UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

EVANDRO JOSÉ MULINARI

Expressão heteróloga em *Aspergillus nidulans* e caracterização
bioquímica e estrutural de uma endoglucanase de *Aspergillus terreus*

São Carlos
2015

EVANDRO JOSÉ MULINARI

Expressão heteróloga em *Aspergillus nidulans* e caracterização
bioquímica e estrutural de uma endoglucanase de *Aspergillus terreus*

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Física do Instituto de
Física de São Carlos da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. João Renato
Carvalho Muniz

Versão Original

São Carlos
2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Mulinari, Evandro José

Expressão heteróloga em *Aspergillus nidulans* e
caracterização bioquímica e estrutural de uma
endoglucanase de *Aspergillus terreus* / Evandro José
Mulinari; orientador João Renato Carvalho Muniz --
São Carlos, 2015.

133 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física
de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2015.

1. Endoglucanase. 2. Fungo. 3. Biocombustível. 4.
GH12. I. Muniz, João Renato Carvalho, orient. II.
Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Evandro José Mulinari

Dissertação apresentada ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Física Aplicada - Opção: Física Biomolecular

Aprovado(a) em: 23/02/2015

Comissão Julgadora

Dr(a). João Renato Carvalho Muniz

Instituição: IFSC/USP

Dr(a). Richard John Ward

Instituição: FFCLRP/USP

Dr(a). Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli

Instituição: FFCLRP/USP

À minha família.
Aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida e por me assegurar existencialmente. Agradeço a minha mãe Marisete e ao meu pai Valdecir por todo o amor e esforço dedicado. Ao meu irmão pelo apoio quando quis sair de casa para estudar. Aos meus avós que são os últimos alicerces a sucumbirem. Aos meus amigos de ontem e aos de hoje por se fazerem presentes e solícitos. Enfim, a todos que se mantiveram firmes ao meu lado diante às intempestividades da vida.

Aos professores por todo o conteúdo lecionado e pelo comprometimento em ensinar.

Ao Prof. Dr. João Renato Carvalho Muniz e ao Prof. Dr. Fernando Segato pela orientação, conhecimento e acolhimento.

Ao Prof. Dr. Igor Polikarpov.

Aos professores, técnicos e alunos do Grupo de Biotecnologia Molecular.

Ao IFSC-USP por toda a estrutura fornecida.

Ao CNPq pela concessão da bolsa

*“É de sonho e de pó, o destino de um só
Feito eu perdido em pensamentos
Sobre o meu cavalo
É de laço e de nó, de gibeira o jiló
Dessa vida cumprida a sol*

*Sou caipira, Pirapora Nossa
Senhora de Aparecida
Ilumina a mina escura e funda
O trem da minha vida
...”*

Renato Teixeira

“Quando nada acontece, há um milagre que não estamos vendo”
Guimarães Rosa

RESUMO

MULINARI, E. J. **Expressão heteróloga em *Aspergillus nidulans* e caracterização bioquímica e estrutural de uma endoglucanase de *Aspergillus terreus***. 2015. 133p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

A degradação enzimática rápida, eficiente e robusta de polissacarídeos derivados de biomassa lignocelulósica é atualmente um grande desafio na produção de biocombustíveis e considerada uma alternativa viável e promissora para se enfrentar a crise energética mundial e diminuir a dependência das fontes fósseis de energia. O bagaço de cana-de-açúcar no Brasil é a principal matéria lignocelulósica sustentável de grande potencial para a produção do etanol de 2ª geração. O principal requisito para a consolidação dessa abordagem é a disponibilidade de enzimas que hidrolisam a celulose, hemicelulose e outros polissacarídeos em açúcares fermentescíveis e em condições adequadas para a utilização industrial. O presente estudo visou à caracterização molecular, estrutural e funcional da endoglucanase GH12 do fungo *Aspergillus terreus* (AtGH12) por diferentes técnicas. O gene que codifica para essa enzima foi clonado e expressado no fungo filamentosso *A. nidulans* linhagem A773. A cepa com maior secreção foi selecionada e a sequência da enzima confirmada por espectrometria de massas *MALDI TOF MS*. Posteriormente, através de estudos funcionais de parametrização enzimática como pH e temperatura ótimos, estabilidade térmica, efeitos supressores e potencializadores de aditivos, a enzima AtGH12 foi caracterizada bioquímica e fisicamente. A espectrometria de massas do substrato hidrolisado pela catálise enzimática foi tomada como uma forma de investigar o padrão de clivagem da hidrólise e estudo do reconhecimento enzima/substrato para a AtGH12. As caracterizações estruturais das enzimas recombinantes obtidas utilizando as técnicas de espalhamento dinâmico de luz, dicroísmo circular, espalhamento de raios X a baixo ângulo e gel nativo serviram para determinação do enovelamento e estado oligomérico em solução da AtGH12. Com o intuito de fornecer subsídios para o desenvolvimento de coquetéis enzimáticos mais eficazes para hidrólise da biomassa lignocelulósica, a atividade da AtGH12 foi avaliada frente ao bagaço de cana-de-açúcar pré-tratados pelos processos hidrotérmicos e organossolve. Posteriormente, o seu grau de sinergismo nesse tipo de substrato foi determinado com o coquetel enzimático comercial *Accellerase*®.

