



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOTECNOLOGIA

GUSTAVO MARQUES SERRA

**ANÁLISE *IN SILICO* E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARCIAL
DE UMA β -GLICOSIDASE DA CIANOBACTÉRIA AMAZÔNICA
Microcystis aeruginosa CACIAM 03**

BELÉM - PA

2022

GUSTAVO MARQUES SERRA

**ANÁLISE *IN SILICO* E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARCIAL
DE UMA β -GLICOSIDASE DA CIANOBACTÉRIA AMAZÔNICA
Microcystis aeruginosa CACIAM 03**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Biotecnologia da Universidade Federal do Pará, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Agenor Valadares Santos

BELÉM - PA

2022

**ANÁLISE *IN SILICO* E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARCIAL
DE UMA β -GLICOSIDASE DA CIANOBACTÉRIA AMAZÔNICA
Microcystis aeruginosa CACIAM 03**

APROVADO EM: 03 / 06 / 2022

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Agenor Valadares Santos
Orientador - UFPA

Prof. Dr. Luís Adriano Santos do Nascimento
Universidade Federal do Pará (UFPA)

Prof. Dr. Andrei Santos Siqueira
Universidade da Amazônia (UNAMA)

BELÉM - PA

2022

AGRADECIMENTOS

À minha família composta pelos meus pais, Rosivana Oliveira Marques e Arnaldo Ferreira Serra, que sempre foram meus apoiadores, minha inspiração e determinação em todos esses anos de estudo. Eu agradeço por me ajudarem quando preciso, me apoiarem em meus desafios. E à Deus por me proteger, acompanhar todos os dias que tive que ir e voltar para minha casa.

À minha mãe por me apoiar em todas as minhas decisões, a me incentivar e se dedicar em ouvir o meu trabalho, meus objetivos e ficar orgulhosa do que faço. Por ser onde tenho a imagem que forma a melhor mãe do mundo pelo seu amor tão grande e tudo que já fez por mim. Por todos os dias que pôde me levar e buscar na escola, em me apoiar. Se eu obtive essa conquista hoje, foi graças a você por ser a única, a minha melhor amiga, a minha motivação, inspiração e, hoje, guio minha vida pelos seus ensinamentos. Eu te agradeço infinitamente por tudo, mãe. Amo você.

À minha melhor amiga e namorada Naiana Corrêa Ribeiro pelo incentivo, conversas, parceria e apoio em objetivos que tive durante esses anos de graduação e por estar sempre ao meu lado em momentos únicos e importantes.

Aos meus amigos próximos Rodrigo Arcoverde Cerveira da Silva e Vitor Arcoverde Cerveira da Silva que sempre me auxiliaram quando eu precisava, sempre puderam me aconselhar seja na minha carreira acadêmica ou em meus objetivos e agradeço por toda sabedoria, ensinamentos e incentivo que tive de vocês.

Aos meus amigos da faculdade, Joaquim Neto, Giovane Pinheiro, Beatriz Lobato, Davi Marcon, Thiago Borges e Valéria Silva pela amizade construída durante a graduação, por todos os momentos felizes e companheirismo que pudemos compartilhar, sou muito grato pela amizade de vocês e por sempre estarem presentes nos momentos em que precisei.

Ao Prof. Agenor Valadares Santos, por todo o apoio em laboratório, sendo meu orientador durante a iniciação científica e incentivando meu desenvolvimento profissional e acadêmico, agora, no TCC. Agradeço por todos os ensinamentos que me foram passados.

À Profa. Luciana Pereira Xavier por ter me recebido no LaBEB quando ainda estava finalizando meu primeiro semestre no curso de Biotecnologia, e que pode me aconselhar, auxiliar em meus experimentos dando conselhos, além de ser uma orientadora maravilhosa por me incentivar a ir aos congressos e divulgar a ciência.

Ao John Lucas por me ensinar tudo no laboratório desde o primeiro dia que estive lá, por me apoiar em todos os experimentos que realizei.

À Amanda Lima que me permitiu acompanhar seus trabalhos e experimentos e pôde me ensinar diversas técnicas e métodos que hoje passo aos novos integrantes do laboratório.

À Universidade Federal do Pará por toda a estrutura disposta, bolsas que incentivam a pesquisa, além dos cursos livres de idiomas importante para a minha formação de inglês de forma acessível.

À Faculdade de Biotecnologia e aos professores que foram ótimos durante todo o curso e puderam me ensinar durante toda a minha jornada na UFPA.

Aos meus colegas de curso por todo o acolhimento, momentos, trabalhos em grupo e pelo Centro Acadêmico de Biotecnologia das turmas anteriores que participaram por todos os conselhos, avisos e bons momentos em situações de desestresse.

RESUMO

As β -glicosidases (EC 3.2.1.21) são um grupo diversificado de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações β -glicosídicas de carboidrato para liberar resíduos de glicosil terminais não redutores, como a β -D-glicose e que possuem grande aplicabilidade industrial. Nas bactérias, as β -glicosidase que constituem o complexo celulase microbiana desempenham um papel importante na regulação de todo o processo de hidrólise da celulose. Acredita-se que as β -glicosidases de cianobactérias desempenhem papéis no metabolismo de glicosídeos e possível atividade hidrolítica da celobiose importante para hidrólise da celulose completa. Entretanto, dados estruturais e funcionais das β -glicosidases de cianobactérias e sua aplicação biotecnológica, ainda são escassos. Deste modo, o presente trabalho busca elucidar as propriedades físico-químicas, estruturais e funcionais empregando ferramentas *in silico* e apresentar a caracterização bioquímica parcial de uma β -glicosidase de *Microcystis aeruginosa* CACIAM 03 (*MaBgl3*). A sequência utilizada no estudo, estando depositada no NCBI (ID: OCY13127.1), foi analisada quanto a suas propriedades físico-químicas, sequências primárias, funções, localização subcelular, domínios, estruturas secundárias, modelagem tridimensional. Essa β -glicosidase *MaBgl3* é pertencente à família GH3, monomérica e com massa molecular teórica de 57,24 kDa e pI de 5,01, configurando ser uma proteína ácida presente no citoplasma da cianobactéria. O modelo da estrutura *MaBgl3* revelou um domínio N-terminal enovelado como um barril TIM distorcido com mecânica catalítica de díade semelhante encontrada em N-acetilglicosaminidases, um loop que conecta este domínio a um segundo domínio C-terminal na forma de sanduíche α/β . O extrato enzimático mostrou atividade enzimática frente a *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo, tendo atividade ótima em pH 4,5 e 40 °C com 37 U/mL. Estes resultados permitiram compreender as principais características bioquímicas, estruturais e seu mecanismo de catálise. Futuramente, avaliações de tolerâncias pela glicose, influência de aditivos e a sua purificação, poderão contribuir para processos de hidrólise da biomassa lignocelulósica, dentre outras aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: enzimas, β -glicosidase, cianobactéria, biotecnologia, modelagem molecular.

ABSTRACT

The β -glucosidases (EC 3.2.1.21) are a diverse group of enzymes that catalyze the hydrolysis of β -glycosidic bonds of carbohydrate to release non-reducing glycosyl residues, such as β -D-glucose and have wide industrial applicability. In bacteria organisms, the β -glucosidase that constitute the microbial cellulase complex play an important role in the regulation of the entire process of cellulose hydrolysis. Cyanobacterial β -glucosidases are believed to play roles in glycoside metabolism, carbohydrate cycling and possible hydrolytic activity of short-chain oligosaccharides and cellobiose important for complete cellulose hydrolysis. However, structural and functional data on cyanobacterial β -glycosidases and their biotechnological application are still scarce. In this context, the present work seeks to elucidate the physicochemical, structural and functional properties using *in silico* tools and to present the biochemical characterization of a β -glycosidase from *Microcystis aeruginosa* CACIAM 03 (*MaBgl3*). The sequence used in this study was deposited at the NCBI (ID: 13127.1), it had been analyzed in terms of its physicochemical properties, primary sequences, functions, subcellular location, domains, secondary structures and three-dimensional structures. This β -glycosidase *MaBgl3* belongs to the GH3 family, it's monomeric and has a theoretical molecular mass of 57,24 kDa and pI of 5.01, configuring it to be and acidic protein present in the cytoplasm of cyanobacteria. The modeled structure of *MaBgl3* revealed an N-terminal domain folded like a distorted TIM barrel (β/α)₈ with similar dyad catalytic mechanics found in N-acetylglucosaminidases, a *loop* connecting that domain to a second C-terminal domain folded in α/β -sandwich. The enzymatic extract showed activity against *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, having optimum activity at pH 4.5 and 40 °C with activity of 37 U/mL. These results allowed us to understand the main biochemical, structural characteristics and their catalytic mechanism. In the future, assessments of glucose tolerance, influence of additives and enzyme purification, may contribute to lignocellulosic biomass hydrolysis processes, among other biotechnological applications.

Keywords: enzymes, β -glucosidase, cyanobacteria, biotechnology, molecular modeling.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mecanismo de Atividade Enzimática	17
Figura 2 – Mecanismo geral de retenção enzimática das β -glicosidases	20
Figura 3 - Alinhamento das sequências de aminoácidos de uma celulase de fungo e duas β -glicosidases de fungo e bactérias com o seguimento da HEWL.	22
Figura 4 - (A) Distribuição do glicosídeo cianogênico na célula. (B) Catabolismo do cianogênico em plantas.....	25
Figura 5 - Mecanismo do complexo celulase.	27
Figura 6 - Múltiplo alinhamento sequências de β -glicosidases da família GH3. * <i>MaBgl3</i> do estudo.....	42
Figura 7 - Resultado do PSIPRED para a estrutura secundária da <i>MaBgl3</i> . (Continua).....	45
Figura 8 - Gráfico de Ramachandran da <i>MaBgl3</i>	47
Figura 9 - Análise de qualidade global do modelo <i>MaBgl3</i> de acordo com o servidor ERRAT - As regiões menos favorecidas estão em vermelhas e as regiões mais favorecidas estão em brancos.....	47
Figura 10 - Gráfico modelo 3D para <i>MaBgl3</i> de acordo com o servidor VERIFY 3D. O eixo vertical representa a pontuação média do perfil 3D-1D para resíduos em uma janela deslizante de 20 resíduos. O eixo horizontal representa o número de resíduos na sequência primária da proteína.	48
Figura 11 - Estrutura tridimensional da enzima <i>MaBgl3</i> . Os dois domínios estão representados nas cores ciano (N-terminal) e salmão (C-terminal) e em amarelo o <i>loop</i> de ligação. Uma molécula de glicopiranosose no sítio ativo está mostrada em vermelho (BGC). ..	49
Figura 12 - Estrutura geral monomérica da <i>MaBgl3</i> . A estrutura é representada em forma de cartoon (com folhas beta coloridas na cor magenta e alpha-hélices coloridas na cor ciano) e superfície (colorida em rosa claro).	50
Figura 13 - Alinhamento Múltiplo das Estruturas para <i>MaBgl3</i> e díade catalítica maximizada.	50
Figura 14 - (A) Resíduos que compõem o sítio catalítico enzimático. Em azul a estrutura do domínio C-terminal, em verdes resíduos que interagem com o substrato dentro de 5 Å e em rosa o substrato beta-D-glicopiranosídeo.	51

Figura 15- Interações moleculares entre <i>MaBgl3</i> e glicosídeo. Em verde os resíduos que interagem diretamente, em amarelo a ligação direta com o substrato e a distância.	52
Figura 16 - Análise Filogenética baseada nas sequências do banco CACIAM e GH3 obtidas no CAZy..	53
Figura 17 - Propriedades enzimáticas da <i>MaBgl3</i> . (A) perfil de pH da <i>MaBgl3</i> (pH 3,0 a 9,0). (B) perfil de temperatura em °C para <i>MaBgl3</i>	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação de enzimas segundo o sistema de Comissão de Enzimas (EC)....	18
Tabela 2 - Temperatura e pH ótimos de β -glicosidases em diversos organismos.....	24
Tabela 3 - Sistema de classificação de Hoffmann.....	32
Tabela 4 - Comparação da sequência <i>MaBgl3</i> frente a outras sequências de β -glicosidases de várias <i>Microcystis</i> spp.....	39
Tabela 5 - Resultado do PredicProtein sobre anotação de função.....	40
Tabela 6 - Localização Subcelular da <i>MaBgl3</i> nas ferramentas (A) PSORTb v3.0 e (B) DeepLoc 1.0.....	43
Tabela 7 - Análise da estrutura secundária da enzima <i>MaBgl3</i> usando diferentes servidores.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

°C - Graus celsius

Å - Unidade de medida de comprimento equivalente a 10^{-10}

Abs - Absorbância

BLASTp - Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local de proteínas

CACIAM - Coleção Amazônica de Cianobactérias e Microalgas

CAZy - Banco de dados de enzimas ativas para carboidratos

CD - Sequência codificante

Da - Dalton

DO - Densidade ótica

EC - Esquema de Classificação Enzimática

g - Giros

g - Gramas

h - Hora

k - Kilo

L - Litro

LaBEB - Laboratório de Biotecnologia de Enzimas e Biotransformações

M - Molar

MaBgl3 - β -glicosidase de *Microcystis aeruginosa* CACIAM 03

mg - Miligrama

min - Minutos

mL - Mililitro

mM - milimolar

NCBI - Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia

nm - Nanômetros

PDB - Base de dados de proteínas

pH - Potencial hidrogeniônico

pI - Ponto isoelétrico

PNPG - *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo

U - Unidade internacional de enzima

V - Volume

α - Alfa

β - Beta

μ L - Microlitro

Abreviatura dos aminoácidos

A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteína
D	Asp	Ácido aspártico
E	Glu	Ácido glutâmico
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lis	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptofano
Y	Tyr	Tirosina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVO.....	16
2.1. Objetivo Geral.....	16
2.2. Objetivos Específicos	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1. Enzimas.....	17
3.2. As β-glicosidase	18
3.2.1. Classificação De β -Glicosidase	18
3.2.2. Mecanismo De Catálise	20
3.2.3. Temperatura e pH	23
3.3. Papéis Funcionais das β-Glicosidases Em Diferentes Organismos	24
3.3.1. As β -glicosidases em Plantas.....	25
3.3.2. As β -glicosidases em Microrganismos	26
3.4. Aplicações das β-glicosidases	27
3.4.1. Papel da β -glicosidase na Conversão da Biomassa	27
3.4.2. As β -glicosidases na vinificação e bebidas.....	28
3.4.3. As β -glicosidases na extração e biotransformação de compostos bioativos de plantas.....	28
3.4.4. As β -glicosidases aplicadas à alimentos	29
3.4.5. Outras Aplicações das β -glicosidases.....	29
3.5. Cianobactérias	30
3.5.1. <i>Microcystis aeruginosa</i> e β -glicosidases	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1. Busca das Sequências Codificantes	34
4.2. Análises <i>in silico</i> da Estrutura Primária	34
4.3. Alinhamento das Sequências e Identificação do Motivo Conservado	34
4.4. Localização Subcelular.....	34
4.5. Caracterização Físico-Química	35

4.6. Análise <i>in silico</i> da Estrutura Secundária	35
4.7. Modelagem Molecular por Homologia Comparativa	35
4.8. Análise Filogenética	36
4.9. Cultivo Das Cianobactérias	36
4.10. Extração para Obtenção do Extrato Enzimático.....	36
4.11. Quantificação da Atividade β -glicosidase.....	37
4.12. Caracterização da β -glicosidase	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1. Sequência de Aminoácidos de β -Glicosidase	39
5.2. Alinhamento da Sequência e Identificação dos Motivos	40
5.3. Localização da Sequência Proteica	43
5.4. Caracterização Físico-Química	43
5.5. Análise da Estrutura Secundária	44
5.6. Construção e Avaliação do Modelo.....	46
5.6.1. Estrutura Geral Da <i>MaBgl3</i>	48
5.6.2. Sítio Ativo da <i>MaBgl3</i>	51
5.7. Análise Filogenética das Enzimas GH3	53
5.8. Efeito da Variação De pH e Temperatura na Atividade Enzimática	54
6. CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1. INTRODUÇÃO

As cianobactérias são conhecidas por serem os primeiros microrganismos autotróficos, fotossintéticos originados aproximadamente em 3 bilhões de anos na Terra, que contribuíram para um dos eventos mais dramáticos durante a evolução do planeta – a oxigenação do planeta Terra (PLANAUSKY, 2014; NUTMAN, 2016). Embora a natureza de cianobactérias seja microscópica, elas podem ser visualizadas ao formar florações, crostas e colônias que descoloram da água, causando diversos problemas e entre eles estão aumento da turbilidade, sufocação da vegetação marinha, depleção de oxigênio, indução a hipóxia e inóxia e causando a morte de peixes e invertebrados (RABALAIS *et al.*, 2010).

A taxa de crescimento rápido de cianobactérias depende de variações nos níveis de nutrientes, fatores bióticos, mudanças climáticas ou aquecimento global. O processo da industrialização nos países em desenvolvimento aumenta a demanda por atividades antrópicas que muitas vezes não é acompanhada por uma infraestrutura adequada a essas atividades. No Brasil, grande parte dos resíduos domésticos e esgoto são lançados diretamente nos corpos hídricos (TUCCI, 2002). A matéria orgânica presente nesses resíduos é um dos principais fatores responsáveis pelo aparecimento de florações por cianobactérias, pois provocam a eutrofização e conseqüentemente, a contaminação de solos e ambientes aquáticos (TUNDISI, 2003).

Sabe-se que as cianobactérias são capazes de produzir inúmeros metabólitos secundários bioativos e outros compostos, com seu papel ecológico e mecanismo de produção ainda pouco abordado. Essas moléculas, chamadas de cianopeptídeos, são descritas como compostos com atividades biológicas, como as microviridinas que são potenciais inibidoras de serinoproteases (AMARAL *et al.*, 2021).

Devido ao crescimento autotrófico, elas podem crescer nos mais diversos habitats e em diferentes tipos de recursos hídricos, como água doce, água salobra e águas residuais industriais. Logo, evidencia que os microrganismos não necessitam de exigências nutricionais complexas, apenas de determinados nutrientes, CO₂ e energia luminosa. Assim, o cultivo em massa de cianobactérias pode ser possível para produzir compostos valiosos incluindo biocombustíveis, biofertilizantes, polímeros biodegradáveis, suplementos e substâncias de cor como corantes (DEMAY *et al.*, 2019).

Embora algumas revisões se concentrem na utilização para produção de um produto de valor. Nenhuma aborda o potencial das cianobactérias para serem usadas como produtoras de enzimas industrialmente importantes. Logo, estas cianobactérias possuem a capacidade de

sintetizar enzimas de diferentes aplicações industriais, incluindo as amilases, galactosidases, proteases, lipases, fitases, lacases, celulasas e enzima que são capazes de regular a eficiência de hidrólise da degradação da biomassa, as β -glicosidases.

As aplicações de β -glicosidases (EC 3.2.1.21) se desenvolveram notavelmente nos últimos anos devido à necessidade de fontes renováveis de energias e na exploração do seu uso na sacarificação da fibra de celulose nas indústrias de etanol. As β -glicosidases atuam sinergicamente com exoglucanase e endoglucanase na hidrólise de ligações β -glicosídicas da celulose, liberando unidades de glicose. Contudo, a maioria das β -glicosidases caracterizadas são sensíveis ao produto formado durante a hidrólise e acabam sendo inibidas por ela ou não possuem a conformação necessária para que ocorra a quebra do substrato celobiose.

A fim de explorar completamente as características de β -glicosidases de cianobactérias é necessário conhecer sua estrutura tridimensional para compreender as informações sobre relação estrutura-função e os mecanismos biológicos que estão envolvidos com a enzima β -glicosidase e de possíveis aplicações biotecnológicas na indústria de biocombustíveis e dentre outras aplicações no processo de fabricação de papel, produção de adubo, clareamento de sucos de frutas para aumentar a qualidade nutritiva de alimentos e outros processos.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é analisar as estruturas e propriedades, extrair e caracterizar a atividade enzimática β -glicosidase endógena da cianobactéria amazônica *Microcystis aeruginosa* CACIAM 03.

2.2. Objetivos Específicos

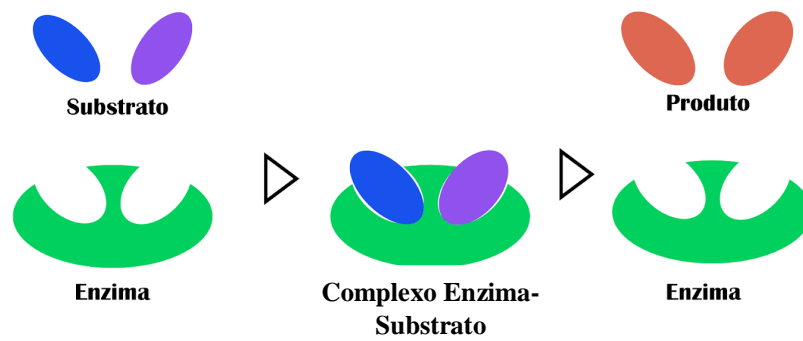
- a) Realizar investigação das sequências codificantes de β -glicosidase.
- b) Analisar as estruturas primária, secundária e modelar a estrutura terciária da β -glicosidase.
- c) Extrair e purificar a enzima β -glicosidase
- d) Caracterizar a β -glicosidase frente a seu pH e temperatura ótimo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Enzimas

Enzimas são catalisadores biológicos que aceleram reações específicas e importantes para organismos vivos, sob determinadas condições de pH, concentração de substrato, temperatura e outros parâmetros (CUESTA, 2016; ROBINSON, 2015). Como catalisadores, as enzimas são necessárias em concentrações muito baixas e aceleram as reações sem serem consumidas durante o processo, onde descrevemos as enzimas como sendo capazes de catalisar a conversão de substrato em produto da seguinte forma:

Figura 1 - Mecanismo de Atividade Enzimática



Fonte: Elaborado pelo autor.

