Ability to form long polymeric assemblies. **J. Struct. Biol.**, v.129, p.69 – 79, 2000.

HAMOM, V.; DALLET, S.; LEGOY, M.D. The pressure-dependence of two  $\beta$ -glucosidases with respect to their thermostability. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1294, p.195 – 203, 1996.

Hanes, C.S. An introduction to enzyme kinetics. In: PRINCE, N.C.; STEVENS, L. **Fundamentals of enzymology The Cell and molecular biology of catalytic proteins**. 3 ed. New York: Oxford, 1999. cap. 4.

HAYS, W.S.; JENISSON, S.A.; YAMADA, T.; PASTUSZYN, A. GLEW, R.H. Primary structure of the cytosolic  $\beta$ -glucosidase of guinea pig liver. **Biochemistry journal**, v.319, p.829 – 837, 1996.

HENRISSAT, B.A. classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemistry journal**, v.280, p.309-315, 1991.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, **Biochemistry journal**, v.293, p.781-788, 1993.

HIRATAKE, J.; INOUE, K.; MIZUTANI, M.; TAKADA, M.; YAMAMOTO, M.; SAKATA, K.  $\beta$ -Glycosylamidine as a ligand for affinity chromatography tailored to the glycon substrate specificity of  $\beta$ -glycosidases. **Carbohydrate Research**, v.338, p.1477 – 1490, 2003.

HOSEL, W.; SURHOLT, E.; BORGMANN, E. Characterization of  $\beta$ -glucosidase isoenzymes possibly involved in lignification from Chick Pea (*Cicer arietinum* L.) cell suspension cultures. **Europe Journal Biochemistry**, v.84, p.487-492, 1978.

HSIEH, M.C.; GRAHAM, T.L. Partial purification and characterization of a soybean  $\beta$ -glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. **Phytochemistry**, v.58, p.995 – 1005, 2001.

HU, Y.; LUAN, H.; HAO, D.; XIAO, H.; YANG, S.; YANG, L. Purification and characterization of a novel ginsenoside-hydrolyzing  $\beta$ -D-glucosidase from China white jade snail (*Achatina fulica*). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p.1358 – 1366, 2007.

GOMES, J.J.E. **Purificação e caracterização de uma  $\beta$ -N-acetilhexosaminidase extraída do mamífero marinho *Sotalia fluviatilis***. Dissertação de Mestrado em bioquímica - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte-RN, 2006.

KANG, S. K.; CHO, K. K.; AHN, J. K.; HANG, S. H.; LEE, S. H.; LEE, H. G.; CHOI, Y. J. Cloning, expression, and enzyme characterization of thermostable  $\beta$ -glycosidase from *Thermus flavus* AT-62. **Enzyme and Microbial Technology**, v.37, p.655 – 662, 2005.

KIM, B.J.; SINGH, S.P.; HAYASHI, K. Characteristics of chimeric enzymes constructed between *Thermotoga maritime* and *Agrobacterium tumefaciens*  $\beta$ -glucosidases: Role of C-terminal domain in catalytic activity. **Enzyme and Microbial Technology**, v.38, p 952 – 959, 2006.

KROON, P.A.; BERRIN, J.G.; MCLAUCHLAN, W.R.; NEEDS, P.; WILLIAMSON, G.; PUIGSERVER, A.; JUGE, N. Functional expression of human liver cytosolic  $\beta$ -glucosidase in *Pichia pastoris*. **Europe Journal Biochemistry**, v. 269, p. 249 -258, 2002.

KOHCHI, C.; HAYASHI, M.; NAGAI, S. Purification and properties of  $\beta$ -glucosidase from *Candida pelliculosa* var. *acetaetherius*. **Agri. Biol. Chem.**, v. 49, p. 779 - 784, 1985.

KUSAYKIN, M.I.; BURTSEVA, Y.V.; SVETASHEVA, T.G.; SOVA, V.V.; NVYAGINTSEVA, T.N. Distribution of O-glycosulhydrolases in marine invertebrates. Enzyme of the marine mollusk *Littorina kurila* that catalyze fucoidan transformation. **Biochemistry (Moscow)**, v. 68, p. 317 – 324, 2003

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. **Nature**, v.227, p.680-692, 1970.

LAMBERT, N.; KROON, P.A.; FAULDS, C.B.; PLUMB, G.W.; MCLAUCHLAN, W.R.; DAY, A.J; WILLIAMSON, G. Purification of cytosolic  $\beta$ -glucosidase from pig liver and its reactivity towards flavonoid glycosides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1435, p.110 – 116, 1999.

LANGSTON, J.; SHEEHY, N.; XU, F. Substrate specificity of *Aspergillus oryzae* family 3  $\beta$ -glucosidase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1764, p.972 – 978, 2006.