Palavras-chave: Endoglucanase. Fungo. Biocombustível. GH12.

ABSTRACT

MULINARI, E. J. **Heterologous expression in *Aspergillus nidulans* and biochemical and structural characterization of an endoglucanase from *Aspergillus terreus***. 2015. 133p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

Fast, more efficient and robust enzymatic degradation of lignocellulosic biomass-derived polysaccharides is currently a major challenge in the production of biofuels and considered a feasible and promising alternative to confront the global energy crisis and reduce the dependence on fossil energy resources. The sugarcane bagasse in Brazil is the most abundant and sustainable lignocellulosic material for the production of 2nd generation ethanol. The main requirement for the consolidation of this approach is the availability of enzymes that hydrolyze cellulose, hemicellulose and other polysaccharides into fermentable sugars suitable for industrial use. The present study was aimed at molecular, structural and functional characterization of an endoglucanase from the fungus *Aspergillus terreus* (AtGH12) using different techniques. The gene encoding this enzyme has been cloned and expressed in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* strain A773. The strain with increased secretion was selected and the enzyme sequence was confirmed by mass spectroscopy MALDI TOF MS. Later, functional studies such as analysis of optimal pH and temperature, thermal stability, suppression and enhance effects of additives were applied to the AtGH12 characterization. The mass spectrometry of hydrolyzed substrate from the enzyme catalysis was acquired as a way to investigate the cleavage pattern of hydrolysis and the study of the enzyme/substrate interaction. Structural characterization of the recombinant enzymes was obtained using techniques such as dynamic light scattering, circular dichroism as well as small angle X-ray scattering and native gel, aided to determine the folding and oligomeric state of AtGH12 in solution. In order to provide support for the development of more effective enzyme cocktails for hydrolysis of lignocellulosic biomass, the activity of AtGH12 was evaluated using sugarcane bagasse pretreated by hydrothermal and organosolv processes. Subsequently, the degree of synergism in this type of substrate was measured using a commercial enzyme cocktail *Acellerase*®.

Keywords: Endoglucanase. Fungus. Biofuel. GH12.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Preço do petróleo por barril ao longo dos anos e os eventos históricos mais importantes. Em verde claro: preços calculados em dólares norte-americanos de 2012, com base nos dados da BP até o ano de 2012. Em verde escuro: preços calculados em dólares norte-americanos do dia. De 1945 a 1983, o preço de petróleo utilizado foi o Arabian Light em Ras Tanura. De 1984 adiante, foi utilizado o Brent Dated.....	28
Figura 2 - Consumo mundial de energia primária por ano em milhões de toneladas equivalentes de petróleo.	29
Figura 3 - Produção de biocombustíveis no mundo equivalente à milhões de toneladas de petróleo.	30
Figura 4 - Etapas da produção de etanol a partir de cana-de-açúcar.....	32
Figura 5 - Produção de etanol pelo Brasil em mil barris por dia.....	33
Figura 6 - Representação esquemática da produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica.	35
Figura 7 - Organização da parede celular vegetal. Celulose, hemicelulose e lignina formam estruturas chamadas microfibrilas, que são organizadas em macrofibrilas.	36
Figura 8 - Interações moleculares da celulose. As linhas pontilhadas esquematizam as ligações de hidrogênio possíveis.	37
Figura 9 - Componentes da fração hemicelulose.....	38
Figura 10 - Estrutura química geral da macromolécula de lignina, com seus monômeros.....	39
Figura 11 - Mecanismo de ação dos diferentes pré-tratamentos sobre o material lignocelulósico.....	43
Figura 12 - Esquema de hidrólise completa da celulose. EGs agem em regiões amorfas da celulose, atuando nas ligações internas dela e liberando celo-oligossacarídeos com extremidades redutoras e não-redutoras. As CBHs agem nesses celo-oligômeros produzindo celobiose que servirá de substrato para as BGs que disponibiliza a glicose como produto. As BGs também agem em extremidades não redutoras dos celo-oligômeros solúveis.....	46
Figura 13 - Enzimas envolvidas na hidrólise da hemicelulose.....	47
Figura 14 - Mecanismo reacional geral de retenção e inversão das glicosidases	49