Assim altamente específicas que catalisam apenas um tipo de moléculas como substrato em produtos ou uma variedade substratos. Outras são descritas como enzimas que demonstram uma especificidade elevadas, descrita como especificidade absoluta em que a enzima possui total especificidade a apenas a um substrato e nenhuma atividade com outras moléculas (JAEGER *et al.*, 2004).

As enzimas são classificadas de acordo com a Comissão de Enzimas (EC) a partir da reação que as enzimas catalisam também a numeração indica o substrato sobre o qual a enzima atua. A primeira parte do número EC refere-se à reação que a enzima catalisa. Os próximos dígitos significam a natureza de reação identificada pelo primeiro dígito. Como exemplo, temos as β -glicosidases (EC 3.2.1.21) em que a numeração EC 3 estão as classes das hidrolases, que catalisam hidrólise, quebra de ligações e estruturas com participação neste processo da ação da água. O próximo dígito (EC 3.2) inclui glicosilases que atuam em açúcares. O terceiro dígito (EC 3.2.1) diz a respeito de glicosidases que hidrolisam compostos O- e S-glicosil.

O esquema de classificação consiste (Tabela 1), atualmente, em sete classes de enzimas: Oxidorredutases (EC 1), Transferases (EC 2), Hidrolases (EC 3), Liases (EC 4),

Isomerases (EC 5), Ligases (EC 6), e recente criada a nova classe de enzimas Translocases (EC 7) (MATSUTA, 2013; KEITH, 2018).

Tabela 1 - Classificação de enzimas segundo o sistema de Comissão de Enzimas (EC).

Dígito EC	Classe de Enzima	Tipo de reação
1	Oxidoredutases	Redução/oxidação
2	Transferases	Transferência de átomo ou grupo
3	Hidrolases	Hidrólise
4	Liasas	Remoção de grupo
5	Isomerases	Isomerização
6	Ligases	Ligação entre duas moléculas
7	Translocases	Translocação de aminoácidos, <i>hydrons</i> e outros

Fonte: IUBMB, nomenclatura das enzimas.

3.2. As β -glicosidase

As β -glicosidases (β -D-glicosídeo glicohidrolase; EC 3.2.1.21) são consideradas as mais essenciais enzimas que catalisam de forma eficiente a degradação da glicose (ALMEIDA *et al.*, 2015). Essas enzimas hidrolisam ligações glicosídicas (β -1,4; β -1,3 e β -1,6) em alquila e arila β -D-glicosídeos, assim como dissacarídeos e oligossacarídeos de cadeia curta que ocorrem onipresentemente em plantas, animais, fungos, bactérias e em cianobactérias de forma extra e intracelular. (BAI, 2013; SINGH, 2016).

Nesses mais diversos organismos as β -glicosidases desempenham papéis fundamentais associados a processos biológicos dependendo sistema biológico e onde está situada a enzima. Em microrganismos celulolíticos, estão envolvidas na degradação do material lignocelulósico e da celobiose (TOMME *et al.*, 1995). Em humanos e mamíferos, as β -glicosidases estão envolvidas na hidrólise das glicosilceramidas. Partículas estas conhecidas como GL1 e que, na ausência da β -glicosidase, acumulam-se normalmente no fígado, no baço e na medula óssea, caracterizando assim a doença de Gaucher - um distúrbio de armazenamento lisossomal não-neuropático (FERREIRA *et al.*, 2008).

As propriedades físico-químicas das β -glicosidases são bem estudadas e entendidas onde na literatura é indicado que a maior parte de todas as β -glicosidases tem subunidade com peso molecular entre 55 a 65 kDa, bem como se é conhecido o pH e temperatura de atividade para determinados substratos específicos e não-específicos.

3.2.1. Classificação De β -Glicosidase

As β -glicosidases pertencem a um grupo diverso de outras enzimas hidrolíticas e têm

sido classificadas baseadas não apenas em um critério definido. Em geral, são classificadas baseadas: (1) em sua especificidade ao substrato e (2) na identidade da sequência de nucleotídeos (SØRENSEN *et al.*, 2013). E de acordo com a especificidade ao substrato elas têm sido classificadas como (1) aril- β -glicosidases, que agem aril-glicosídeos no quais nos quais uma fração de açúcar está ligada por meio de uma ligação carbono-carbono (C-C) a uma fração não-açúcar (aglicona). (2) verdadeiras celobiasas, que hidrolisam celobiose para liberar glicose e (3) enzimas com ampla especificidade de substrato que atuam em um amplo espectro de substratos. (SINGHANIA, 2017; ZHANG, 2016; ROJAS, 1995).

Segundo a proposta de Henrissat e Bairoch (1996), o método de classificação é baseado na sequência e na semelhança do dobramento das enzimas a partir da análise da análise de clusters hidrofóbicos (HCA). O HCA de diversas enzimas sugere que α -hélices e folhas- β estão localizadas em posições similares na conformação das mesmas. Além disso, há um número de aminoácidos altamente conservados agrupados no sítio ativo que inclusive a identificação de catalisador nucleofílico e ácido/base afeta a identificação a qual família esta enzima é pertencente. A classificação baseada em sequência pode ser usada para caracterizar enzimas de uma perspectiva estrutural, mas a especificidade do substrato em relação à porção aglicona continua sendo a principal ou, em alguns casos, a única líder no isolamento e caracterização de glicosidases estruturais ou desconhecidas não está claro.

As famílias das glicosil hidrolases são classificadas em EC 3.2.1 como enzimas que catalisam a hidrólise de O- ou S- glicosídeos e baseado no proposto acima levou à definição de mais de 100 famílias diferentes. A classificação está disponível no banco de dados CAZy (*Carbohydrate-Active Enzymes*) permitindo uma previsão confiável da estrutura, do mecanismo, resíduos do sítio ativo e dos possíveis substratos (SINNOTT *et al.*, 1990). As β -glicosidases estão majoritariamente nas famílias 1 e 3 das glicosil hidrolases, porém estas são encontradas em famílias 5, 9 e 30 (CANTAREL *et al.*, 2009).

Na família 1 das glicosil hidrolases (GH1) as enzimas mais comuns desse grupo são as β -glicosidase e β -galactosidase, onde tipicamente a atividade é encontrada no mesmo sítio ativo com valores de K_{cat} semelhantes. Outras enzimas compartilham a mesma família como as β -manosidase, β -glucuronidase, β -xilosidase e são todas enzimas de retenção que seguem um mecanismo clássico de duplo deslocamento de Koshland. Em plantas, as enzimas da família GH1 estão frequentemente envolvidas no processo de aromáticos glicosilados, como hormônios vegetais e outras plantas utilizam como parte do seu sistema de defesa para liberar aglicona tóxicas a partir da hidrólise de linamarina e glucosinolatos.

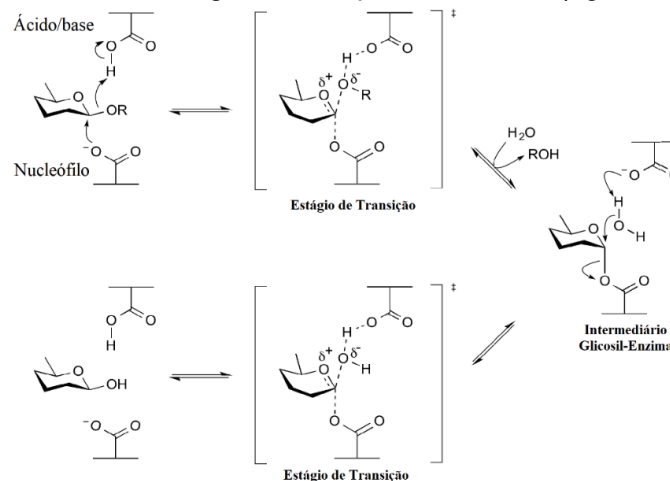
A família GH3 consiste de 53 estruturas cristalógrafadas majoritariamente de β -glicosidases e hexosaminidases de bactérias, mofos, leveduras e algumas plantas, contudo até o momento continua escasso as informações sobre as estruturas, a especificidade ao substrato e o tipo de função exercida nos organismos em que ela está presente. Tornando-se assim cada vez mais necessário a busca por novas estruturas a fim de se entender os seus mecanismos, o papel que exerce em determinado organismo e os esquemas de cada família. Salientando-se a escassez dos dados sobre essas β -glicosidases de cianobactérias e a sua futura aplicação biotecnológica

3.2.2. Mecanismo De Catálise

A hidrólise enzimática das ligações glicosídicas ocorre geralmente por catalisador ácido que requer dois resíduos críticos: um doador de prótons e uma base/nucleófilo. E esse mecanismo vai ocorrer majoritariamente via retenção ou inversão de uma configuração anomérica. E em ambos mecanismos a posição do doador de próton é idêntica (GIDEON *et al.*, 1995). As β -glicosidases são enzimas de retenção por conta de seus produtos terem a capacidade de reter a mesma configuração anomérica que o substrato. Esse mecanismo de interação enzima-substrato é chamado de *duplo deslocamento* postulado por Daniel Koshland em 1953.

A catálise consiste de duas etapas envolvem um intermediário glicosil-enzima (Figura 2) onde a reação ocorre com o catalisador nucleofílico da enzima sendo ativado com auxílio do resíduo ácido/base fornecido por duas cadeias laterais de aminoácidos, que podem ser glutamato ou aspartato para performar a catálise, localizadas a aproximadamente 5 Å de distância.

Figura 2 – Mecanismo geral de retenção enzimática das β -glicosidases.



Fonte: Adaptado de Withers (2008).

Na primeira etapa, um dos resíduos funciona como nucleófilo atacando o centro anomérico para deslocar a aglicona e formar um intermediário glicosil-enzima e durante este mesmo tempo um outro resíduo irá funcionar como um ácido, protonando (doando H^+) o oxigênio glicosídico à medida que ocorre a clivagem. Etapa essa chamada também de glicosilação.

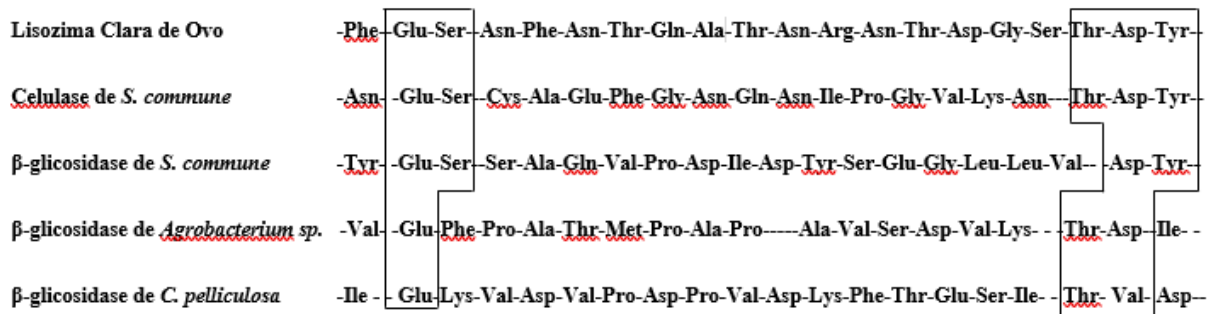
Na segunda etapa (etapa de desglicosilação) o intermediário é hidrolisado pela água, com outro resíduo agindo agora como um catalisador básico desprotonando a molécula de acordo com seu processo de clivagem liberando glicose como produto. A adição *trans* de um grupo OH resulta na retenção líquida na configuração anomérica. O resíduo nucleofílico também atua como o grupo de saída na etapa de desglicosilação (WITHERS, 2008; BHATIA, 2002; KOSHLAND, 1953).

Sendo esta a função mais atribuída à glicosidases, a hidrólise de ligações glicosídicas. Contudo, algumas glicosidases são capazes de catalisar reações de novas ligações glicosídicas através da hidrólise reversa ou de transglicosilação. Isto é, pode ser obtido a síntese de glicosídeos deslocando o equilíbrio a favor da síntese (controle termodinâmico) ou através do uso de doadores de monossacarídeos ativados (controle cinético), desviando a rota da reação de hidrólise. Na hidrólise reversa (controle termodinâmico) são usadas altas temperaturas, adição de solventes orgânicos e/ou altas concentrações de produtos.

Na transglicosilação (controle cinético) o intermediário (glicosil-enzima) é atacado por uma outra molécula de substrato (aceptor glicosídico) invés de uma molécula de água, gerando um novo glicosídeo. Neste caso, pode ser usado como aceptores: oligossacarídeos, aril-glicosídeos e glicosídeos fluorados (MALET *et al.*, 1998).

Os estudos com a lisozima da clara de ovo de galinha (HEWL) levaram a dados bem compreendidos da estrutura, mecânica, predição dos resíduos catalíticos e domínios da β -glicosidase. As evidências de ácidos carboxílicos servindo como ácido foram encontradas através da cristalografia de raio X da HEWL. O Glu³⁵ foi identificado como doador de próton durante a catálise enquanto Asp⁵² serve como estabilizador durante o estágio de transição do oxônio. Interessantemente, a homologia da sequência de aminoácidos entre regiões que compreendem os resíduos Glu³⁵ e Asp⁵² e segmento de outras β -glicosidase (Figura 3). Por analogia com a HEWL, Moranelli e colaboradores (1986) identificou nas β -glicosidase Glu¹⁶⁰ e Asp¹⁷⁷ em *Schizophyllum commune* e Glu⁶⁰⁷ e Asp⁶²⁵ de *Candida pelliculosa* como potenciais resíduos catalíticos.

Figura 3 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos de uma celulase de fungo e duas β -glicosidases de fungo e bactérias com o seguimento da HEWL.



Fonte: Adaptado do trabalho de Moranelli e Colaboradores (1986).

Durante os estudos de Legler (1967) com modificações experimentais e afinidade a partir da mutagênese, fora proposto que o Glu no motivo serve como doador de prótons durante a catálise e fora identificado que outros resíduos de Glu/Asp agiam como nucleofílico que ajudaram a delinear o mecanismo de ação das enzimas de *Aspergillus wentii*, *Aspergillus oryzae*, *B. theobromae*, de leveduras e de células de Gaucher humana (DINUR, 1986; BAUSE, 1980; LEGLER, 1973; LEGLER, 1968).

O arranjo do sítio catalítico na família GH3 foi visualizado pela primeira vez por Varghese em 1999 através da estrutura cristalina da β -glucaexohidrolase de cevada confirmando consistir de dois subsítios de ligação glicosil (-1 e +1) com um nucleofílico e um resíduo ácido/base. Os estudos de Legler em 1973 sugeriram que um resíduo de aspartato na seqüência VMSDW como o resíduo nucleófilo catalítico muito antes do estabelecido no sistema de classificação CAZy e reconhecendo a enzima β -glicosidase de *Aspergillus goii* como membro da família GH3. O resíduo homólogo de β -glucaexohidrolase de cevada identificou que o Asp²⁸⁵ dentro da seqüência GFVISDW sendo posicionado adequadamente para atuar como o nucleofílico durante a catálise. A conservação deste aspartato torna-se evidente quando estruturas cristalinas de várias enzimas GH3 são sobrepostas. Contudo que o nucleofílico catalítico aspartato seja bem conservado a localização e a identidade do resíduo ácido/base não é clara (VARGHESE *et al.*, 1999).

O alinhamento de seqüência atualmente é usado de forma a identificar o resíduo nucleófilo catalítico dos membros do GH3, contudo a posição do resíduo ácido/base é filogeneticamente geral, dificilmente identificável. Onde o estudo de Varghese sobre a β -glucaexohidrolase foi a primeira a sugerir a identidade do resíduo ácido/base de um membro GH3. A enzima consiste de dois domínios onde um é um domínio N-terminal barril (α/β)₈ que abriga o sítio ativo e o nucleofílico Asp²⁸⁵ e um resíduo de glutamato na posição 491 que está projetado para o sítio ativo no domínio barril (α/β)₈ que foi proposto para atuar como

ácido/base catalítico (HRMOVA *et al.*, 2001).

3.2.3. Temperatura e pH

O efeito da temperatura pode ser muito complexo devido a várias causas, com o aumento da temperatura, a atividade molecular é aumentada, assim como com este aumento pode ocorrer a inativação gradativa da enzima. Um aumento de 10 °C (dez graus celsius) aumentará a atividade da maioria das enzimas em 50 a 100 %. Uma vez que a enzima é desnaturada, ela não pode ser reparada (LESK, 2008). Cada enzima tem uma faixa de temperatura na qual uma taxa máxima de reação é alcançada, considerando este máximo como temperatura ótima da enzima. Onde também existirá enzimas que operam bem em temperaturas mais baixas e mais altas e mais baixas. Portanto, a faixa da atividade é determinada pela temperatura que a enzima terá começado a ter atividade e a temperatura que a enzima começa a se degradar.

Muitas das β -glicosidases termofílicas são obtidas de espécies de *Thermotoga*. Na família GH1 temos as β -glicosidases de *T. maritima* e *T. neapolitana* são ativas a 100 °C (PARK *et al.*, 2005). No entanto, a β -glicosidases mais termoestável já relatada na literatura vem de arquea hipertermófila *Pyrococcus furiosus*, tendo atividade ótima entre 102 a 105 °C com meia vida de 85 h a 100 °C e 13 h a 110 °C (KENGEN *et al.*, 1993). Em um trabalho de Silva (2016) determinou para o fungo termófilo *Myceliophthora heterothallica* atividade residual entre 40 a 70 °C durante 1 hora se demonstrando estável a mais tempo em 60 °C. Essas evidências sugerem que fungos são fontes ricas em β -glicosidases termofílicas incluindo espécies mesófilas *Sclerotium* e *Aspergillus* (RAPP *et al.*, 1989; ZENG e ZHANG, 1989). Ambas espécies crescem entre 24 a 27 °C, contudo produzem β -glicosidases com temperatura ótima e estabilidade entre 60 a 75 °C.

Candidatos com alta atividade e ótima estabilidade a temperaturas elevadas e com variação de pH são preferidos para a indústria. A alteração deste pH altera a estrutura do sítio ativo da enzima, onde cada uma terá um pH específico para o seu pH ótimo. Na tabela 2 vemos que a maioria das enzimas tem pH ótimo entre 4 a 6, contudo a estabilidade dessas enzimas varia entre pH 3,5 a 7 em determinados organismos. Vale ressaltar que a enzima terá o seu sítio alterado de acordo se o pH está ácido ou alcalino e para determinados substratos que estão sendo analisados.

O pH não apenas afeta a enzima como também carrega o substrato e pode alterar a sua forma de modo que não pode se ligar à enzima ou não formar o produto esperado. No entanto,

se o nível de pH mudar significativamente, a enzima e o substrato podem ser desnaturados. Nesse caso, a enzima e o substrato não se reconhecem, então não haverá reação.

Tabela 2 - Temperatura e pH ótimos de β -glicosidases em diversos organismos.

Organismo	Ótima		Especificidade Substrato*	Atividade Específica (U/mL) **	Referência
	Temperatura (°C)	pH			
<i>Arabidopsis thaliana</i>	N.I.	6,0	PNPG, AC	17	Kato-Noguchi <i>et al.</i> , 2008
<i>Aspergillus funigatus</i>	60	6,0	PNPG, AC	103,5	Liu <i>et al.</i> , 2012
<i>Aspergillus niger</i>			PNPG, C2, XYP	31	Gao <i>et al.</i> , 2014
<i>Aureobasidium pullulans</i>	75	4,5	PNPG, C2, SAL, CMC, TRH	124	Leite <i>et al.</i> , 2008
<i>Myceliophthora heterothallica</i>	60	4,5	PNPG, SAL	48	Silva <i>et al.</i> , 2016
<i>Oryzae sativa</i>	40	4,5	PNPG, C2, C3, C4, C5	100	Kuntothom <i>et al.</i> , 2009
<i>Penicillium oxalicum</i>	55	5,5	PNPG, SAL	85	Copa-Patiño <i>et al.</i> , 1990
<i>Penicillium verruculosum</i>	60	4,5	PNPG, SAL	N.I.	Almeida <i>et al.</i> , 2015
<i>Pichia pastoris</i>	60	6,0	PNPG	101,7	Liu <i>et al.</i> , 2012
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	70	5,0	PNPG, C2, Cdex	86,7	Hong <i>et al.</i> , 2007
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	95	5,0	C2, TRH, SOP, LAM, GTB	9,65	Lin <i>et al.</i> , 1999
<i>Thermotoga neapolitana</i>	95	5,6	C2, THR, SOP, LAM, GTB	N.I.	Park <i>et al.</i> , 2005
<i>Thermus nonproteolyticus</i>	90	5,6	PNPG, C2	5358	Xiangyuan <i>et al.</i> , 2001
β -glicosidase citosólica humana	58	6,0	PNPG, SAL	171	Berrin <i>et al.</i> , 2002
<i>Rhynchophorus palmarum</i>	55	5,0	PNPG	25	Yapi <i>et al.</i> , 2009

Fonte: Dados da Pesquisa; referência na tabela.