LEAH, R.; KIGEL, J.; SVENDSENI, I.; MUNDY, J. Biochemical and molecular characterization of a Barley and molecular characterization of a barley seed  $\beta$ -glucosidase. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, p.15789 – 15797, 1995.

LI, Y.K.; LEE, J.I. Cloning and expression of  $\beta$ -glucosidase from *Flavobacterium meningosepticum*: A new member of family B  $\beta$ -glucosidase. **Enzyme and Microbial Technology**, 24, 144 – 150, 1999.

LIMA, A. L. M. **Purificação e caracterização parcial de duas N-acetil- $\beta$ -hexosaminidases do equinoderma marinho *Echinometra lucunter***. Dissertação de Mestrado em bioquímica - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte-RN, 2006.

LOW, N.H; PONTOH, J. Purification and characterization of  $\beta$ -glucosidase from honey bees (*Apis mellifera*). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.32, p.679 - 690, 2002.

LYND, L.R.; WEIMER, P.L.; VANZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.66, p.506-577, 2002.

MALEY, F.; TRIMBLE, R.B.; TARENTINO, A.L.; PLUMMER, T.H.J. Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. **Analytical Biochemistry**, v.180, p.195-204, 1989.

MARANA, S.R.; TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Purification and properties of a  $\beta$ -glycosidase purified from midgut cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.30, p.1139 – 1146, 2000.

MARQUES, A.; DHONT, J.; SORGELOOS, P.; BOSSIER, P. Evaluation of different yeast cell wall mutants and microalgae strains as feed for gnotobiotically grow brine shrimp *Artemia franciscana*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.312, p.115 – 136, 2004.

MATTA, L.D.M.; ABREU, L.R.D. Glicosidases e sulfatases no molusco marinho *Aplysia cervina*. **Arq. Inst. Biol.**, v. 72, p.205 – 210, 2005.

MATUSIEWICZ, M.; KORPACKA, M.K.; DABROWSKI, K. Characterization of arylsulfatase activity in brine shrimp, *Artemia salina*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.317, p.175 – 187, 2005.

MELO, E.B.; CARVALHO, I.  $\alpha$  e  $\beta$  glucosidases como alvos moleculares para desenvolvimento de fármacos. **Química Nova**, v.29, p.840 - 843, 2006.

MURRAY, P.; ARO, N.; COLLINS, C.; GRASSICK, A.; PENTILA, M.; SALOHEIMO, M.; TUOHY, M. Expression in *Trichoderma reesei* and characterization of a thermostable family 3- $\beta$ -glucosidase from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces emersonii*. **Protein Expression and Purification**, v.38, p. 248 – 257, 2004.

NAKHARAT, P.; HALTRICH, D. Purification and characterisation of an intracellular enzyme with  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -galactosidase activity from the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus* CBS 236.58. **Journal of Biotechnology**, v. 123, p. 304 – 313, 2006.

OYEKOLA, O.O.; NGESI, N.; WHITELEY, C.G. Isolation, purification and characterisation of an endoglucanase and  $\beta$ -glucosidase from an anaerobic sulphidogenic bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.637 – 644, 2007.

PANIZZI, M.C.C.; BORDINGNON, J.R. Activity of  $\beta$ -glucosidase and levels of isoflavone glucosides in soybean cultivars affected by the environment. **Pesquisa agropecuaria brasileira**, v.35, p.873 – 878, 2000.

PESELA, B.C.C.; MATEO, C.; FUENTES, M.; VIAN, A.; GARCÍA, J.L.; CARRASCOSA, A.V.; GUISÁN, J.M.; LAFUENTE, R.F. The immobilization of a thermophilic  $\beta$ -galactosidase on Sepabeads supports decreases product inhibition complete hydrolysis of lactose in dairy products. **Enzyme and Microbial Technology**, v.33, p.199 – 205, 2003.

PITSON, S.M.; SEVIOUR, R.J.; McDOUGALL, B.M. Purification and characterization of an extracellular  $\beta$ -glucosidase from the filamentous fungus *Acremonium persicinum* and its probable role in  $\beta$ -glucan degradation. **Enzyme and Microbial Technology**, v.21, p.182 – 190, 1997.

PONTES, C.S.; ANDREATTA, E.R. Efeito da oferta de náuplios de *Artemia franciscana* enriquecidos com ácidos graxos poliinsaturados sobre o desenvolvimento de pós-larvas do camarão marinho *Farfantepenaeus paulensis*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, p.1544 – 1550, 2003.

POULTON, J.E. Cyanogenesis in Plants. **Plant Physiol**, v.94, p.401-405, 1990.

RIGDEN, D.J. Interactive database searches demonstrate that glycoside hydrolase families 27, 31, 36 and 66 share a common evolutionary origin with family 13. **FEBS Letters**, v.523, p.17-22, 2002.