Notas: *AC - Celulose Amorfa; C2 - celobiose; C3 - celotriose; C4 - celotetraose; C5 - celopentose; LAM - laminarina; CMC - carboximetilcelulose; GTB - gentiobiose; TRH - trealose; SAL - Salicina; PNPG - *p*-nitrofenil- β -D-glicosídeo; XYP - β -D-xilopirranose.

**Quantidade de enzima liberando 1 μ mol/min de produto pelo primeiro substrato listado.

3.3. Papéis Funcionais das β -Glicosidases Em Diferentes Organismos

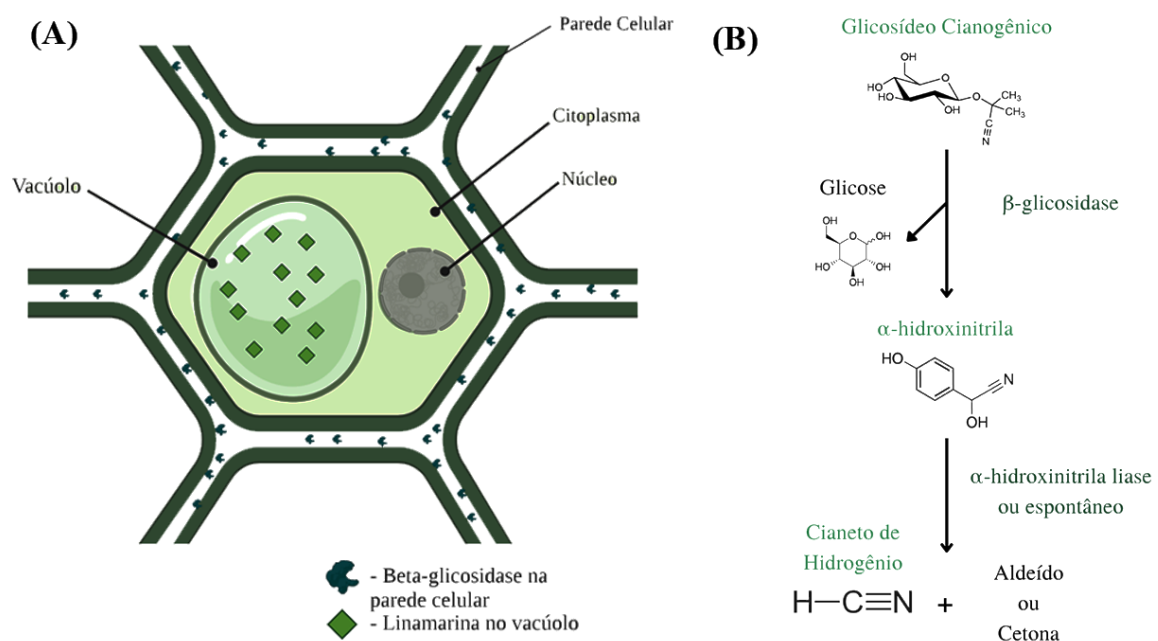
3.3.1. As β -glicosidases em Plantas

Segundo Morant (2008), as β -glicosidases em plantas estão envolvidas em uma série de processos do metabolismo e são mediadoras de processos como a formação da lignificação importante para a parede celular de plantas, degradação do endosperma da parede celular durante a germinação, ativação de hormônios da planta, na cianogênese em defesa contra estresse biótico. Ou seja, a planta contém glicosídeos que estão na forma não-ativos e são ativados pela ação da β -glicosidase e liberando-os como compostos tóxicos (ZAGROBELNY *et al.*, 2004).

Em geral, esses glicosídeos de defesa ficam armazenados em diferentes compartimentos, como os vacúolos, e as β -glicosidases hidrolisam esses compostos cianogênicos (Figura 4A). O catabolismo de um glicosídeo cianogênico é iniciado pela clivagem da fração carboidrato por uma ou mais β -glicosidases, produzindo a correspondente α -hidroxinitrila, onde esse intermediário pode se decompor espontaneamente ou enzimaticamente na presença da enzima α -hidroxinitrila liase para produzir cianeto de hidrogênio (HCN) e um aldeído/cetona (Figura 4B).

As β -glicosidases são altamente ativas com os cianogênicos linamarina e lotaustralina que são encontrados em raízes de mandioca, feijão, trevo branco e outros, onde ambos substratos podem ser hidrolisados para formar glicose e o precursor do composto tóxico de HCN.

Figura 4 - (A) Distribuição do glicosídeo cianogênico na célula. (B) Catabolismo do cianogênico em plantas.



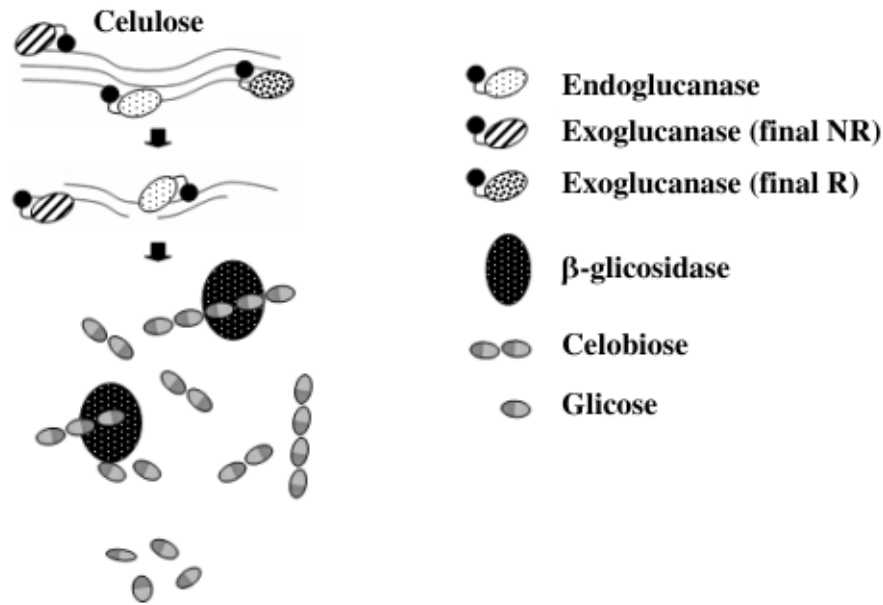
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.2. As β -glicosidases em Microrganismos

Por mais que tenham sido realizados diversos estudos e experimentos com β -glicosidases de microrganismos, o foco principal das pesquisas é a sua aplicação direta para a indústria e em processos do que em sua função endógena (SINGH *et al.*, 2016). Dessas funções, sabe-se a sua função natural são as envolvidas na bioconversão para produzir glicose (Figura 5) ou de “quebrarem” a parede de celular de plantas para estabelecerem relacionamento simbiótico ou patogênico (GILBERT *et al.*, 2008). As β -glicosidases são enzimas funcionalmente importante para microrganismos de solo uma vez que contribuem para a manutenção solo as enzimas envolvidas na ciclagem de nutrientes têm sido sugeridas por indicar mudanças ocorridas na microbiota e serem sensíveis a alterações na qualidade do solo (TURNER *et al.*, 2002).

O papel da β -glicosidase mais estudado tem sido de atividade de degradação da celulose em degradar celobiose e celo-oligossacarídeos, produzindo glicose durante a bioconversão (Figura 5). Esses substratos insolúveis são produzidos pela ação de outras enzimas que compõe o sistema celulase - referente a endoglucanase (EC 3.2.1.4), exoglucanase (EC 3.2.1.74) e β -glicosidase (EC 3.2.1.21) - onde cada enzima dessa realiza uma diferente função na hidrólise total da celulose de forma sinérgica. A endoglucanase atua aleatoriamente sobre a estrutura cristalina da celulose e cliva as cadeias da glicose, resultando em frações de cadeias mais curtas que geram duas novas extremidades. Essas duas extremidades ficam expostas e disponíveis para ação da exoglucanase que libera a celobiose e alguma quantidade de glicose. No último passo, a β -glicosidase desempenha o papel de degradação completa da celulose, quebrando a celobiose e celo-oligossacarídeos em moléculas de glicose. Vale salientar que este último passo é limitante para o complexo de celulase uma vez que os substratos da β -glicosidase inibem o funcionamento de ambas glucanases.

Figura 5 - Mecanismo do complexo celulase.



Fonte: Adaptado de Mathew (2008).

3.4. Aplicações das β -glicosidases

As β -glicosidases podem ser divididas em dois grupos de aplicações baseado na sua atividade, as (1) β -glicosidases de clivagem e as (2) β -glicosidases que sintetizam ligações glicosídicas e estão envolvidas em vias biológicas de biossíntese e degradação de polissacarídeos estruturais e de armazenamento, e interação hospedeiro-patógeno (GILBERT *et al.*, 2008). A demanda de energias renováveis estimulou fortemente as pesquisas para a conversão da biomassa lignocelulósica e açúcares redutores para posterior produção de etanol. Embora elas tenham sido foco por causa das suas variáveis e possíveis aplicações, as β -glicosidases para a conversão efetiva da celulose ainda é insuficiente, uma vez que a celobiose requer uma mudança conformacional para que ocorra a catálise efetiva.

3.4.1. Papel da β -glicosidase na Conversão da Biomassa

Com o advento da necessidade de energias alternativas, tem-se a rota de produção de bioetanol através da hidrólise enzimática da biomassa. Onde a β -glicosidase tem sido a enzima chave da hidrólise completa da celulose devido a sua etapa ser limitante na eficiência da hidrólise e a celobiose liberada media a inibição das exoglucanase e endoglucanase (SAINI *et al.*, 2015). Esse sistema de hidrólise mais utilizado pela indústria é o secretado pelo fungo filamentoso *Trichoderma reesei* e seus mutantes derivados, contudo a quantidade de β -glicosidase é insuficiente para a hidrólise completa que resulta em um acúmulo de celobiose durante a atividade da celulase (TIWARI *et al.*, 2013).

De maneira que para superar este problema, ocorre a preparação de celulase de *T. reesei* com β -glicosidase exógena de cepa de *Penicillium*. É reportado na literatura que a suplementação do complexo Rut-C30 (Cepa de *T. reesei* com seis modificações genéticas) com a β -glicosidase de *P. decumbens* apresentou um aumento de 80% no rendimento de glicose durante a sacarificação de talho de milho pré-tratado (MA *et al.*, 2011). Em outro estudo, relataram uma cepa de levedura *Clavispora* NRRL Y-50464 que é capaz de utilizar a celobiose como única fonte de carbono e produzir a atividade da enzima β -glicosidase para a produção do açúcar redutor e foi observado que também a levedura era tolerante aos principais inibidores derivados do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica como furfural, HMF, portanto a produção de etanol foi de 23 g/L sem a adição de β -glicosidase exógena (KRISCH *et al.*, 2010).

3.4.2. As β -glicosidases na vinificação e bebidas

Compostos voláteis como Linalol, Geraniol, Nerol, Citronelol e α -terpeniol são responsáveis pelo aroma de vinhos e as β -glicosidases desempenham um papel fundamental na liberação enzimática dos compostos. Esses monoterpenóis de uvas citados estão ligados a diglicosídeos que contribuem para o sabor do vinho. A hidrólise enzimática desses compostos requer uma reação sequencial, que produz monoglicosídeos. A adição de β -glicosidase exógena tolerante à glicose isolada de fungos, como *Aspergillus oryzae*, mostrou melhorar a hidrólise de compostos aromáticos glicoconjugados e melhorar a qualidade do vinho (RIOU *et al.*, 1998).

Ravanal e colaboradores (2012) utilizaram da β -glicosidase em conjunto com arabinofuranosidase, ambas de *Penicillium purpurogenum*, e estas enzimas toleram o pH ácido e concentrações de etanóis típicas de vinhos e houve a liberação de terpenos melhorando a qualidade do vinho.

3.4.3. As β -glicosidases na extração e biotransformação de compostos bioativos de plantas

Ginsenosídeos são importantes compostos ativos presentes em jinsém que tem diversas propriedades medicinais e farmacêuticas, como atividade anticâncer, antienvelhecimento, antialérgicos e contra fadiga (LEE *et al.*, 2013). Esse composto na natureza é altamente glicosilado e, em particular, esses compostos deglicosilados tem mais propriedades medicinais do que glicosilados (KIM *et al.*, 2005).

Gao e colaboradores realizaram a produção de ginsenosídeos pela hidrólise enzimática

de um resíduo específico da estrutura do composto usando β -glicosidase de *P. oxalicum* sob condições de reações (pH 4,5, 55 °C e 0,25 U/mL de β -glicosidase) onde cerca de 75 mg de ginsenosídeos deglicosilado foi obtido dentro de 60 min a partir de 100 mg de ginsenosídeos. As β -glicosidases das cepas de *Penicillium* também têm sido utilizadas na extração de flavonóides. Fora reportado por Chen (2013) que uma preparação comercial de celulose contendo β -glicosidase produzida por *P. decumbens* facilitam a degradação da parede celular e também colaboram na extração de compostos flavonóides como quercetina, kaempferol e isohamnetina. Também de acordo com os autores do estudo, transglicosilação das agliconas flavonol em glicosídeos flavonol realizada pela β -glicosidase de *P. decumbens* aumentaram a solubilidade em extratores de flavonoides como água e/ou etanol e conseqüentemente melhorou a eficiência com a enzima do que com a comparada sem o envolvimento da enzima.

3.4.4. As β -glicosidases aplicadas à alimentos

Alimentos à base de isoflavonas estão principalmente na forma inativa de glicosídeos que podem ser hidrolisados pela aplicação da β -glicosidase para convertê-los em aglicona. Essas formas agliconas das isoflavonas exibem maior atividade biológica do que a forma glicosídica e também são absorvidos mais rapidamente em quantidades maiores durante a digestão. As isoflavonas são encontradas em alimentos à base de soja e exibem propriedades úteis para tratamento e prevenção de doenças, como cardiovasculares e osteoporose, câncer de próstata e câncer de mama, atividade estrogênica e antioxidante (HATI, 2015; LEVIS, 2010; RIMBACH, 2008; LIGGINS, 2000).

Na indústria alimentícia, as β -glicosidases tem potencial para serem usadas para a detoxificação da mandioca. A mandioca *Manihot esculenta* é uma planta rica em carboidrato que cresce em diversos lugares do mundo e serve como alimento básico para mais de 500 milhões de pessoas no mundo. Contudo, o consumo direto da mandioca crua pode ser prejudicial à saúde humana devido a presença dos compostos glicosídeos cianogênico linamarina e lotaustalina (VASCONCELOS *et al.*, 1990). Para isto, naturalmente a mandioca é detoxificada pela ação de linamarase e β -glicosidases exógena de microorganismos que aumentar a hidrólise dos compostos glicosídeos cianogênico de forma que se torne totalmente ótima para o consumo deste alimento (UGWUANYI, 2007; MADUAGWU, 1983).

3.4.5. Outras Aplicações das β -glicosidases

As β -glicosidases são conhecidas por terem também atividade sintética, nomeada

transglicosilação e hidrólise reversa que resultam na síntese de oligossacarídeos e aril e alquil- β -D-glicosídeos com variedade gama de aplicações. Síntese de oligossacarídeos por β -glicosidases é preferível do que glicosil transferases por causa da sua alta regio e estéreo-seletividade. Além disso, a síntese desses compostos não necessita da presença de açúcar nucleotídeo como no caso de glicosil transferases. Onde esses oligossacarídeos podem ser utilizados como agentes terapêuticos, ferramentas de diagnósticos, agentes promotores de crescimento (BANKOVA *et al.*, 2006).

Alquil-glicosídeos são outros compostos com uma gama de aplicações uma vez que são tensoativos não iônicos com alta biodegradabilidade e possuem propriedades antimicrobianas, com potencial aplicação na indústria farmacêutica, química, cosmética, alimentícia e outras. As amplas implicações funcionais e aplicações industriais da β -glicosidase evidenciam um alvo promissor para o estudo relacionado à sua maior produção, novas enzimas e maior estabilidade.

3.5. Cianobactérias

Cianobactérias são componentes naturais do fitoplâncton, encontradas em ambientes marinhos e de água doce, e são comumente chamadas de “algas azuis”, embora de forma errônea segundo alguns autores devido à ausência de membranas que circundam as suas estruturas internas e núcleo, diferentemente das algas que são todas eucarióticas. Esses microrganismos são conhecidos por utilizarem fotossíntese para obter energia necessária para sua sobrevivência e reprodução.

As cianobactérias foram organismos pioneiros, tendo sido registrado há mais de 3,8 bilhões de anos a partir de microfósseis semelhantes aos de cianobactérias atuais (KULASOORIYA *et al.*, 2012). Tendo desempenhado papel determinante na evolução da atmosfera oxidante do nosso planeta (OLSEN *et al.*, 2006). Os cloroplastos de algas eucarióticas e plantas originaram-se de endossimbiontes com relações com cianobactérias e este evento na evolução inicial estimulou o surgimento da flora tolerante ao oxigênio, além disso de fauna capaz da respiração aeróbica. (RAVEN, 2003; MARTIN, 1999).

Inicialmente as cianobactérias foram classificadas segund os padrões botânicos. Com a descoberta das características procarióticas desses organismos, foram caracterizados como organismos autotróficos fotossintetizantes e procarióticas pertencentes ao domínio *Bacteria* a partir de estudos bioquímicos, moleculares, estruturais (STANIER *et al.*, 1978). Segundo Kenneth (2006) as cianobactérias são um grupo de bactérias fotossintéticas evolutivamente

otimizada para condições ambientais de baixo oxigênio, algumas espécies são de nitrogênio e vivem livremente em relações simbióticas com plantas ou fungos em ampla variedade de solos úmidos ou em água.

As adaptações das cianobactérias permitem que colonizem uma grande variedade de habitats que incluem o fitoplâncton suspenso na água de lagos e oceanos, associadas a superfícies de sedimentos, rochas, plantas e em habitats territoriais como o próprio solo. Embora a sua alta variedade de ambientes, o seu crescimento é limitado a pH entre 4-5. Em alguns habitats extremos como fonte termais, as cianobactérias crescem a temperaturas de 70 °C (CASTENOLZ *et al.*, 1996).

As cianobactérias são variadas e diversificadas no Domínio Bacteria apresentando essa variabilidade de acordo com a sua morfologia de espécies unicelulares e coloniais até formas filamentosas. Entre as suas características predominantes estão as suas fisiológicas e estruturas, destacando-se a eficiência da captação de carbono e nutrientes, capacidade da realização de fotossíntese oxigenada, fixação de nitrogênio atmosférico. A fixação do nitrogênio pode ser realizada em células especializadas conhecidas como heterocistos. Na ausência do oxigênio, há a captação do nitrogênio e atividade da enzima nitrogenase, enzima esta que reduz o dinitrogênio atmosférico a amônia. Os aerótopos são vacúolos gasosos que contribuem na flutuação e na mobilidade aquática vertical. Assim, permitindo a exploração de recursos nutricionais depositados nas camadas mais profundas de corpos d'água. Em função da presença da parede celular, as cianobactérias são consideradas bactérias gram-negativas. Contudo, seu envoltório é consideravelmente mais espesso e gelatinoso que em certas espécies. Variação podendo atingir até 1000 nm de espessura (HOICZYK *et al.*, 2000). Sua estrutura é complexa constituída de uma bicamada lipídica externa com carotenóides, do sáculo de mureína constituído de peptidoglicanos, de um espaço periplasmático e externamente à parede celular muitos grupos secretam exopolissacarídeos que formam uma mucilagem parcialmente hidrossolúvel (DIGNUM, 2005; DREWS, 1982). Sua função oferece proteção contra a predação por protozoários, dessecação e contra agentes bacterianos (antibióticos, fagos, anticorpos, surfactantes). Ademais, os exopolissacarídeos exercem atividade aderente em regiões sólidas, captam elementos essenciais como ferro e cálcio.

Nos últimos anos, devido a diversas informações a respeito das cianobactérias, os sistemas de classificações têm sido modificados, buscando em reunir estudos da morfologia, ecologia, bioquímica, estruturas em um sistema polifásico descrito por Hoffman e colaboradores, baseado em semelhança genética, características morfológicas e reagrupa as

ordens e famílias em subclasses (tabela 3).

Hoje em dia, as cianobactérias são de preocupação pública e científica pela sua habilidade de se replicar desenfreadamente sob certas condições nutricionais, de luz, temperatura e outros parâmetros e são mais conhecidas por suas florações potencialmente tóxicas, causando problemas para o tratamento da água e sendo de potencial risco à saúde humana. Uma quantidade elevada na quantidade de nutrientes na água leva a alterações em todo o ecossistema, favorecendo a multiplicação excessiva de cianobactérias que conseqüentemente formam um acúmulo de células na superfície da água aparente como uma camada verde. Esse processo é referido como eutrofização. (NIENABER e STEINITZ-KANNAN, 2018).

Tabela 3 - Sistema de classificação de Hoffmann.

Classificação Polifásica
SUBCLASSE GLOEOBACTEROPHYCIDAE nom. prov. - Cocóides sem tilacóides Ordem GLOEOBACTERALES - 1 família Fotossíntese ocorre no citoplasma
SUBCLASSE SYNECHOCOCCOPHYCIDAE nom. prov. Tilacóides paralelos à superfície celular. Ordem SYNECHOCOCCALES - Organismos unicelulares ou coloniais. 4 famílias. Ordem PSEUDANABAENALES - Organismos filamentosos estreitos. 2 famílias
SUBCLASSE OSCILLATORIOPHYCIDAE nom. prov. Tilacóides radiais. Ordem CHROOCOCCALES - Organismos unicelulares ou coloniais. 11 famílias. Ordem OSCILLATORIALES- Organismos filamentosos grandes. 5 famílias.
SUBCLASSE NOSTOCOPHYCIDAE nom. prov. - Filamentos heterocitadas, arranjo irregular dos tilacóides. Ordem NOSTOCALES - 10 famílias

Fonte: Adaptado de Hoffmann.

Durante este crescimento, algumas cianobactérias produzem compostos tóxicos (cianotoxinas) que comprometem a qualidade dos recursos hídricos. As cianotoxinas são produtos do metabolismo secundário das cianobactérias e estas podem ser classificadas de acordo com seu mecanismo de ação em: (1) hepatotóxicas, que são as microcistinas e nodularinas; (2) neurotóxicas, representadas pelas anatoxinas, homoanatoxina e saxitoxinas; (3) citotóxicas, a cilindrospermopsina e (4) as dermatóxicas, como lingbiatoxina (BERRY, 2010; CHRISTOFFERSEN, 2000 CHORUS, 1998).

3.5.1. *Microcystis aeruginosa* e β -glicosidases

O gênero *Microcystis* é uma das cianobactérias de água doce formadoras de florações mais comuns no ecossistema e recebe grande atenção das pesquisas pela sua ampla

distribuição geográfica e a frequente produção de toxinas. Atualmente, este é um dos gêneros que apresenta muitas espécies tóxicas, de forma cosmopolita, colonial e abrange 25 espécies tipicamente planctônicas (KOMÁREK *et al.*, 2014). As principais características morfológicas do gênero são colônias formadas por células arredondadas cocóides com presença de aerótopos, arranjas irregularmente em envelope mucilaginoso (KOMÁREK, 2005).

As β -glicosidases de cianobactérias e do gênero *Microcystis* são majoritariamente pertencentes a família 3 das glicosil hidrolases e estão localizadas no citoplasma (KETTLER, 2007; KANEKO *et al.*, 1996). As β -glicosidases e β -N-acetilglucosaminidase são enzimas reportadas na literatura por estarem envolvidas na reciclagem da parede celular. As cianobactérias apresentam-se como potenciais produtoras de glicosidases, porém a sua abordagem e mecanismo ainda são poucos explorados assim como de inibidores para α - e β -glicosidases para o desenvolvimento de fármacos, uma vez que glicosidases estão envolvidas em processos biológicos e patológicos, são utilizados na terapia de doenças como diabetes, doenças de Gaucher, obesidades e outros (PASTORES, 2018).

Os compostos naturais que apresentam potencial de inibição para alfa e beta-glicosidase pertencem às classes estruturais dos dissacarídeos (kajibiose, nigerose, inibidores de alfa-D-glicosidase I e alfa-D-glicosidase II), iminoaçúcares (alcalóides polihidroxilados e nojirimicina), tioaçúcares (salacinol) e derivados não-glicosídicos (N-p-cumaroil-Nferuloilputrescina e N-N –diferuloilputrescina) (MELO *et al.*, 2006).

Portanto, este estudo buscou elucidar, caracterizar estruturas (*in silico*) e bioquimicamente (*in vitro*) β -glicosidases da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* CACIAM 03, para um melhor entendimento das suas funções biológicas e de sua possível aplicação biotecnológica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Busca das Sequências Codificantes

Os dados de sequenciamento e anotação automática do metagenoma da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* CACIAM03 a serem utilizadas em nosso trabalho foram cedidos pelo Laboratório de Tecnologia Biomolecular (LTB), do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

O metagenoma utilizado fora analisado pela ferramenta BLASTp disponível no Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI) com o objetivo de identificar prováveis sequências codificantes de β -glicosidase no decorrer de toda a sequência do DNA metagenômico e obter as sequências de aminoácidos codificadas.

4.2. Análises *in silico* da Estrutura Primária

A análise das sequências codificantes da proteína foi realizada usando as ferramentas SMART (LETUNIC, 2017) e CDD disponível no NCBI para determinação dos domínios conservados, motivos, sítios catalíticos e ativos na sequência de interesse. As características bioquímicas adicionais foram obtidas através da ferramenta gratuita PredictProtein, como, por exemplo, motivos proteicos; regiões de baixa complexidade; predição de estrutura secundária; acessibilidade ao solvente; hélices transmembrana; pontes dissulfeto; e anotações funcionais, localização subcelular. (MARCHLER-BAUER, 2011; MARCHLER-BAUER, 2009; MARCHLER-BAUER, 2004; ROST, 2004).

4.3. Alinhamento das Sequências e Identificação do Motivo Conservado

Sequências homólogas de β -glicosidase de *Microcystis* e outros microrganismos e os graus de identidade foram identificados através do BLASTp (proteína) no NCBI. O BioEdit fora utilizado para editar as sequências obtidas e alinhar pelo método da ferramenta ClustalW e identificado no ENDscript (HALL, 1999; CORPET, 1988).

4.4. Localização Subcelular

A localização subcelular foi prevista a partir das ferramentas PSORTb v3.0 e Predict Protein onde se conhecer a localização da proteína é particularmente importante para a anotação funcional das proteínas, esses métodos preveem a localização das proteínas através do reconhecimento de peptídeos sinais localizados na região N-terminal da sequência

proteica.

4.5. Caracterização Físico-Química

Para a determinação dos parâmetros físico-químicos das proteínas identificadas, foi utilizada a ferramenta gratuita ProtParam. O ProtParam é uma ferramenta que permite o cálculo de vários parâmetros físico-químicos de proteínas que podem ser deduzidos através da análise da sequência, sem necessidade de informações adicionais. Os parâmetros calculados pelo ProtParam incluem: massa molecular; ponto isoelétrico (pI) teórico; composição de aminoácidos; composição atômica; coeficiente de extinção; meia-vida estimada; índice de instabilidade; índice alifático; e grande média de hidropaticidade (GASTEIGER *et al.*, 2005).

4.6. Análise *in silico* da Estrutura Secundária

Para a análise e determinação α -hélices, folhas- β , *loops* e afins, os servidores GOR IV, SopMA e CFSSP foram utilizados, estes *softwares* utilizam metodologias e algoritmos diferentes para prever o padrão da estrutura. Os *softwares* testados funcionam fornecendo estimativas de probabilidades para três estruturas secundárias em uma determinada posição do resíduo, e tem a vantagem sobre o vizinho mais próximo e métodos baseados em rede neural pela identificação do que é considerado e parâmetros negligenciados para previsão (GARNIER *et al.*, 1996).

O ENDsript foi utilizado neste estudo para o alinhamento e comparação das estruturas primárias e secundárias entre as sequências de interesse e os modelos do Protein Data Bank (PDB), com a finalidade de identificação de similaridades estruturais e resíduos conservados. O ENDsript é uma ferramenta gratuita que analisa sequências de aminoácidos, gerando diversos resultados, que incluem estrutura secundária e terciária das proteínas de interesse de forma rápida e prática (GOUET; COUCELLE, 2003).

4.7. Modelagem Molecular por Homologia Comparativa

As estruturas tridimensionais das proteínas foram modeladas usando o Modeller 10.2 (WEBB *et al.*, 2016). A qualidade dos modelos gerados foi avaliada com PROCHECK (LASKOWSKI *et al.*, 1993) por *Ramachandran plot analysis*. A qualidade estereoquímica e a precisão dos modelos selecionados foram melhoradas submetendo-os à minimização de energia com o conjunto de parâmetros GROMOS11, implementação do Swiss-PDB Viewer (KAPLAN *et al.*, 2001).

A validação dos modelos gerados foi posteriormente realizada pelos programas VERIFY 3D (EISENBERG *et al.*, 1997) e ERRAT (COLOVOS *et al.*, 1997). ProSA (SIPPL *et al.*, 1993) foi usado para a análise de Zscores e gráficos de energia. As estruturas tridimensionais das proteínas modeladas foram analisadas usando o visualizador UCSF Chimera. Os valores do Desvio Quadrado Médio da Raiz (RMSD) foram calculados entre o conjunto de alvos e a proteína modelo para ver o quanto a proteína modelada se desvia da estrutura da proteína modelo.

4.8. Análise Filogenética

A árvore filogenética foi gerada utilizando o método de construir a árvore pelo *neighbor-joining* (NJ) e o máximo parcimonioso usando o conjunto do MEGAX (GUINDON, *et al.*, 2009). A metodologia adotada para a construção da árvore filogenética fora de se obter as CDs do trabalho e sequências codificantes das famílias de β -glicosidases dos mais diversos organismos já caracterizados e depositados no CAZy, realizar o alinhamento múltiplo das sequências com o Clustal Omega e para determinar a confiabilidade dos alinhamentos, calculou-se a distância média geral com o método de *bootstrap* com 1000 ciclos, aceitando os alinhamentos com valores <0.7 (THOMPSON; PLEWNIAK; POCH, 1999).

4.9. Cultivo Das Cianobactérias

A linhagem de *Microcystis aeruginosa* utilizada neste trabalho é pertencente à Coleção Amazônica de Cianobactérias e Microalgas (CACIAM), com uma replicata em cultivo no Laboratório de Biotecnologia de Enzimas e Biotransformações (LaBEB), no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará. O microrganismo foi cultivado em meio BG-11 a 25 °C e submetidos a um ciclo de luz de 12/12 h. A cianobactéria foi inoculada inicialmente em Erlenmeyers de 250 mL com um volume de 100 mL de meio BG-11. Posteriormente, ao atingirem a absorbância inicial de 0,100 (DO750), foram inoculadas (100 mL) em Erlenmeyers com 1 L de meio BG-11 e cultivadas por 45 dias.

4.10. Extração para Obtenção do Extrato Enzimático

Para a extração, os métodos descritos por Lubberding e Zimmer (1983), Santos e Oliveira (2011) e Karageorgou e Sainis (2020) foram aplicados com modificações. As células cultivadas da cianobactéria foram centrifugadas a 10.000 g por 10 min à 4°C e, após este processo, foram ressuspensas com tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,0 com Inibidor de

Protease nas mesmas condições propostas.

O sobrenadante foi descartado e o *pellet* submetido ao sonificador ultrassônico para lise completa das células em 5 ciclos de 10 segundos com 60 % de potência. A centrifugação foi novamente aplicada a 10.000 g por 10 min a 4 °C, ao fim o sobrenadante fora coletado, alíquotado e submetido a próxima etapa.

4.11. Quantificação da Atividade β -glicosidase

A atividade da β -glicosidase fora determinada de acordo com a hidrólise do substrato *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNPG) usando como a taxa de acumulação de produto de reação colorido utilizando 125 μ L de extrato enzimático, 125 μ L de solução pNPG a 20 mM e 250 μ L de solução tampão citrato fosfato a 100 mM pH 5. Incubou-se a mistura a 35 °C por 15 minutos e foi usado 500 μ L de solução de carbonato de sódio 0,2 M para paralisar a reação. A estimativa da atividade enzimática foi realizada em espectrofotômetro a 400 nm. (GROVER, A. K.; MACMURCHIE; CUSHLEY, 1977; GROVER, ASHOK K; CUSHLEY, 1977).

A atividade enzimática de β -glicosidase fora calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Atividade enzimática} \left(\frac{\text{U}}{\text{mL}} \right) = \frac{[(\text{Abs teste}) - (\text{Abs controle}) * \text{Vt} * \text{fd}]}{\epsilon * t * \text{Vs}} * 1000$$

Onde,

Atividade é dada em U/mL

Abs_{teste} = leitura da absorbância para o testado em 400 nm

Abs_{controle} = leitura da absorbância para um controle sem reação a 400 nm

Vt = Volume total (mL)

Vs = Volume de reação (mL)

ϵ = Coeficiente de extinção milimolar do pNPG nas condições do ensaio (18,1 $\text{cm}^2 \cdot \mu\text{mol}^{-1}$)

fd = Fator de diluição

4.12. Caracterização da β -glicosidase

O perfil de pH para a *MaBgl3* foi construído determinando atividade frente ao PNPG a 35 °C a 30 minutos, com os seguintes tampões: tampão citrato 100 mM (pH 3,0-6,0), tampão fosfato 100 mM (pH 6,0-8,0) e tampão Tris-HCl 100 mM (pH 8,0-9,0) com variação de 0,05 para cada ponto. O efeito da temperatura na atividade da β -glicosidase foi analisada medindo

a atividade enzimática em temperaturas de 20 a 50 °C em tampão citrato 100 mM (pH 5,0). Para a quantificação de proteína utilizaremos o método de quantificação colorimétrica de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando como padrão uma solução de 1 mg/mL de (BSA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Sequência de Aminoácidos de β -Glicosidase

Por meio de sequência consensus de β -glicosidases e utilizando a ferramenta de pesquisa de alinhamento básico local (BLAST), encontrou-se a sequência de cDNA que codifica para β -glicosidase CACIAM 03, daqui em diante designada como *MaBgl3* (*Microcystis aeruginosa* Beta-glicosidase 03). A tradução para aminoácidos está anotada no NCBI como OCY13127.1 com 1578 pb codificando uma proteína de 526 aminoácidos de comprimento e com peso molecular um pouco mais de 57 kDa (Tabela 4).

Tabela 4 - Comparação da sequência *MaBgl3* frente a outras sequências de β -glicosidases de várias *Microcystis* spp.

Descrição	Tamanho (aminoácido)	Peso Molecular (Da)	Identidade (%)	Número de Acesso
β -glicosidase (<i>Microcystis aeruginosa</i>) *	526	57.249,31	100	OCY13127.1
β -glicosidase (<i>Microcystis viridis</i>)	526	57.437,39	97,72	WP_125731855
β -glicosidase GH3 (<i>Microcystis aeruginosa</i>)	526	57.415,52	98,10	WP_159250140.1
β -glicosidase (<i>Microcystis</i> sp. 0824)	526	57.283,36	98,10	WP_108937562.1
β -glicosidase (<i>Microcystis</i> sp. LEGE 00066)	512	55.728,42	98,24	WP_051048499.1
β -glicosidase (<i>Microcystis wesenbergii</i>)	512	55.750,53	97,85	WP_199319088.1
β -glicosidase GH3 (<i>Microcystis viridis</i>)	512	55.726,43	97,85	WP_069475087.1
β -glicosidase (<i>Microcystis flos-aquae</i>)	512	55.866,66	97,27	WP_199328767.1

Fonte: Elaborada no BLASTp pelo autor.

Nota: *pertencente a este trabalho

A partir da sequência codificante, submetemos a análise no CDD e SMART para se encontrar domínios, motivos e a identidade da proteína. Fora possível identificar a presença domínio N-terminal (Ser⁷-Ala³³⁸, 331 aminoácidos) e domínio C-terminal (Thr³⁸³-Glu⁵¹³, 127 aminoácidos) com *E-value* de $1,78e^{-98}$. Onde quanto mais baixo o *E-value*, mais significativo é a sequência correspondente estudada. Ademais, no SMART confirmou a proteína ser pertencente da família 3 das glicosil hidrolases (GH3). A partir daqui em diante a proteína foi designada *MaBgl3* (*Microcystis aeruginosa* beta-glicosidase GH3).

A proteína *MaBgl3* fora identificada como β -glicosidase após o alinhamento por BLASTp e a maior homologia foi com encontrada com β -glicosidase isolada da cepa de *Microcystis* sp. LEGE00066 com 98,24 % de identidade. Esses achados aliados ao alto grau de identidade, confirmam ainda mais a identidade da proteína. Interessantemente ainda foi encontrada uma alta porcentagem de identidade com outra enzima da mesma família, a N-acetil- β -glucosaminidase e similaridade com subfamília da família das glicosil hidrolases 3.

As análises do PREDICT PROTEIN reportaram que a *MaBgl3* está envolvida em inúmeros processos biológicos com um índice de confiança igual a 50% (Tabela 5). Ademais é apontada como sendo um componente do citoplasma, a localização celular prevê que a proteína esteja localizada no citoplasma com 100% de confiança e é corroborada a predição com a ferramenta PSORTb que prediz como citoplasmática.

Tabela 5 - Resultado do PredicProtein sobre anotação de função.

Processo Biológico		
Cód. Gen. Ontologia	Descrição	Confiança (%)
0009254	<i>Turnover</i> de peptidoglicano	51
0005975	Processo Metabólico de Carboidratos	51
0009252	Processo sintético de peptidoglicano	51
0071555	Divisão celular	51
0008360	Regulação da forma celular	51
0071555	Organização da parede celular	51
0007049	Ciclo de célula	51
0051128	Regulação da organização dos comp. celulares	51
Função Molecular		
0016231	Atividade N-acetil- β -glucosaminidase	50
0080082	Atividade β -glicosidase	50
Localização Celular		
	Citoplasma	72

Fonte: PredictProtein

Este resultado torna-se interessante quanto a função desta enzima em cianobactéria estar exercendo atividade bifuncional, para hidrólise de glicosídeos e de acetilglicosaminas, uma vez que outras enzimas da família GH3 foram caracterizadas como mais de uma atividade. Lee e colaboradores em 2003, caracterizaram uma enzima bifuncional com atividade α -arabinofuronidase e β -xilosidase. Mayer (2006) em que é elucidada uma enzima bifuncional com função de β -glicosidase e N-acetilglucosaminidase. Este resultado representa uma ligação evolutiva de conservação de motivos e outras regiões conservadas da enzima.

5.2. Alinhamento da Sequência e Identificação dos Motivos

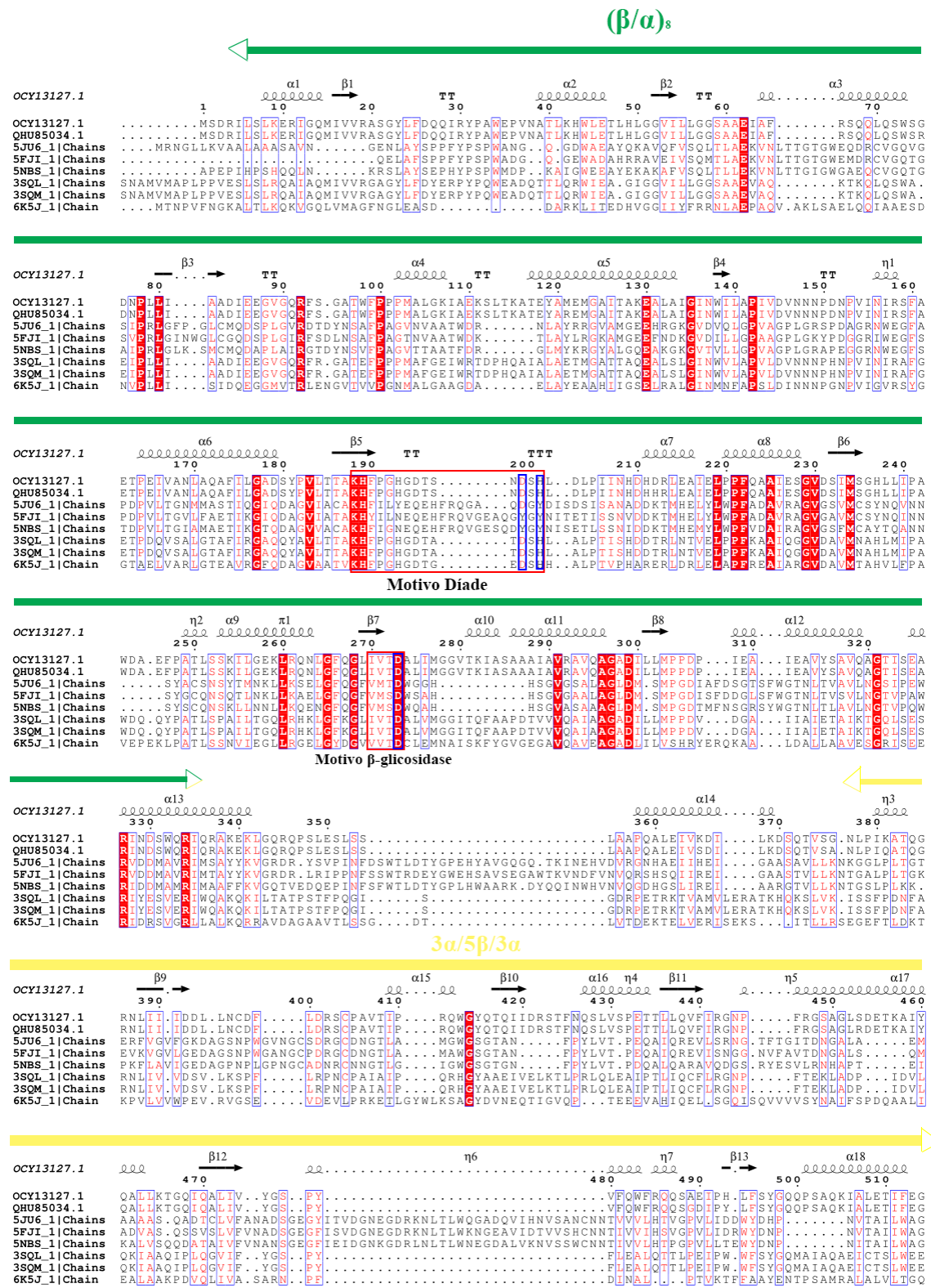
As sequências aqui analisadas foram obtidas por BLASTp frente ao banco de dados de proteínas referentes, uma vez que as estruturas representativas estão caracterizadas e elucidadas quanto a sua família e mecanismo de catálise. O alinhamento das sequências múltiplas se tornou fundamental para a predição do modelo tridimensional e identificação das regiões conservadas. A sequência baseada na estrutura (Figura 6) fora feita com ortólogos mencionados já bem estudados da família GH3 e revelaram importantes resíduos catalíticos

conservados para N-acetilglucosaminidase e β -glicosidase. As sequências de acordo com propriedades físicas possuem similaridades maiores do que 70% são mostradas em vermelhas, os resíduos Asp¹⁹⁹ e His²⁰¹ são conservados no motivo consenso [K-H-F-P-G-(H/L)-G-X₄-D-(S/T)-H], como díade catalítica His-Asp (catalisador ácido/base) e o Asp²⁷³ como catalisador nucleofílico completamente conservado na família dessas enzimas e unicamente da família GH3 (DUCATTI, 2016; MACDONALD, 2015).