RODIONOVA, N.A.; TAVOBILOV, I.M.; MARTINOVICH, L.L.; BUACHIDZE, T.S.; KVESITADZE, G.I.; BEZBORODOV, A.M.  $\beta$ -Glucosidase from cellulolytic fungi *Aspergillus terreus*, *Geotrichum candidum*, and *Trichoderma longibrachiatum* as typical glycosidases. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 9, p.239-250, 1987.

ROTREKL, V.; NEJEDLA, E.; KUCERA, I.; ABDALLAH, F.; PALME, K.; BRZOBOHATY, B. The role of cysteine residues in structure and enzyme activity of a maize  $\beta$ -glucosidase. **Europe Journal Biochemistry**, v.266, p.1056 – 1065, 1999.

SAHA, B.C.; BOTHAST, R.J. Production, purification, and characterization of a highly glucose - Tolerant novel  $\beta$ -glucosidase from *Candida peltata*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3165–3170, 1996.

SEEDMAK, J.J.; GROSSBERG S.E. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. **Analytical Biochemistry**, v.79, p.544 - 552, 1997.

SOUZA, D.S.L. **Purificação e caracterização de uma  $\beta$ -N-acetilhexosaminidase identificada em extratos protéicos de *Palythoa caribaeorum***. Dissertação de Mestrado em bioquímica - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte-RN, 2003.

SPAGNA, G.; BARBAGALLO, R.N.; PALMERI, R.; RESTUCCIA, C.; GIUDICI, P. Properties of endogenous  $\beta$ -glucosidases of a *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from Sicilian musts and wines. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 1030 – 1035, 2002.

SPENCER, J.W.; DAVIES, G.J. Protein-carbohydrate interactions: learning lessons from nature. **Trends in Biotechnology**, v.19, p.356-362, 2001.

STAM, M.R.; BLANC, E.; COUTINHO, P.M.; HENRISSAT, B. Evolutionary and mechanistic relationships between glycosidases acting on  $\alpha$ - and  $\beta$ - bonds. **Carbohydrate Research**, v.340, p.2728 - 2734, 2005.

TRAVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P.; HARRISON, J.S. Detection of sugars on paper chromatograms. **Nature (London)**, v.166, p.444 – 445, 1950.

TEUNISSEN, M. J.; LAHAYE, D. H. T. P.; HUIS, J. H. J.; VOGELS, G. D. Purification and characterization of an extracellular  $\beta$ -glucosidase from the anaerobic fungus *Pyromyces* sp. strain E2. **Archives of Microbiology**, v.158, p.276 - 281, 1992.

TURNER, P.; SVENSSON, D.; ADLERCREUTZ, P.; KARLSSON, E.N. A novel variant of *Thermotoga neapolitana*  $\beta$ -glucosidase B is an efficient catalyst for the synthesis of alkyl glucosides by transglycosylation. **Journal of Biotechnology**, v.130, p.67 – 74, 2007.

UMEZURIKE, G.M. The octameric structure of  $\beta$ -glucosidase from *Botryodiplodia theobromae* Pat. **Biochemistry journal**, v.275, p.721 - 725, 1991.

VIEIRA, V.K.B. **Detecção e caracterização parcial da  $\beta$ -N-Acetilglucosaminidase em extratos de gônadas do molusco *Chiton* sp.** Dissertação de Mestrado em bioquímica - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte-RN, 2002.

VILLENA, M.A.; IRANZO, J.F.U.; GUNDLLAPALLI, S.B.; OTERO, R.R.C; PÉREZ, A.I.B. Characterization of an exocellular  $\beta$ -glucosidase from *Debaryomyces pseudopolymorphus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.229 – 234, 2006.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C. **Fundamentos de Bioquímica**. Editora ARTEMED. Porto Alegre - RS, p.195 – 208, 2000.

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

WATT, D.K.; ONO, H.; HAYASHI, K. *Agrobacterium tumefaciens*  $\beta$ -glucosidase is also an effective  $\beta$ -xylosidase, and has a high transglycosylation activity in the presence of alcohols. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1385, p.78 – 88, 1998.

WEAR, R.G.; HASLETT, S.J. Effects of temperature and salinity on the biology of *Artemia franciscana* (Kellogg) from Lake Grassmere, New Zealand.1. Growth and mortality, **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** v.98, p.153 - 166, 1986.



WINCHESTER, B. REVIEW Lysosomal metabolism of glycoproteins. **Glycobiology**, v.15, p.12R – 15R, 2005.

WOLOSOWSKA, S.; SYNOWIECKI, J. Thermostable  $\beta$ -glucosidase with a broad substrate specificity suitable for processing of lactose-containing products. **Food Chemistry**, v.85, p.181-187, 2004.

YU, H.L.; XU, J.H.; LU, W.Y.; LIN, G.Q. Identification, purification and characterization of  $\beta$ -glucosidase from apple seed as a novel catalyst for synthesis of O-glucosides. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.354 – 361, 2007.