Durante os experimentos com a β -glicosidase de *A. wentii*, Legler (1974) identificou uma sequência conservada para o resíduo nucleofílico aspartato entre os membros da família GH3 o motivo VMSDW. Na figura 6, vemos uma significância alteração para β -glicosidases de cianobactérias, o motivo encontrado foi IVTDA diferentemente do reportado para fungos VMSDW (Código PDB: 5FJI, 5NBS e 5JU6), uma vez que esse motivo é apenas encontrado em β -glicosidases, pode ser especulado que houve evolução dessa enzima com características novas a serem exploradas, com seus resíduos principais conservados. Não fora encontrado o resíduo glutamato ácido/base usualmente encontrando na região C-terminal de β -glicosidases

Foram utilizadas as sequências de β -glicosidase de *Microcystis aeruginosa* NIES-298 (NCBI ID: QHU85034.1), *Rasamsonia emersonii* (Código PDB: 5ju6), *Aspergillus fumigatus* (Código PDB: 5fji), *Neurospora crassa* OR74A (Código PDB: 5nbs), *Synechococcus* sp. PCC 7002 (Código PDB: 3sql) e N-acetilglucosaminidase *Synechococcus* sp. PCC 7002 (Código PDB: 3sqm) e *Paenibacillaceae* sp. FPU-7 (Código PDB: 6k5j). O alinhamento destas sequências abaixo fora feito segundo o ESPript 3.0 com 70% de similaridade e estruturas marcadas (Figuras 6):

Figura 6 - Múltiplo alinhamento seqüências de β-glicosidasas da família GH3. **MaBgl3* do estudo.



5.3. Localização da Sequência Proteica

Na previsão da localização da *MaBgl3* pode-se concluir que os valores obtidos no PSORTb e DeepLoc 1.0 de 0.926 e 0.4663, respectivamente, sugerem que a maior probabilidade de a proteína estar presente predominantemente no citoplasma das cianobactérias e é uma enzima intracelular (Tabela 6). Esse posicionamento oferece e corrobora uma hipótese sobre a função da *MaBgl3* na *M. aeruginosa* CACIAM 03.

Tabela 6 - Localização Subcelular da *MaBgl3* nas ferramentas (A) PSORTb v3.0 e (B) DeepLoc 1.0.

(A)	
Localização	Probabilidade (%)
Citoplasma	92,6
Periplasma	4,8
Membrana celular	2,4
Membrana externa	0,1
Extracelular	0,1

(B)		
Localização	Probabilidade (%)	Tipo
Citoplasma	46,63	Solúvel
Peroxisomo	37,29	
Mitocôndria	6,63	
Retículo Endoplasmático	3,316	
Extracelular	1,59	

Fonte: Elaborada pelo autor.

Saloheimo e colaboradores (2002) demonstraram *in vitro* que a β -glicosidase intracelular de *T. reesei* esteja envolvida na formação do indutor sofrorose a partir da transglicosilação da celobiose. Uma vez que membros da família GH3 possam estar no meio extracelular, periplasmático ou citoplasmático e participam da assimilação de celobiose e celodextrinas (FAURE *et al.*, 2002) e β -1,3-glicosídeos (ZVERLOV *et al.*, 1997). A contribuição para a hipótese é difícil de demonstrar à presença de várias enzimas exibindo atividade semelhante no mesmo organismo, onde os testes em bancadas com a variedade de substratos podem responder a hipótese.

5.4. Caracterização Físico-Química

Os parâmetros físico-químicos de ponto isoelétrico teórico (pI), massa molecular (MW), coeficientes de extinção, índice de instabilidade (II), índice alifático (IA) e índice de hidropaticidade (GRAVY). Estes dados de caracterização da cadeia polipeptídica podem fornecer dados importantes sobre a estrutura e propriedade desta proteína. A análise

computacional mostrou que a proteína *MaBgl3* tem massa molecular de 57,24 kDa e é uma proteína ácida (pI 5,01). O que está de acordo com outros estudos de caracterização de β -glicosidases de diversos organismos aqui apresentado. O índice de instabilidade fornece a estimativa para a estabilidade metabólica de proteínas *in vivo* (GAMAGE *et al.*, 2019). Este índice é baseado em uma escala de estabilidade em que valores inferiores a 40 podem ser considerados como uma proteína estável, enquanto valores superiores a 40 preveem uma proteína que pode ser instável.

Com base nessa análise a *MaBgl3* poderia ser considerada instável pois o índice de instabilidade mostrou um valor de 41,25 (>40). Este resultado se torna interessante para este trabalho, uma vez que a separação de uma proteína instável é um desafio, especialmente para a purificação da enzima em que uso de técnicas convencionais de cromatografia é difícil e pode resultar na perda completa da atividade biológica da proteína alvo. Portanto, é necessário a busca de metodologias e estratégias que possam ajudar a manter as proteínas instáveis em sua conformação nativa durante os procedimentos de purificação. O valor GRAVY é calculado como a soma dos valores de hidropatia de todos os resíduos dividido pelo número total de aminoácidos na sequência. Com o valor de GRAVY para *MaBgl3* sendo negativo de -0.004 sugere que há uma baixíssima possibilidade de interações aquosas. O índice alifático, por sua vez, descreve o volume relativo de uma proteína ocupado por suas cadeias laterais alifáticas no espaço, onde quanto maior o valor, mais termicamente estável a proteína é prevista. O valor do índice alifático de *MaBgl3* foi de 101,73 e sugerem a estabilidade térmica da enzima. Para complementar este dado o servidor Dianna revelou a existência de uma interação cistina entre os resíduos Cys³⁹⁷-Cys⁴⁰⁴, a existência dessa ligação dissulfeto na estrutura da *MaBgl3* pode proporcionar maior estabilidade à proteína corroborando com o resultado obtido para estabilidade térmica.

5.5. Análise da Estrutura Secundária

As estruturas secundárias previstas pelos servidores GOR IV, SopMA e CFSSP (Tabela 7), mostraram a predominância de α -hélices 39,37 - 42,78%, seguida de folha- β 11,6-14,45% e de alças 39,15-45,82%. Os dois elementos estruturais secundários mais comuns são as α -hélices e folhas- β mantidas por ligações de hidrogênio, e também há a ocorrência de estruturas consideradas desordenadas como voltas, alças, *loops* dentre outras que estão presentes na cadeia polipeptídica (LINDING *et al.*, 2003).

Ademais fora utilizado o método altamente preciso do PSIPRED sendo um resultado

com um bom grau de confiabilidade mostrado na figura 8 sendo analisado cuidadosamente sob a predição da *MaBgl3*. Foi observado que, por mais que utilizem abordagens diferentes para prever o padrão da estrutura secundária, que em todos os casos houve a predominância de alças como elementos estruturais.

Tabela 7 - Análise da estrutura secundária da enzima *MaBgl3* usando diferentes servidores.

Softwares	α -Hélices		Folha- β		Alças	
	Nº de resíduos	Porcentagem (%)	Nº de resíduos	Porcentagem (%)	Nº de resíduos	Porcentagem (%)
GOR IV	209	39,37	76	14,45	241	45,82
SopMA	225	42,78	69	13,12	206	39,16
CFSSP	221	42	61	11,6	228	43,34

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na figura 7 podemos observar em azul o grau de confiança, em rosa as α -hélices (H), em amarelo as folhas- β (E):

Figura 7 - Resultado do PSIPRED para a estrutura secundária da *MaBgl3*. (Continua)

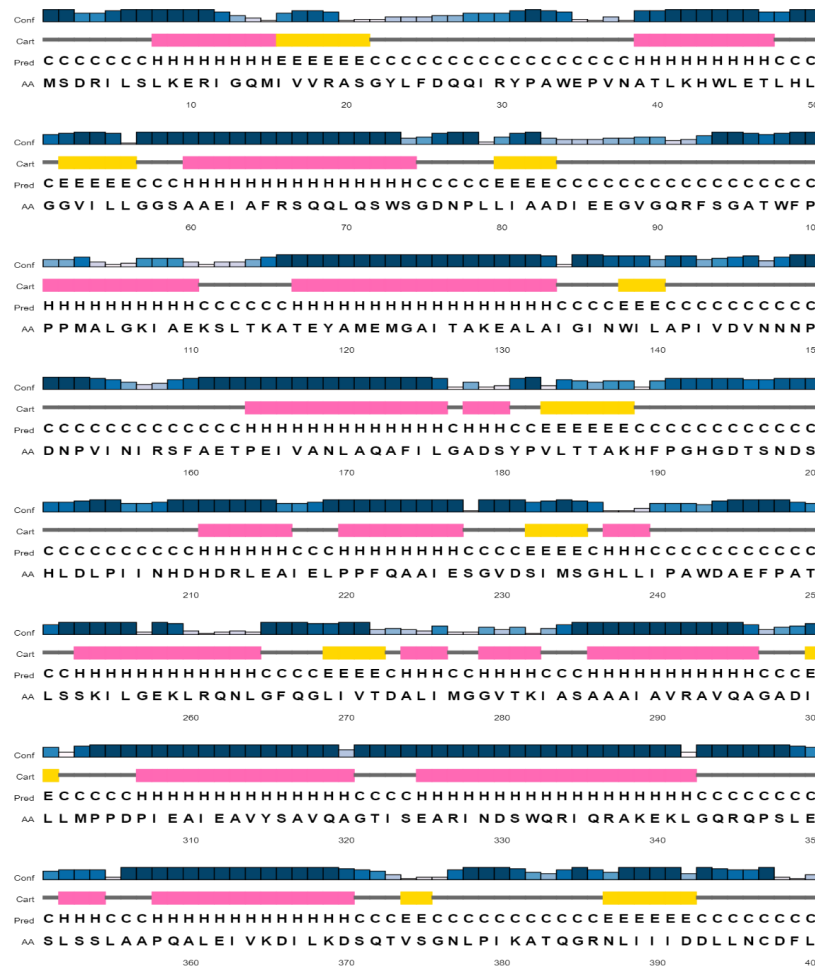
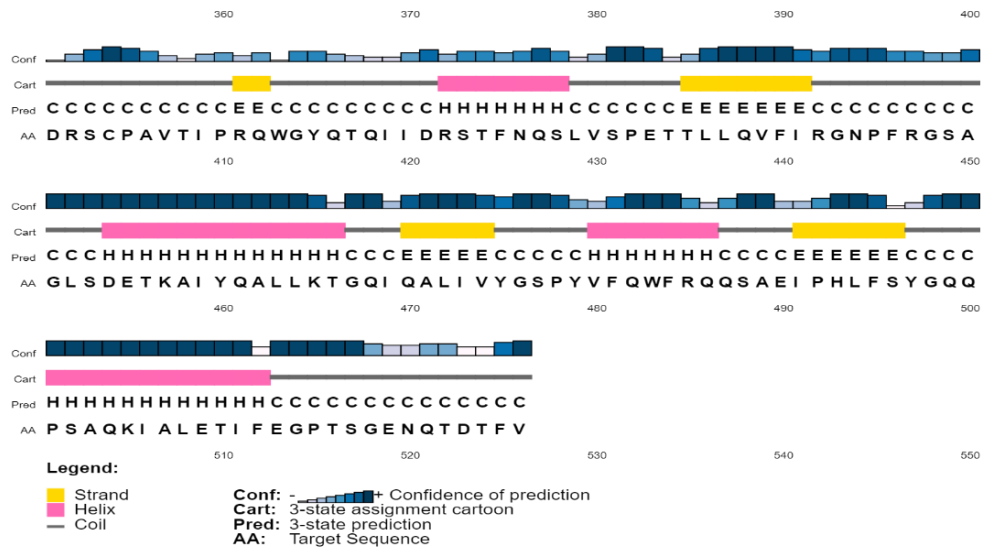


Figura 7 - Resultado do PSIPRED para a estrutura secundária da *MaBgl3*. (Conclusão).



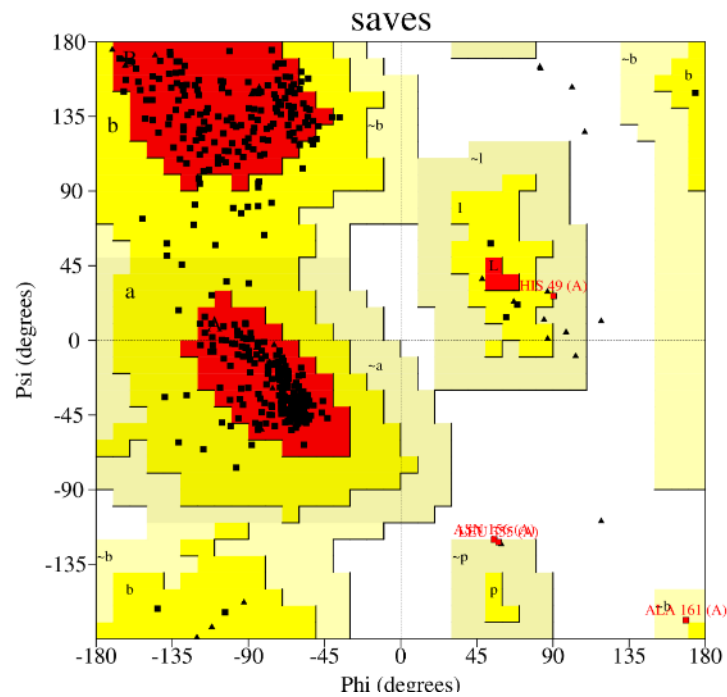
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.6. Construção e Avaliação do Modelo

O primeiro passo na predição do modelo para *MaBgl3* fora através da busca de moldes adequados no *Protein Data Bank* como resultados, as estruturas: 6K5J, 3SQL, 3SQM, 3TEV, 6JTJ, 3GS6, todas pertencentes à família GH3 de β -glicosidases e N-acetilglucosaminidases, foram selecionadas de acordo com os parâmetros de cobertura, E-value, identidade da sequência e resolução estrutural de cada modelo. O modelo *MaBgl3* foi construído pelo software Modeller a partir do *script* “model_mult.py” e qualidade avaliada no PROCHECK. Observou-se que a grande maioria de pares de ângulos estão distribuídos de acordo com regiões favoráveis ou permitidas no *plot* Ramachandran de 95,37 % (Figura 8).

A qualidade geral do modelo (QMEAN), o fator de qualidade e a pontuação média do modelo *MaBgl3* foram avaliadas pelo MolProbity, ERRAT e VERIFY 3D, respectivamente. Tendo um Z-score de -1,18 e QMEAN 0,88, de acordo com este resultado o modelo *MaBgl3* pode ser classificado como um modelo de boa qualidade gerado. As interações não ligadas entre átomos-átomos na estrutura foram analisadas no ERRAT (Figura 9). O fator de qualidade geral para o modelo *MaBgl3* foi de 89,08 % de acordo com a escala de limite de confiança ERRAT (<95%). Os resultados do VERIFY 3D para o modelo *MaBgl3* demonstrou que 97,32 % dos resíduos de aminoácidos apresentaram um score 3D-1D médio superior a 0,2 o que indica um modelo bem construído com todos os resíduos bem posicionados na conformação enovelada:

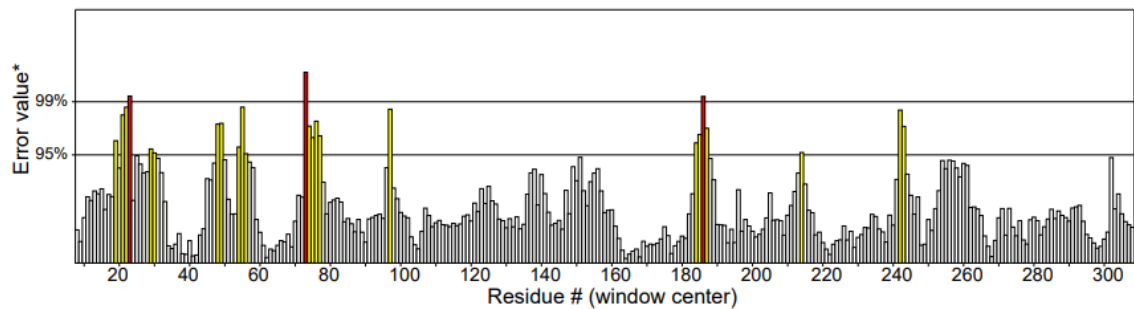
Figura 8 - Gráfico de Ramachandran da *MaBgl3*.
Ramachandran Plot



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 9 - Análise de qualidade global do modelo *MaBgl3* de acordo com o servidor ERRAT - As regiões menos favorecidas estão em vermelhas e as regiões mais favorecidas estão em brancos.

Program: ERRAT2
 File: model_05.pdb
 Chain#:A
 Overall quality factor**: 89.084

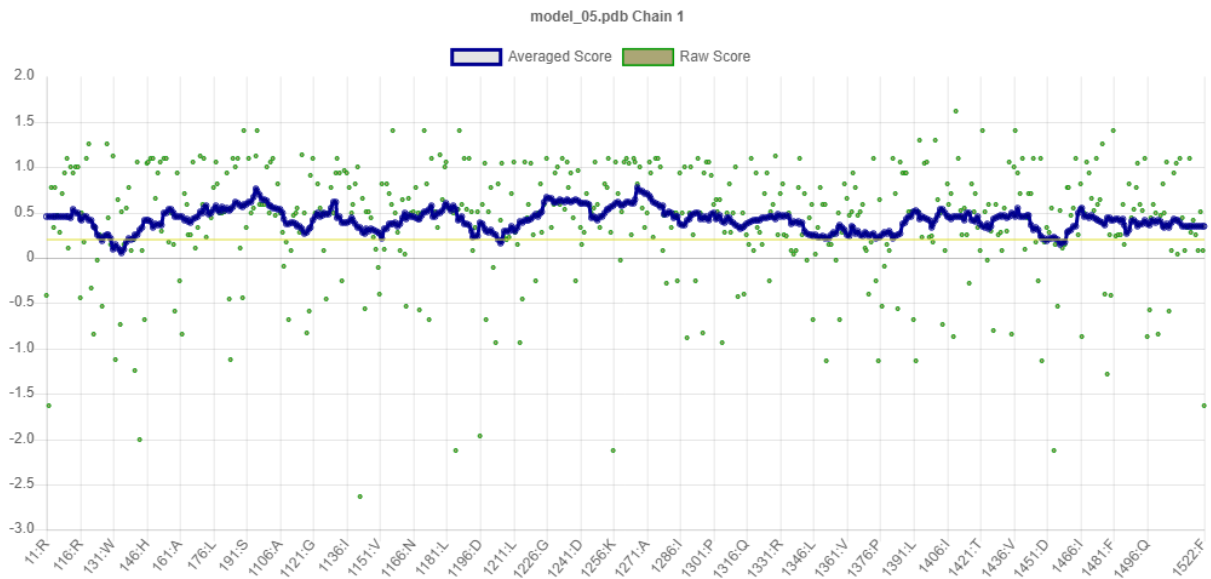


*On the error axis, two lines are drawn to indicate the confidence with which it is possible to reject regions that exceed that error value.
 **Expressed as the percentage of the protein for which the calculated error value falls below the 95% rejection limit. Good high resolution structures generally produce values around 95% or higher. For lower resolutions (2.5 to 3Å) the average overall quality factor is around 91%.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Podemos concluir que o modelo final obtido é um modelo bem construído com ótima qualidade para ser analisada via PyMol quanto a sua interação, a forma e o seu tipo de enovelamento com β -glicosidases e N-acetilglucosaminidases.

Figura 10 - Gráfico modelo 3D para *MaBgl3* de acordo com o servidor VERIFY 3D. O eixo vertical representa a pontuação média do perfil 3D-1D para resíduos em uma janela deslizante de 20 resíduos. O eixo horizontal representa o número de resíduos na sequência primária da proteína.

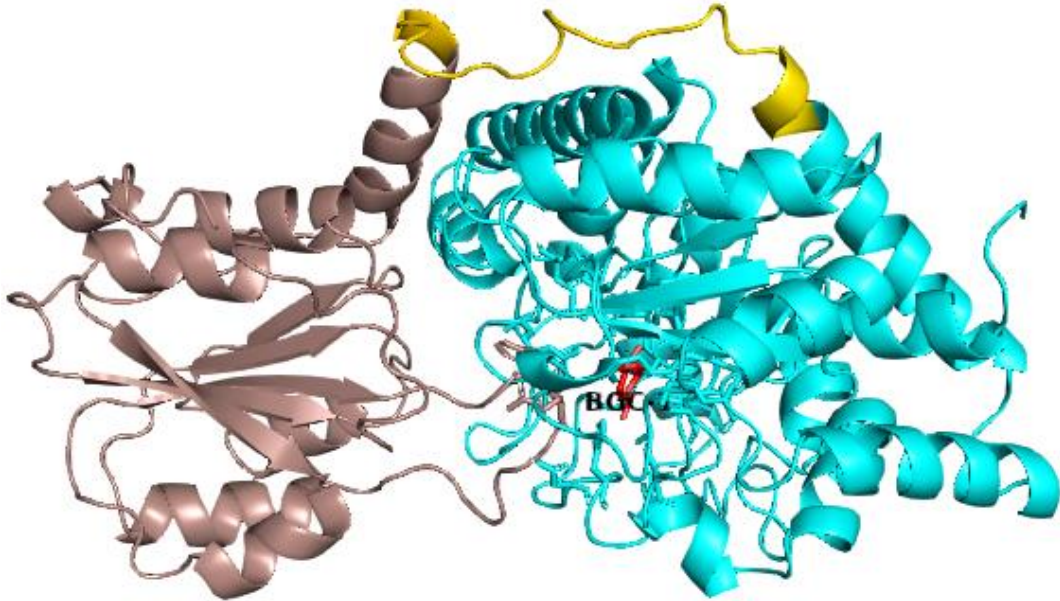


Fonte: Elaborado pelo autor.

5.6.1. Estrutura Geral Da *MaBgl3*

A estrutura da *MaBgl3* foi determinada usando como molde uma β -glicosidase de *Synechococcus* sp. (52,34 % de similaridade de sequência, PDB 6K5J). Entre as enzimas que fazem parte da família GH3 depositada no CAZy, apenas duas β -glicosidases com estruturas resolvidas de fungos e que possuem estruturas significativamente diferentes quando comparadas as suas estruturas resolvidas. Ademais, um ponto a ser destacado é a escassez de enzimas pertencentes à família GH3 que foram efetivamente estudadas do ponto de vista estrutural, molecular e funcional, menor quando falamos de β -glicosidases de cianobactérias. A estrutura da enzima *MaBgl3* pode ser dividida em dois domínios. Um domínio N-terminal (representado em ciano na figura 11), enovelado como um barril TIM (β/α)₈ distorcido, semelhante ao enovelamento típico das enzimas β -glicosidases da família GH1, que são enzimas estruturas em um único domínio com enovelamento TIM. O domínio, que envolve os aminoácidos de Ser⁷ a Ala³³⁸, encontra-se a total parte do sítio ativo. A presença de uma molécula de β -D-Glicose presente ao sítio ativo, auxiliou a compreender a participação dos resíduos presentes do sítio ativo e da interação com substratos.

Figura 11 - Estrutura tridimensional da enzima *MaBgl3*. Os dois domínios estão representados nas cores ciano (N-terminal) e salmão (C-terminal) e em amarelo o *loop* de ligação. Uma molécula de glicopirranose no sítio ativo está mostrada em vermelho (BGC).

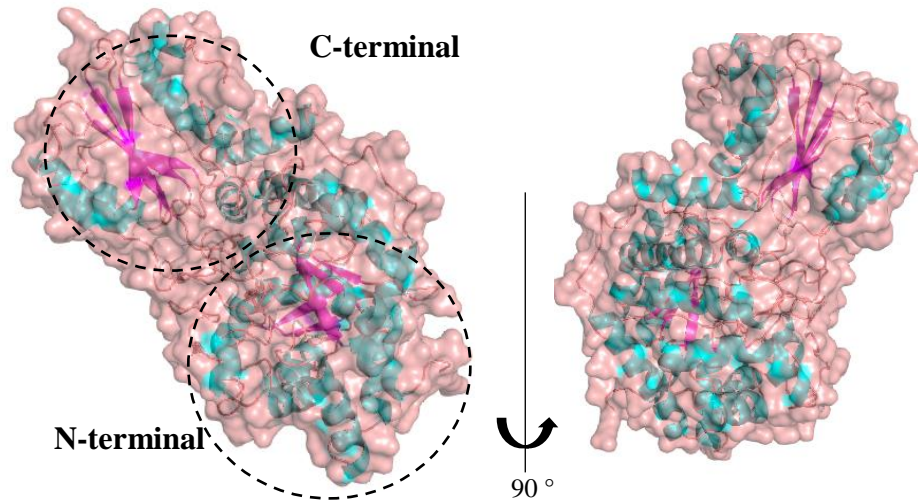


Fonte: Elaborada pelo autor.

Um *loop* que envolve os resíduos Lys³⁴¹ a Glu³⁵⁹ encontra-se do lado contrário ao sítio ativo da enzima, assim demonstrando que não há participação deste no reconhecimento do substrato ou mesmo na regulação cinética de acesso do substrato ao sítio catalítico. O domínio C-terminal compreende os aminoácidos Thr³⁸³ a Glu⁵¹³ constituído por um sanduíche de três α -hélices, cinco folhas- β paralelas e, finalizando, três α -hélices. Essa dobra do domínio C-terminal se assemelha à encontrada em estudos de N-acetilglicosaminidases, como uma dobra do tipo $3\alpha/6\beta/3\alpha$ que estão razoavelmente longe do sítio catalítico do domínio N-terminal (QIN *et al.*, 2015). O papel deste domínio não está estabelecido, mas já fora proposto na literatura em como este domínio esteja agindo na fixação do substrato na posição correta ao sítio ativo, adesão de carboidratos da parede celular de microrganismos que as produzem (POZZO *et al.*, 2010) e no reconhecimento de substratos seja este o caso de N-acetilglicosamina ou substratos específicos de β -glicosidases.

Podemos concluir que apesar da alta similaridade deste domínio semelhante a encontrada na subfamília Nag3 (N-acetilglicosaminidases GH3), a enzima *MaBgl3* é monomérica e não é caracterizada como uma N-acetilglicosaminidase e sim como uma β -glicosidase com provável atividade bifuncional com glicosídeos e N-acetilglicosaminas. Na figura 12 temos uma dimensão da superfície no espaço da *MaBgl3* e seus domínios são apresentados em duas posições distintas:

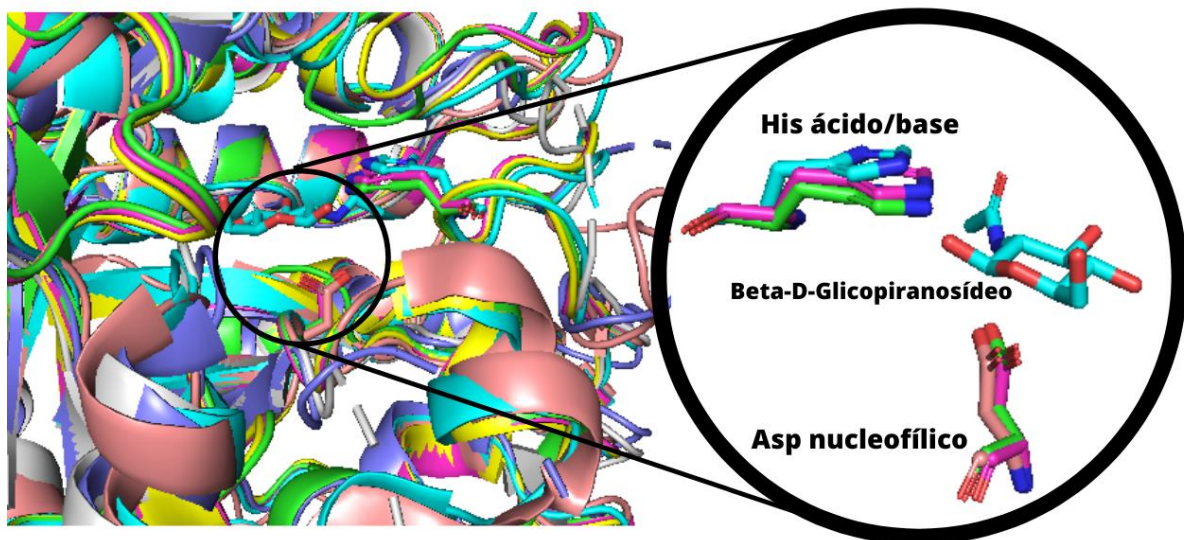
Figura 12 - Estrutura geral monomérica da *MaBgl3*. A estrutura é representada em forma de *cartoon* (com folhas beta coloridas na cor magenta e alpha-hélices coloridas na cor ciano) e superfície (colorida em rosa claro).



Fonte: Elaborada pelo autor.

A fim de avaliar a similaridade das proteínas fora realizado o alinhamento entre a *MaBgl3* e as proteínas homólogas a ela, foi realizado um alinhamento múltiplo de estruturas onde foi possível visualizar a posição dos resíduos catalíticos e as regiões conservadas destas enzimas (Figura 13). Embora seja perceptível a diferença estrutural de cada enzima avaliada, evidenciou semelhanças estruturais e padrões de enovelamento para enzimas da família GH3. Ainda, é possível visualizar que o desvio entre o molde e a proteína alvo é de apenas 0,128 Å.

Figura 13 - Alinhamento Múltiplo das Estruturas para *MaBgl3* e díade catalítica maximizada.



Fonte: Elaborado pelo autor.

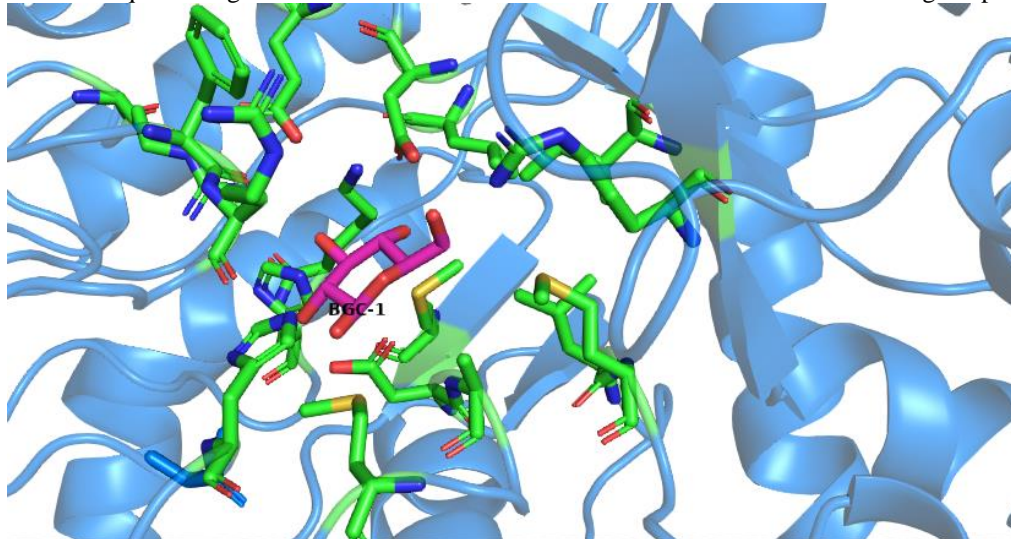
Finalmente, a comparação da estrutura da enzima *MaBgl3* com as enzimas revelam a similaridade estrutural dos domínios N-terminal, podemos inferir que o enovelamento proteico pode não estar diretamente relacionado com os mecanismos de catálise de substratos específicos e não específicos e que a chave para compreender como esta enzima pode agir

como bifuncional seja a partir de alguns resíduos chaves que compõe o sítio catalítico desta enzima (LI, 2001; DAN, 2000).

5.6.2. Sítio Ativo da *MaBgl3*

Como é observado em grande de estudos das β -glicosidases nas famílias GH1 e GH3, enzimas bacterianas e fúngicas mostram que há a contribuição de dois domínios para a arquitetura do sítio ativo. As enzimas da subfamília NagZ representam um desvio significativo ao paradigma de sítio ativo de dois domínios (McDONALD, 2015.; LITZINGER, 2010). O canal de ligação das enzimas GH3 ao substrato é composto por diversos resíduos que formam tanto subsítio de ligação glicosil -1 (glicona) e +1 (aglicona) que são extremamente conservados (Figura 15). Os resíduos que formam a porção glicona são Arg¹⁹, Ile⁵⁴, Asp⁸⁴, Glu⁸⁶, Leu¹⁴⁰, Arg¹⁵⁸, Lys¹⁸⁸, His¹⁸⁹, Asp¹⁹⁹, His²⁰¹, Met²³⁴, Asp²⁷³, Leu³⁰² e Phe⁴⁴⁶, enquanto a porção aglicona é responsável pela ligação da extremidade redutora do substrato é formado pelos resíduos Ala²⁷⁴, Met²⁷⁷ e Arg⁴⁴⁷.

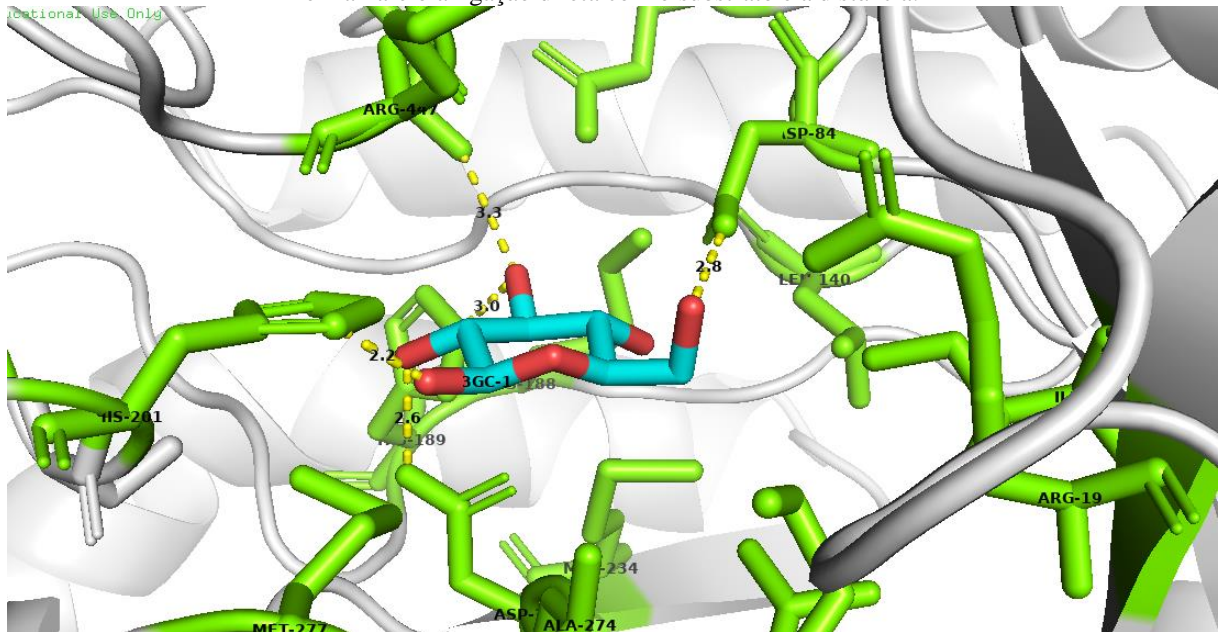
Figura 14 - (A) Resíduos que compõem o sítio catalítico enzimático. Em azul a estrutura do domínio C-terminal, em verdes resíduos que interagem com o substrato dentro de 5 Å e em rosa o substrato beta-D-glucopiranosídeo.



Fonte: Elaborado pelo autor no PyMol.

Como previsto a região do resíduo de ácido aspártico é altamente conservado em β -glicosidases da família GH3, porém é possível constatar que há interação incomum da díade catalítica histidina/aspartato na alça flexível com o substrato exercendo o papel do catalisador ácido/base, desta forma estes resíduos são responsáveis pela catálise enzimática residindo apenas no domínio N-terminal. Os resíduos Asp⁸⁴, Arg¹⁵⁸, His¹⁸⁹, His²⁰¹ e Asp²⁷³ são resíduos que possuem interações direta com o ligante glicosídico com distância de 2,2 a 3,3 Å (Figura 15).

Figura 15- Interações moleculares entre MaBgl3 e glicosídeo. Em verde os resíduos que interagem diretamente, em amarelo a ligação direta com o substrato e a distância.



Fonte: Elaborada pelo autor no PyMol.

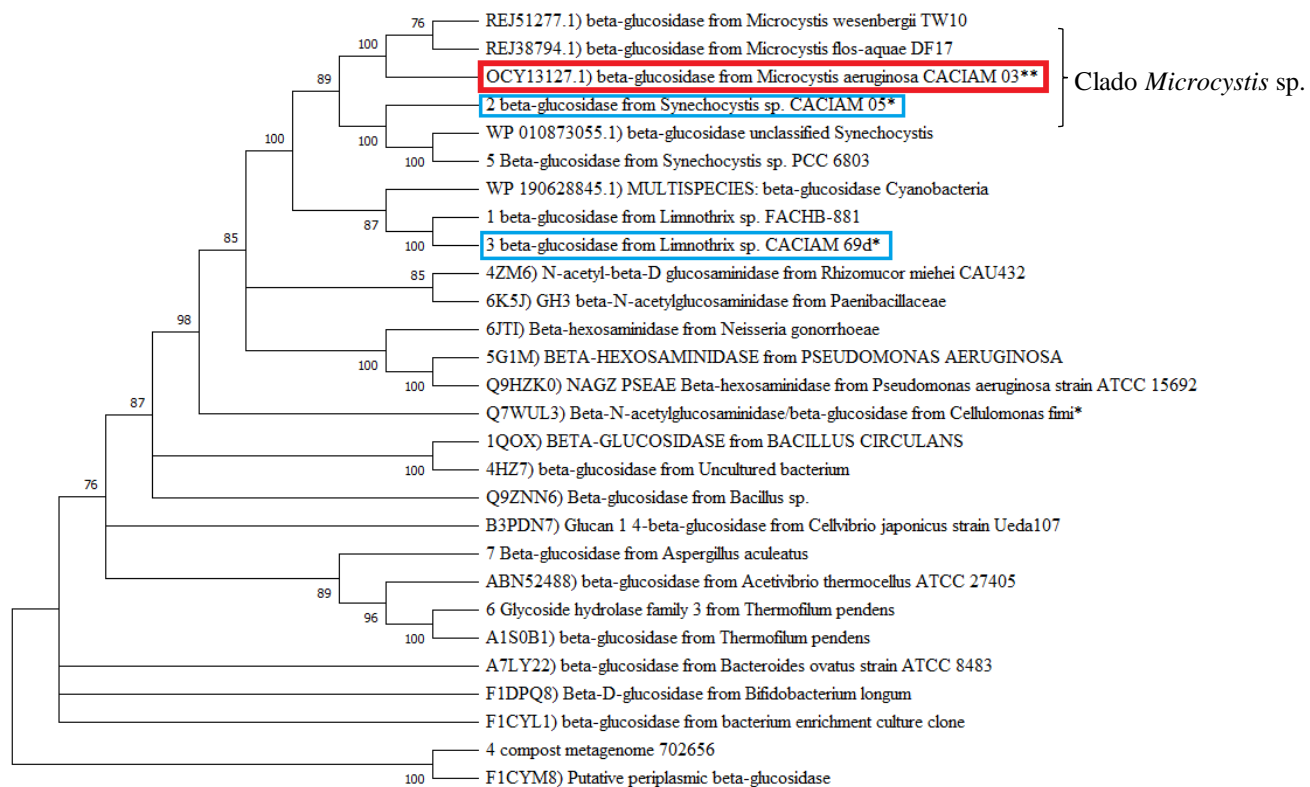
Nesta região, a Arginina 158 interage com a hidroxila OH3 (3,3 Å de distância) do BGC. Esta mesma hidroxila interage também com a Histidina 189 (3,0 Å de distância). As histidinas são aminoácidos mais comuns em sítios ativos, principalmente pela facilidade de ocorrência de protonação e desprotonação em seu anel imidazol em pH fisiológico. A nossa análise revelou que os aminoácidos catalíticos na MaBgl3, o Aspartato 273, interage com a hidroxila OH2 do C2 da BGC (β -D-Glicose) agindo como nucleófilo da reação (2,6 Å de distância) e a Histidina 201 age como ácido/base geral e interage diretamente com a hidroxila livre do carbono 1 (2,2 Å). Finalmente, o oxigênio do Aspartato 89 interage com a hidroxila OH6 do substrato (2,8 Å), onde possivelmente age na correção da posição do substrato ao sítio ativo para que ocorra a catálise enzimática de forma eficiente e correta (POZZO *et al.*, 2010).

As interações mostradas na figura 15 evidenciam como há participação total do subsítio glicona ao substrato que estão ligadas diretamente ao substrato. Há também interações fracas que submetem ao subsítio aglicona que envolvem o sítio ativo da enzima, onde, também, observamos que os resíduos Phe⁴⁴⁶ e Arg⁴⁴⁷ (que forma a parte aglicona) presentes na alça do domínio C-terminal projetado para o sítio ativo pode estar influenciando e regulando a entrada de substrato, assim como a ligação. No entanto, como não há estruturas de β -glicosidasas, reportadas até o momento, com tais interação ao substrato, não é possível confirmar estas interações e as suas funções.

5.7. Análise Filogenética das Enzimas GH3

A análise filogenética foi realizada de acordo com 37 sequências de enzimas caracterizadas como β -glicosidases, N-acetil- β -glucosaminidase e β -hexosaminidase da família GH3, incluindo três β -glicosidases encontradas em cianobactérias do banco CACIAM. O alinhamento múltiplo revelou que há diversidade de resíduos conservados dentro da família. Com base na árvore da figura 16 pelo método de junção de vizinhos (*Neighbor-joining*), pode-se ver que o cluster de β -glicosidases de bactérias anaeróbicas *Bifidobacterium* sp. são as mais enraizadas dentro da família GH3, separado dos demais. As enzimas do primeiro grupo são as de cianobactérias formando um clado de *Microcystis* sp. que estão intimamente ligadas, esse subgrupo consiste na conservação do aminoácido nucleofílico do domínio C-terminal de β -glicosidases.

Figura 16 - Análise Filogenética baseada nas sequências do banco CACIAM e GH3 obtidas no CAZy. Valores de *bootstrap* superiores a 700/1000 e uma fatia de distância genética como distância de pares em Clustal Ômega. Em vermelho a β -glicosidase deste trabalho e em azul, outras β -glicosidases do banco CACIAM.



Fonte: Elaborado pelo autor.

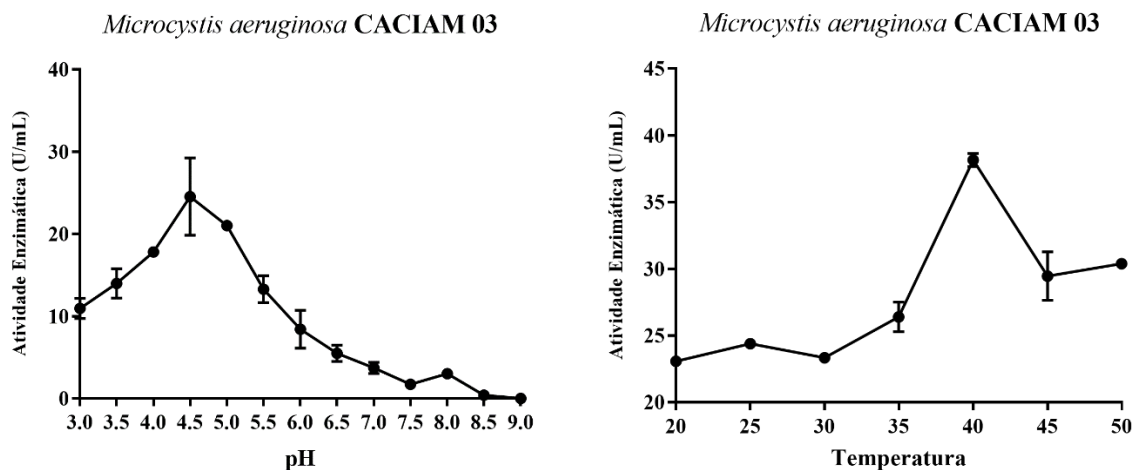
As enzimas de cianobactérias se agrupam em grupos com duas linhagens evolutivas onde a primeira linhagem consiste em duas N-acetilglicosaminidases e a com três β -

hexosaminidases. Todos os agrupados com as β -glicosidases de cianobactérias têm em comum a presença de um domínio N-terminal com resíduos similares conservados. Esse achado junto com a caracterização estrutural pode revelar que mais β -glicosidases estão ligadas evolutivamente a N-acetilglicosaminidases e este domínio N-terminal e a presença do motivo desta enzima podem representar um sítio de ligação grupos N-acetil.

5.8. Efeito da Variação De pH e Temperatura na Atividade Enzimática

A β -glicosidase produzida pela *Microcystis aeruginosa* mostrou atividade ótima em pH 4,5 e 40 °C (Figura 17). Essas características da enzima são similares na literatura para β -glicosidases de fungos, onde teve ótima atividade a pH ácidos semelhantes a *Aspergillus awamori* (pH 4,5) (NISHIDA et al., 2018), *Gongronella butleri* (pH 4,5) (PEREIRA et al., 2016) e maior tolerância do que *Trichoderma atroviridae* TUB F-1505 (pH 6.2), *Candida peltata* NRRL Y-6888 (pH 5,0) (KOVACS, 2008; SAHA, 1996). A temperatura ótima foi de 40 °C com 37,19 U/mL, a atividade foi reduzida em aproximadamente 20% nas temperaturas de 45 e 50 °C. Uma vez que avaliarmos temperaturas mais elevadas, poderemos sugerir a hipótese desta enzima ainda se mostrar estável frente a temperaturas altas.

Figura 17 - Propriedades enzimáticas da *MaBgl3*. (A) perfil de pH da *MaBgl3* (pH 3,0 a 9,0). (B) perfil de temperatura em °C para *MaBgl3*.



Fonte: Elaborado pelo autor no GraphPad Prism 7.

As glicosidases e celulases que atuam em temperaturas acima de 40 °C são valorizadas por possibilitar a fermentação e sacarificação, as reações acontecerem em temperaturas altas em curto espaço de tempo, diminuindo a possibilidade de contaminação por microrganismos. Além disso, o uso de altas temperaturas em processos permite o uso de reagentes e substratos em temperaturas mais baixas e viabilizar a fermentação em biorreatores de cultivo em estado sólido. (RIGOLDI, 2018; ZAMOST, 1991).

6. CONCLUSÃO

A sequência codificante de uma *Microcystis aeruginosa* CACIAM 03 codificou uma β -glicosidase com massa molecular teórica de aproximadamente 57,24 kDa, com características ácidas e termoestabilidade em altas temperaturas, localizada no citoplasma com pouca possibilidade de interações aquosas e solúvel no meio intracelular da cianobactéria. Ademais, com uma arquitetura de domínios de N-acetilglicosaminidases e β -glicosidases e com provável atividade bifuncional de ambas as enzimas pertencente à família 3 das glicosil hidrolases.

A predição da funcionalidade desta enzima em cianobactérias revelou que estas desempenham papéis no metabolismo de glicosídeos, ciclagem do carboidrato, participação da síntese da camada de peptidoglicano, dentre outros. A *MaBgl3* apresentou um enovelamento típico do tipo TIM barril (β/α)₈ distorcido, comum a outras β -glicosidases e outro domínio sanduíche α/β que não participa da catálise enzimática. Os resíduos de ácido aspártico e histidina, Asp¹⁹⁹ e His²⁰¹, formam uma díade catalítica e atuam como catalisador ácido/base geral e um resíduo ácido aspártico Asp²⁷³, posicionado de maneira oposta, atua como catalisador nucleofílico.

Estes resultados permitiram compreender algumas de suas principais características como uma β -glicosidase de cianobactérias, evidenciando a importância do uso de ferramentas de bioinformática, ou estudos *in silico*, preliminares para a busca de informações como previsão da estrutura tridimensional e interações ligantes, uma vez que estes estudos são mais rápidos e de menor custo que métodos experimentais.

Além disso, em complementação ao trabalho, será necessário a avaliação da capacidade de hidrólise de diversos substratos específicos e não-específicos, dos tipos de mecanismo catalítico da β -glicosidase, tolerância a glicose e aditivos e a metodologia de purificação da enzima. No entanto, mesmo sem estas avaliações pode-se afirmar que há grande perspectiva da *MaBgl3* possa ter potenciais aplicações biotecnológicas, como no processo bioconversão da biomassa lignocelulósica, processo de fabricação de papel, conversão da biomassa para produção de adubo para cultivo de vegetais comestíveis, dentre outras aplicações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J.M.; LIMA, V.; GILONI-LIMA, P.C.; KNOB, A. Passion fruit peel as novel substrate for enhanced β -glucosidases production by *Penicillium verruculosum*: potential of the crude extract for biomass hydrolysis. **Biomass Bioenergy**. v.72, p. 216-226, 2015.
- ANAND, N.N.; STEPHEN, E.R.; NARANG, S. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 153, p. 862-868, 1988.
- BAI, H.; WANG, H.; SUN, J.; IRFAN, M.; HAN, M.; HUANG, Y. Production, purification and characterization of novel beta glucosidase from newly isolated *Penicillium simplicissimum* H-11 in submerged fermentation. **EXCLI J.** v. 12, p. 528-540, 2013.
- BANKOVA, E.; BAKALOVA, N.; PETROVA, S.; KOLEV, D. Enzymatic synthesis of oligosaccharides and alkylglycosides in waterorganic media via transglycosylation of lactose. **Biotechnol Biotechnol Equip**, v. 20, p. 114–119, 2006.
- BAUSE, E.; LEGLER, G. Isolation and structure of a tryptic glycopeptide from the active site of beta-glucosidase A3 from *Aspergillus wentii*. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 626, n°. 2, p. 459-465, 1980.
- BERRIN, J.; MCLAUCHLAN, W.; NEEDS, P.; WILLIAMSON, G. *et al.* Functional expression of human liver cytosolic β -glucosidase in *Pichia pastoris*. **Eur. J. Biochem.** v. 269, p. 249-258, 2002.
- BERRY, J.; LIND, O. First evidence of “paralytic shellfish toxins” and cylindrospermopsin in a Mexican freshwater system, Lago Catemaco, and apparent bioaccumulation of the toxins in “tegotolo” snails (*Pomacea patuta catemacensis*). **Toxicon**, v, 55, p. 930-938, 2010.
- BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial β -Glucosidases: Cloning, Properties, and Applications. **Critical Reviews in Biotechnology**. v. 22, n°. 4, p. 375-407, 2002.
- BLAKE, C.C.F.; MAIR, G.A.; NORTH, A.T.C.; PHILLIPS, D.C.; SARMA, V.R. **Proc. Roy. Soc. London, Ser. B.**, v. 167, p. 365-37, 1967
- BRADY, R.; BARTON, N. Enzyme replacement therapy for Gaucher Disease: critical investigations beyond demonstration of clinical efficacy. **Biochem. Med. Metab. Biol.** v. 52, n°. 1, p. 1-9, 1994.
- BUTTERS, T. Gaucher Disease. **Curr. Op. Chem. Biol.** v. 11, p. 412-418, 2007.
- CANTAREL, B.L.; COUTINHO, P.M.; RANCUREL, C., BERNARD, T., LOMBARD, V.; HENRISSAT, B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. **Nucleic. Acids. Res.** v. 37, p. 233–238, 2009.
- CASTENHOLZ, N. W. Endemism and biodiversity of thermophilic cyanobacteria. **Nova Hedwigia Beih**, v. 112, p. 33-47, 1996.
- CHEN, M.; QIN, Y.; CAO, Q.; LIU, G.; LI, J.; LI, Z.; ZHAO, J.; QU, Y. Promotion of extracellular lignocellulolytic enzymes production by restraining the intracellular β -

glucosidase in *Penicillium decumbens*. **Bioresour Technol**, v. 137, p. 33–40, 2013.

CHENG, Q.; LI, H.; MERDEK, K.; PARK, J. T. Molecular characterization of the beta-N-acetylglucosaminidase of *Escherichia coli* and its role in cell wall recycling. **J Bacteriol**. v. 182, n°, 17, p. 4836-4840, 2000.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. 3. ed. Geneva: **WHO - World Health Organization**, 1998.

CHRISTOFFERSEN, K.; KAAS, H. Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring, and management. *In*: CHORUS, I. BARTRAM, J. (org.). **Limnology and Oceanography**, E & FN Spon. Xv, v. 45, n°. 5, p.1212-1212, 2000.

COLOVOS, C., & YEATES, T. O. Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions. **Protein Science**, v. 2, n°. 9, p. 1511–1519, 1997.

COPA-PATIÑO, J.L., RODRIGUEZ, J., PÉREZ-LEBLIC, M.I. Purification and properties of a β -glucosidase from *Penicillium oxalicum* autolysates. **FEMS Microbiol. Lett**. v. 67, p. 191-196, 1990.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucl. Acids Res.**, v. 22, n°. 16, p. 10881-10890, 1988.

CUESTA, U. I. A Review of natural and engineered enzymes involved in bioethanol production. **Graduate Student Theses, Dissertations, & Professional Papers**. v. 4562, 2016.

DAN, S.; MARTON, I.; DEKEL, M.; BRAVDO, B.-A.; HE, S.; WITHER, S.; SHOSEYOV, O. Cloning, expression, characterization, and nucleophile identification of family 3, *Aspergillus niger* β -glucosidase. **J. Biol. Chem**. v. 275, p. 4973–4980, 2000.

DEMAY, J.; BERNARD, C.; REINHARDT, A.; MARIE, B. Natural Products from Cyanobacteria: Focus on Beneficial Activities. **Mar. Drugs**, v. 17, n°. 6, p. 320, 2019.

DIGNUM, M.; MATTHIJS, H. C. P.; PEL, R.; LAANBROEK, H.; MUR, L. Nutrient limitation to freshwater cyanobacteria-tools to monitor phosphorus limitation at individual level. *In*: HUISMAN, J.; MATTHIJS, H. C. P.; VISSER, P. (org.). **Harmful Cyanobacteria**. Dordrecht, The Netherlands, Springer, p. 65-86, 2005.

DINUR, T.; OSIECKI, K. M.; LEGLER, G.; GATT, S. *et al.* Human acid beta-glucosidase: isolation and amino acid sequence of a peptide containing the catalytic site. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**. v. 83, n°. 6, p. 1660-1664, 1986

DREWS, G.; WECKESSER, J. Function, structure and composition of cell walls and external layers. *In*: CARR, N. G.; WHITTON, B. (org.) **The Biology of Cyanobacteria**. Blackwell Scientific Publications, Boston, p. 333-337, 1982.

DRULA, E.; GARRON, M.; DOGAN, S.; LOMBARD, V. *et al.* The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. **Nucleic Acids Res**, v. 50, p. 571–577, 2022.

DUCATTI, D. R.; CARROLL, M. A.; JAKEMAN, D. L. On the phosphorylase activity of

GH3 enzymes: A β -N-acetylglucosaminidase from *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 and a glucosidase from *Saccharopolyspora erythraea*. **Carbohydr Res.** v. 435, p.106-112, 2016.

EISENBERG, D., LÜTHY, R., & BOWIE, J. U. VERIFY3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Macromol. Crystal. Part B**, v. 20, P. 396–404, 1997.

ESEN, Asim. Beta-glucosidase: Biochemistry and molecular biology. ed. 533. **Editora American Chemical Society**, 1993, 250 p.

FAURE, D. The Family-3 Glycoside Hydrolases: from Housekeeping Functions to Host Microbe Interactions. **Appl. Env. Microbiol.** v. 68, n°. 4, p. 1485-1490, 2002.

FERREIRA, J. S; FERREIRA, V. L.; FERREIRA, D. C.; Estudo da doença de Gaucher em Santa Catarina. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n° 1, p. 5-11, 2008.

GAMAGE, D.G.; GUNARATNE, A.; PERIYANNAN, G.R.; RUSSELL, T.G. Applicability of instability index for in vitro protein stability prediction. **Protein Peptide Lett.**, v. 26, p. 339–347, 2019.

GAO, L.; GAO, F.; JIAN, X.; ZHANG, C. *et al.* Biochemical characterization of a new β -glucosidase (Cel3E) from *Penicillium piceum* and its application in boosting lignocelluloses bioconversion and forming disaccharide inducers: new insights into the role of β -glucosidase. **Proc. Biochem.** v. 49, p. 768-774, 2014.

GAO, Y.; WU, R.; KAN, Q.; GAO, L.; LIU, M. *et al.* Production of a high-efficiency cellulase complex via β -glucosidase engineering in *Penicillium oxalicum*. **Biotechnol. Biofuels**, v. 9, n° 78, 2016.

GARNIER, J.; GIBRAT, J.F.; ROBSON, B. GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. **Method. Enzymol.**, v. 266, p. 540–553, 1996.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M.R.; APPEL, R.D.; BAIROCH A.; Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *In*: JOHN M. WALKER (org.): **The Proteomics Protocols Handbook**, Humana Press. p. 571-607, 2005.

GIDEON, D. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure.** v. 3, n°. 9, p. 853-859.

GILBERT HJ, STALBRAND H, BRUMER H. How the walls come tumbling down: recent structural biochemistry of plant polysaccharide degradation. **Curr. Opin. Plant. Biol.** v. 11, p. 338–348, 2008.

GILBERT HJ, STALBRAND H, BRUMER H. How the walls come tumbling down: recent structural biochemistry of plant polysaccharide degradation. **Curr Opin Plant Biol.** v. 11, p. 338–348, 2001.

GOUET, P., ROBERT, X. AND COURCELLE, E. ESPript/ENDscript: Extracting and Rendering Sequence and 3D Information from Atomic Structures of Proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 31, p. 3320-3323, 2003.

- GROVER, A. K.; MACMURCHIE, D. D.; CUSHLEY, R. J. Characteristics of β -Glucosidase from almond. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 482, p. 98–108, 1977.
- GROVER, K.; CUSHLEY, J. Studies on almond emulsin beta-D- glucosidase II. kinetic evidence for independent glucosidase and galactosidase sites. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 482, p. 109–124, 1977.
- GUINDON, S.; FRÉDÉRIC S.; JEAN-FRANÇOIS, G. Estimating Maximum Likelihood Phylogenies with PhyML. **Methods mol. Biol.** (Clifton, N.J.). v. 537, p. 113-137, 2009.
- HATI, S.; VIJ, S.; SINGH, B. P.; MANDAL, S. β -Glucosidase activity and bioconversion of isoflavones during fermentation of soymilk. **J. Sci. Food Agric**, v. 95, p. 216–220, 2015.
- HENK J. LUBBERDING, GUIDO ZIMMER, HENDRIKA S. VAN WALRAVEN, JAAP SCHRICKX, AND RUUD KRAAYENHOF. Isolation, purification and characterization of the ATPase complex from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* 6716. **Eur. J. Biochem.** v. 137, p. 95-99, 1983.
- HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. **Biochem. J.** v. 316, p. 695-696, 1996.
- HENRISSAT, B.; DAVIES, G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. **Curr. Opin. Struct. Biol.** v. 7, p. 637–644, 1996.
- HOFFMANN, L.; KOMÁREK, J.; KAŠTOVSKY, J. System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) - state 2004. **Algological Studies**, v. 117, p. 95-115, 2005.
- HOICZYK, E.; HANSEI, A. Cyanobacteria cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope. **J. Bacteriology**, v. 182, p. 1191-1199, 2000.
- HONG, J.; TAMAKI, H.; KUMAGAI. Cloning and functional expression of thermostable beta-glucosidase gene from *Thermoascus aurantiacus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 73, n°. 6, p. 1331-1339, 2007.
- HRMOVA, M.; VARGHESE, J. N.; DE GORI, R.; SMITH, B. J.; DRIGUEZ, H.; FINCHER GB. Catalytic mechanisms and reaction intermediates along the hydrolytic pathway of a plant beta-D-glucan glucohydrolase. **Structure.** v. 11, n°. 9, p. 1005-1016, 2001
- IMOTO, T.; JOHNSON, L.N.; NORTH, A.T.C.; PHILLIPS, D.C.; RUPLEY, J.A. In: BOYER, P.D. **The Enzymes**. Ed. 3, v. 7, p. 666-686, 1972.
- KANEKO, T.; SATO, S.; KOTANI, H.; TANAKA, A.; ASAMIZU, E. *et al.* Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. **DNA Res**, v. 3, p. 109-136, 1996.
- KAPLAN R. The Nature of the View from Home: Psychological Benefits. **Env. Behavior.** v. 33, n°. 4, p. 507-542, 2001.
- KARAGEORGOU, D.; SAINIS, IOANNIS.; TOUKA, A.; VARELI, K.; STAMATIS, H.; KATAPODIS, P. Production of biomass and β -glucosidase by a novel cyanobacterium

Pseudanabaena/Limnothrix sp. under heterotrophic conditions. **SSRN**, 2020.

KATO-NOGUCHI, H.; TANAKA, Y. Effect of ABA- β -D-glucopyranosyl ester and activity of ABA- β -D-glucosidase in *Arabidopsis thaliana*. **J. Plant. Physio.** v. 165, p.788-790, 2008.

KENGEN, S. W.; LUESINK, E. J.; STAMS, A. J.; ZEHNDER, A. J. Purification and characterization of an extremely thermostable betaglucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. **Eur. J. Biochem.** v. 213, p. 305–312, 1993.

KENNETH, R. A primeval Tide of Toxins. Los Angeles Times. Los Angeles, 30 de julho de 2006. Disponível em: <<https://www.latimes.com/news/local/oceans/la-me-ocean30jul30,0,6670018,full.story>>. Acesso em: 05 de abril de 2022.

KETTLER, G.; MARTINY, A.; HUANG, K.; ZUCKER, J. *et al.* Patterns and implications of gene gain and loss in the evolution of *Prochlorococcus*. **PLoS Genet**, v. 3, p. 2515-2528, 2007.

KIM, E. K. Scopoletin induces apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by activations of nuclear factor kappa B and caspase-3. **Lite Sciences**, v. 77, n°. 7, p. 824-836, 2005.

KIN, N.; LING, T. Understanding the Specificity and Random Collision of Enzyme-Substrate Interaction. **Teaching Science**, v. 62, n°. 2, p. 33-84, 2016.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokariota, 2. Teil: Oscillatoriales. *In*: BÜDEL, B. *et al.* (org.). Subwasserflora von Mitteleuropa, Band 19/2. Spektrum Akademischu Verlag, p. 759, 2005.

KOMÁREK, J.; KAŠTOVSKY, J.; MAREŠ, J.; JOHANSEN, J. R. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. **Presilia**, v. 86, p. 295-335, 2014.

KOSHLAND, D. STEREOCHEMISTRY AND THE MECHANISM OF ENZYMATIC REACTIONS. *Biol. Rev.* v. 28, n°. 4, p. 416-436, 1953.

KOVACS, K.; MEGYERI, L.; SZAKACS, G.; KUBICEK, C.P.; GALBE, M.; ZACHHI, G. *Trichoderma atroviride* mutants with enhanced production of cellulase and β -glucosidase on pretreated willow. **Enzym. Microb. Technol.**, v. 43, p. 48–55, 2008.

KRISCH, J.; TAKO, M.; PAPP, T.; VAGVOLGYI, C. Characteristics and potential use of β -glucosidases from Zygomycetes. *In*: MENDEZ-VILAS, A. (org) **Current Research, Technology and Education**, Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, p. 891-896.

KULASOORIYA, S. A. Cyanobacteria: Pioneers of Planet Earth. *Ceylon J. Sci*, v. 40, n°. 2, p. 71-88, 2012.

KUNTOTHOM, T.; LUANG, S.; HARVEY, A.; FINCHER, G. *et al.* Rice family GH1 glycoside hydrolases with β -D-glucosidase and β -D-mannosidase activities. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 491, p. 85-89, 2009.

LASKOWSKI, R. A., MACARTHUR, M. W., MOSS, D. S., & THORNTON, J. M.

PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **J. Appl. Crystal.**, v. 26, n^o. 2, p. 283–291, 1993.

LEE, W.H.; NAN, H.; KIM, H.J.; JIN, Y.S. Simultaneous saccharification and fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae* without supplementing extracellular β -glucosidase. **J. Biotechnol.** v. 167, p. 316–322, 2013.

LEGLER, G. Active site directed inhibitors and mechanism of action of glycosidases. **Mol. Cell.** v. 2, n^o. 1, p. 31-38, 1973.

LEGLER, G. Studies on the mechanism of action of glycoside-splitting enzymes, II. Isolation and enzymatic properties of 2 beta-glucosidases from *Aspergillus wentii*. Hoppe Seylers Z **Physiol Chem.** v. 348, n^o. 11, p. 1359-1366, 1967.

LEITE, R.; ALVES-PRADO, H.; CABRAL, H.; PAGNOCA, F. *et al.* Production and characteristics comparison of crude β -glucosidase produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium*. **Enzyme and Microbial Technology.** v. 43, p. 391-395, 2008.

LEVIS, S.; STRICKMAN-STEIN, N.; DOERGE, D.R.; KRISCHER, J. Design and baseline characteristics of the soy phytoestrogens as replacement estrogen (SPARE) study- a clinical trial of the effects of soy isoflavones in menopausal women. **Contemp. Clin. Trials**, v. 31, p. 293–302, 2010

LI, Y-K.; CHIR, J.; CHEN, F-Y.; Catalytic of a family 3 β -glucosidase and mutagenesis study on residue Asp-247. **Biochem. J.**, v. 355, p. 835-840, 2001.

LIGGINS, J.; BLUCK, L.; RUNSWICK, S.; ATKINSON, C.; COWARD, W.; BINGHAM, S. Daidzein and genistein contents of vegetables. **Br J Nutr**, v. 84, p. 717–725, 2000.

LIN, J.; PILLAY, B.; SINGH, S. Purification and biochemical characteristics of beta-D-glucosidase from a thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*-SSBP. **Biotechnol. Appl. Biochem.** v. 30, n^o. 1, 1999.

LINDING, R. *et al.* Protein disorder prediction: implications for structural proteomics. **Structure**, v. 11, n^o. 11, p. 1453-1459, 2003.

LITZINGER S, DUCKWORTH A, NITZSCHE K, RISINGER C, WITTMANN V, MAYER C. (2010). Muropeptide rescue in *Bacillus subtilis* involves sequential hydrolysis by beta-N-acetylglucosaminidase and N-acetylmuramyl-L-alanine amidase. **J Bacteriol**, v. 192, n^o. 12, p. 3132-3143, 2010.

LIU, L. Z.; WEBER, S.; COTTA, M.; LI, SZ. A new b-glucosidase producing yeast for lower-cost cellulosic ethanol production from xylose-extracted corncob residues by simultaneous saccharification and fermentation. **Biores. Tec.** v. 104, p. 410-416, 2012.

MA, L.; ZHANG, J.; ZOU, G.; WANG, C.; ZHOU, Z. Improvement of cellulase activity in *Trichoderma reesei* by heterologous expression of a beta-glucosidase gene from *Penicillium decumbens*. **Enzyme Microbial Technol.** v. 49, p. 366–371, 2011.

MACDONALD, S. S.; BLAUKOPF, M.; WITHERS, S. G. N-acetylglucosaminidases from CAZy family GH3 are really glycoside phosphorylases, thereby explaining their use of

histidine as an acid/base catalyst in place of glutamic acid. **J Biol Chem.** v. 290, n°. 8, p. 4887-4895, 2015.

MACHLER-BAUER, A.; BRYANT, S. CD-Search: protein domain annotations on the fly. **Nucleic Acid Res.** v. 32, n°. 2, p. 327-331, 2004.

MALCOLM, B.A.; ROSENBERG, S.; COREY, M.J.; ALLEN, J.S.; DE BAETSELIER, A.; KIRSCH, J. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 86, p. 133-141, 1989.

MARCHLER-BAUER A, LU S, ANDERSON JB, CHITSAZ F, DERBYSHIRE MK, DEWEESE-SCOTT C, FONG JH, GEER LY, GEER RC, *et al.* CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. **Nucleic Acids Res.** v. 39, p. 225-229, 2011.

MARCHLER-BAUER, A.; ANDERSON, J.; FARIDER, C.; DERBYSHIRE, M. *et al.* CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. **Nucleic Acid. Res.** v. 37, p. 205-210, 2009.

MARTIN, W.; KOWALLIK, K. V. Annotated English translation of Mereschkowski's 1905 paper. **Eur. Jour Phycol.**, v. 34, n°. 3, p. 287 – 295, 1999.

MATHEW, G.; SUKUMARAN, R.; SINGHANIA, R.; PANDEY, A. Progress in research on fungal cellulases for lignocellulose degradation. **J. Sci. Indus. Research.** v. 67, p. 898-907, 2008.

MATSUTA, Y; ITO, M; TOHSATO, Y. ECOH: An Enzyme Commission number predictor using mutual information and a support vector machine. **Bioinformatics**, v. 29, n°. 3, p. 365-372, 2013.

MAYER, C.; VOCADLO, D.; MAH, M.; RUPITZ, K. *et al.* Characterization of a b-N-acetylhexosaminidase and a β -N-acetylglucosaminidase/ β -glucosidase from *Cellulomonas fimi*. **J. FEBS**, v. 273, n°. 13, p. 2929-2941, 2006.

MELO, E. B.; CARVALHO, I. α e β -glucosidases como alvos moleculares para desenvolvimento de fármacos. **Química Nova.** v. 29, n. 4. p. 840–843. 2006.

MOLINA, G.; LIMA, E.; PASTORE, G. Chapter 7 - Beta-Glucosidase From *Penicillium*. In: GUPTA, V.; RODRIGUEZ-COUTO, S. (org.). **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Penicillium System Properties and Applications.** Spain: Elsevier, 2017. p. 137-151.

MORANELLI, F.; BARBIER, J.R.; DOVE, M.J.; MACKAY, R.M.; SELIGY, V.L. **Biochem. Int.** v. 12, p. 905-991, 1986.

MORANT, A.; KRAGH, M.; KJAEGAARD, C.; JØRGENSEN, K. *et al.*, The β -glucosidases responsible for bio-inactivation of cyanogenic glucosides and rhodiocyanosides in *Lotus japonicus*. **Plant. Physiol.** v. 147, n°. 3, 2008.

MUDUAGWU, E. Differential effects on the cyanogenic glycoside content of fermenting cassava root pulp by beta-glucosidase and microbial activities. **Toxicol. Lett.**, v. 15, n°. 4, p. 335-339, 1983.

- NIENABER, M. A.; STEINITZ-KANNAN, M. A guide to CYANOBACTERIA: Identification and Impact. **The University Press of Kentucky**, Kentucky, 2018.
- NISHIDA, V.S.; DE OLIVEIRA, R.F.; BRUGNARI, T.; CORREA, R.C.G.; PERALTA, R.A.; CASTOLDI, R.; PERALTA, R.M. Immobilization of *Aspergillus awamori* β -glucosidase on commercial gelatin: An inexpensive and efficient process. **Int. J. Biol. Macromol.** v. 111, p. 1206–1213, 2018.
- NUTMAN, A. P.; BENNETT, V. C.; FRIEND, C. R. L.; Rapid emergence of life show by discovery of 3,700-million-year-old microbial structures. **Nature.** v. 537, p. 535-538, 2016.
- OLSEN, J. M. Photosynthesis in the Archean Era. **Photosynthesis Research**, v. 88, p. 109–117, 2006.
- PARK T. H.; CHOI, K. W.; PARK, C. S.; LEE, S. B.; KANG HY, SHON KJ, PARK, J. S.; CHA, J. Substrate specificity and transglycosylation catalyzed by a thermostable β -glucosidase from marine hyperthermophile *Thermotoga neapolitana*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 694, p. 411–422, 2005.
- PASTORES, G.; HUGHES, D. Gaucher Disease. *In*: ADAM, M.; ARDINGER, H.; *et al.* (org). Seattle: University of Washington, 2018.
- PLANAUSKY, N. J. *et al.* Evidence for oxygenic photosynthesis half a billion years before the Great Oxidation Event. **Nat. Geosci.** v. 7, p. 283-286, 2014.
- POZZO, T.; PASTEN, J.; KARLSSON, E.; LOGAN, D. Structural and functional analyses of beta-glucosidase 3B from *Thermotoga neapolitana*: a thermostable tree-domain representative of glycoside hydrolase 3. **J. Mol. Biol.** v. 397, n°. 2, p. 724-739, 2010.
- QIN, Z.; XIAO, Y.; YANG, X.; MESTERS, J. R.; YANG, S.; JIANG, Z. A unique GCN5-related glucosamine N-acetyltransferase region exist in the fungal multi-domain glycoside hydrolase family 3 β -N-acetylglucosaminidase. **Sci. Rep.**, v.5, p. 18292-18304, 2015.
- RABALAIS, N. N. *et al.* Dynamics and distribution of natural human-cause hypoxia. **Biogeosciences.** v. 7, p. 585-619, 2010.
- RAPP, P. 1, 3- β -glucanase, 1, 6- β -glucanase and β -glucosidase activities of *Sclerotium gluconicum*, synthesis and properties. **J. Gen. Microbiol.** v. 135, p. 2847–2858, 1989.
- RAVANAL, M.C.; ROSA, L.; EYZAGUIRRE, J. α -L-Arabinofuranosidase 3 from *Penicillium purpurogenum* (ABF3): potential application in the enhancement of wine flavour and heterologous expressin of the enzyme. **Food Chem.** v. 134, p. 888-893, 2012.
- RAVEN, J.; ALLEN, J.F. Genomics and chloroplast evolution: what did cyanobacteria do for plants?. **Genome Biol.**, v. 209, 2003.
- RIGOLDI, F.; DONINI, S.; REDAELLI, A.; PARASINI, E. Review: Engineering of thermostable enzymes for industrial applications. **APL Bioeng.**, v. 2, n°. 1, p. 011501-011517, 2018.
- RIMBACH, G.; BOESCH, C. S.; FRANK, J.; FUCHS, D.; WENZEL, U. *et al.* Dietary isoflavones in the prevention of cardiovascular disease—a molecular perspective. **Food**

Chem Toxicol, v. 46, p. 1308–1319, 2008.

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

ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays Biochem.** v. 59, p. 1-41, 2015.

SAINI, J.; SAINI R.; TEWARI, L. Lignocellulosic agriculture waste as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. **3 Biotech.** v. 5, n^o. 4, p. 1-18.

SALOHEIMO, M.; KUJA-PANULA, J.; YLOSMAKI, E.; WARD, M.; PENTTILA, M. Enzymatic Properties and Intracellular Localization of the Novel *Trichoderma reesei* β -Glucosidase BGLII (Cell1A). **Appl. Env. Microbiol.**, v. 68, n^o. 9, p. 4546-4553, 2002.

SANTOS, R. F.; OLIVEIRA, C. F.; VARÉA, G. S.; ORRADI DA SILVA, M. L. C.; IDA, E. I.; MANDARINO, J. M. G.; RIBEIRO, M. L. L. Purification and characterization of soy cotyledon β -glucosidase. **Journal of Food Biochemistry**, v. 37, n^o. 3, p. 302–312, 2012.

SILVA, V.; COTO, A.; SOUZA, R.; NEVES, M. B. *et al.* Effect of pH, Temperature, and Chemicals on the Endoglucanases and β -Glucosidases from the Thermophilic Fungus *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4. Obtained by Solid-State and Submerged Cultivation. **Biochem. Research Inter.** v. 2016, p. 1-9, 2016.

SINGH, G.; VERMA, A. K.; KUMAR, V. Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of β -glucosidases. **3 Biotech**, v. 6, n^o 3, 2016.

SINGHANIA, R. Chapter 5 - Industrial Enzymes: β -Glucosidases. *In*: PANDEY, A.; NEGI, S.; SOCCOL, C. (org.). **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products**. United States: Elsevier, 2017. p. 103-125.

SINNOTT, M. L. Catalytic mechanisms of glycosyl transfer. **Chem. Rev.** v. 90, p. 1173-1183, 1990.

SIPPL, M. J. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, v. 17, n^o. 4, p. 355–362, 1993.

SØRENSEN, A.; LU^U BECK, M.; LU^U BECK, P.S.; AHRING, B. K. Fungal β -glucosidases: a bottleneck in industrial use of lignocellulosic materials. **Biomolecules**, v. 3, p. 612-631, 2013.

STANIER, R. Y. & COHEN-BAZIRE, G. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. **Annual review of microbiology**, v. 31, p. 225-274, 1978.

TAKAGI, Y.; KRIEHLBER, E.; IMOKAWA, G.; ELIAS, P.; HOLLERAN, W. β -Glucocerebrosidase activity in mammalian stratum corneum. **J. Lipid. Research.** v. 40, p. 861-869, 1999.

THOMPSON, D.; PLEWNIAK, F; POCH, Ol. A comprehensive comparison of multiple

sequence alignment programs. **Nucl. Acids Res.**, v. 27, n°. 13, p. 2682–2690, 1999.

TIPTON, K. "Translocases (EC 7): A new EC Class". ExplorEnz - The Enzyme Database. 2018.

TIWARI, R.; SINGH, S.; SHUKLA, P.; NAIN, L. Novel cold temperature active β -glucosidase from *Pseudomonas lutea* BG8 suitable for simultaneous saccharification and fermentation. **RSC Adv.** v. 4, p. 58108-58115, 2014.

TOMME, P.; KWAN, E.; GILKES, N. R.; KILBURN, D.; WARREN, R. Characterization of CenC, an enzyme from *Cellulomonas fimi* with both endo- and exoglucanase activities. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 4216-4223, 1996.

TUCCI, C. M. Água no meio urbano. *In*: REBOUÇAS, Aldo da Cunha; BRAGA, Benedito; TUNDISI, José Galizia (Org.). **Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação**. 2ª Ed. São Paulo: Escrituras, 2002.

TUNDISI, J.G.; MATSUMURA-TUNDISI, T.; CALIJURI, M.C. Limnology and management of reservoirs in Brazil. *In*: Straškraba, M.; Tundisi, J.G.; Duncan, A. (org.). **Developments in Hydrobiology: Comparative Reservoir Limnology and Water Quality Management**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1993, p.25-55.

TURNER B.; HOPKINS D.; HAYGARTH P.; OSTLE N. β -Glucosidase activity in pasture soils. **Appl. Soil Ecol.** v. 20, p. 157–162, 2002.

UGWUANYI, J.O.; HARVEY, L.M.; MCNEIL, B. Linamarase activities in *Bacillus* spp. Responsible for thermophilic aerobic digestion of agricultural wastes for animal nutrition. **Waste Manag.**, v. 27, p. 1501-1508, 2007.

VARGHESE, J. N., HRMOVA, M., AND FINCHER, G. B. Three-dimensional structure of a barley β -D-glucan exohydrolase, a family 3 glycosyl hydrolase. **Structure.** v. 7, p. 179–190, 1999.

VASCONCELOS, A.; TWIDDY, D.; WESTBY, P; REILLY, P. Detoxification of cassava during gari preparation. **Food Sci. Tech.**, v. 25, n°. 2, p. 198-203, 1990.

WAKARCHUK, W.W.; GREENBERG, N.M.; KILBURN, D.G.; MILLER, JR., R.C.; WARREN, R.A.J. **J. Bacteriol.** v. 170, p. 301-330, 1988.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. **Curr. Prot. Bioinfo**, 2016.

WITHERS, S. G.; YIP, V. L.; THOMPSON J. Mechanism of GlvA from *Bacillus subtilis*: a detailed kinetic analysis of a 6-phospho-alpha-glucosidase from glycoside hydrolase family 4. **Biochemistry.**; v. 46, n° 34, p. 9840-9852, 2008.

WOLFSON, W. Grow your own: Protalix BioTherapeutics produces drugs in carrot cells. **Chem Biol.** v. 20, n°. 8, p. 969-970, 2013.

XIANGYUAN, H.; SHUZHENG, Z.; SHOUJUN, Y. Cloning and expression of thermostable beta-glucosidase gene from *Thermus nonproteolyticus* HG102 and characterization of

recombinant enzyme. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 94, p. 243-255, 2001.

YAPI, D. Y.; GNAKRI, D.; LAMINE, S.; KOUAME, L. Purification and Biochemical Characterization of a Specific β -Glucosidase from the Digestive Fluid of Larvae of the Palm Weevil, *Rhynchophorus palmarum*. **J. Insect Sci.** v. 9, n^o. 4, p. 1-13, 2009.

YU, N.; WAGNER, J.; LAIRD.; MELLI, G. *et al.* PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. **Bioinformatics.**, v. 13, n^o. 26, p. 1608-1615, 2010.

ZAGROBELNY, M., BAK, S., RASMUSSEN, A.V., JØRGENSEN, B., NAUMANN, C.M., MØLLER, B.L. Cyanogenic glucosides and plant–insect interactions. **Phytochemistry.** v. 65, p. 293–306, 2004.

ZAGROBELNY, M.; BAK, S.; MOLLER, B. Cyanogenesis in plants and arthropods. **Phytochemistry.** v. 69, p. 1457-1468, 2008.

ZAMOST, B.; HENRIK, K.; STARNES, R. Thermostable enzymes for industrial applications. **J. Ind. Microbiol.**, v. 8, p. 71-82, 1991.

ZENG, Y. C., AND ZHANG, S. Z. Purification and properties of a β -glucosidase from *Aspergillus phoenicis*. **Wei Sheng Wu Xue Bao.** v. 29, p. 195–199, 1989.

ZHANG, R.; ZHOU, J.; SONG, Z.; HUANG, Z. Enzymatic properties of β -*N*-acetylglucosaminidases. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 102, p. 93-103, 2017.

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

M357a Marques Serra, Gustavo.
Análise in silico e caracterização bioquímica parcial de uma α -
glicosidase da cianobactéria amazônia *Microcystis aeruginosa*
CACIAM 03 / Gustavo Marques Serra. — 2022.
68 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Agenor Valadares Santos
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade
Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Faculdade de
Biotecnologia, Belém, 2022.

1. α -glicosidases. 2. Enzimas. 3. Cianobactéria. 4.
Biotecnologia. 5. modelagem molecular. I. Título.

CDD 660.6