Figura 15 - Representação da superfície molecular da estrutura cristalográfica de BIXG12 revela um bolsão de ligação ao substrato mais amplo em comparação com estrutura HgGH12, sugerindo aumento da afinidade por substratos ramificados. Cor laranja: superfície de van der Waals para BIXG12 (PDB: 2JEN). Cor cinza: superfície de van der Waals para HgGH12 (PDB: 1UU6).	52
Figura 16 - SDS-PAGE da secreção de três proteínas recombinantes integrados em uma única cepa de <i>Aspergillus nidulans</i> carregando xilanase (Xync), esterase de ácido ferúlico (Faea) e arabinase (AbnA). <i>A. nidulans</i> A773 (tipo selvagem) representa a transformação com o vetor vazio; 3T1 e 3T2 são duas linhagens triplamente transformadas e MW é o marcador de peso molecular em quilo Daltons (kD).....	57
Figura 17 - Vetor pEXPYR, utilizado para expressão de proteínas em fungo filamentoso.	58
Figura 18: Curva de fluorescência em unidades arbitrárias (u.a.) da desnaturação térmica de diferentes proteínas (cores) na presença da molécula de prova <i>SYPRO Orange</i>	65
Figura 19 - Autocorrelação das flutuações da intensidade em função do tempo de luz dispersa.	70
Figura 20 - (A) Luz linearmente polarizada produzida pela superposição de componentes circularmente polarizadas para a direita e para a esquerda de iguais amplitudes. (B) Luz elipticamente polarizada produzida quando luz linearmente polarizada (A) tem uma de suas componentes absorvidas. E_D e E_E vetor campo elétrico da luz circularmente polarizada a direita e a esquerda, respectivamente; α rotação óptica.....	71
Figura 21 - Espectro de CD característicos das mais comuns estruturas secundárias de proteínas.	72
Figura 22 - Resultado da análise da sequência de aminoácidos da AtGH12 submetida ao servidor Signal P 4.1.....	81
Figura 23 - Resultado da análise da AtGH12 submetida à NetNGlyc. A barra azul no gráfico indica o valor excedente (0,5386) ao limiar de 0,5 utilizado como parâmetro para indicar possível glicosilação N-ligada.....	82
Figura 24 - Gel de agarose 1% mostrando produto de PCR de colônia da endoglucanase GH 12 de <i>A. terreus</i> (AtGH12) amplificado a partir do DNA genômico.Primeira coluna: marcador de pares de base (1Kb)	83

Figura 25 - Padrão gráfico utilizado pelo Caliper LabChip para representar a análise de proteínas contidas nas amostras do meio bruto de <i>A. nidulans</i> transformado com AtGH12.	84
Figura 26 - Gel SDS-PAGE confirmação da expressão de At_GH12. MW: Marcador molecular; 1: <i>A. nidulans</i> transformado com vetor vazio; 2: <i>A. nidulans</i> transformado com vetor contendo AtGH12.	85
Figura 27 - Gel SDS-PAGE mostrando a expressão por <i>A. nidulans</i> da AtGH12 em meio tamponado com HEPES ao longo do tempo de cultivo de 48h, 72h e 96h. MW: Marcador molecular	86
Figura 28 - A) Gel SDS-PAGE confirmando a purificação da AtGH12 por cromatografia de gel-exclusão. B) Padrão gráfico utilizado pelo Caliper LabChip para representar a análise de proteínas contidas nas frações da cromatografia de-exclusão molecular. MW representa as bandas do padrão de massa de proteína utilizado pela técnica; Retângulo azul destaca a banda referente à AtGH12.	87
Figura 29 - Espectro dos fragmentos obtidos da AtGH12 digerida com tripsina e análise dos peptídeos identificados e confirmados contra a sequência de aminoácido traduzida da sequência depositada no GenBank.	88
Figura 30 - Gráfico obtido pela análise de ThermoFluor que mostra o T_m da AtGH12 frente a diferentes condições tamponantes. As barras em cor verde indicam as condições que proporcionaram maiores valores de T_m para a AtGH12.	90
Figura 31 - Digitalização do gel nativo. MM: massa molecular dos padrões de proteína. Em destaque, a banda referente à AtGH12.	91
Figura 32 - Curvas de calibração dos padrões de proteína do gel nativo.	92
Figura 33 - Curvas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo para AtGH12. Espalhamento experimental (círculos pretos), resultado do ajuste do programa Dammin ¹⁰⁹ (linha verde) e curva simulada para o modelo de alta resolução do homólogo da AtGH12 (linha magenta). Na figura, encontra-se em anexo a região inicial da curva experimental a região de Guinier $[\ln(I(q)) \times q^2]$, de onde pode ser extraído o R_g (raio de giro) experimental da AtGH12 pela aproximação de Guinier (equação 1). $R_g = (20 \pm 1) \text{Å}$	94
Figura 34 - Curva de distribuição de distâncias, para os dados experimentais de AtGH12 (linha preta) e simulada para o modelo de alta resolução (PDB: 1KS4) (linha vermelha).	95
Figura 35 - (A) Modelo <i>ab initio</i> para o envelope molecular da AtGH12 e (B) o envelope alinhado com a estrutura de alta resolução (PDB: 1KS4) de sua homóloga no programa SUPCOMB. ¹⁰⁹	96

Figura 36 - Comparação entre o raio de giro (R_g) e raio hidrodinâmico ou de Stokes (R_h) para uma cadeia polimérica enovelada (esquerda) e para uma estendida (direita).	98
Figura 37 - Espectro de CD de desnaturação térmica da AtGH12 em tampão citrato de sódio pH 5,5.	99
Figura 38 - Espectro de CD de desnaturação térmica da AtGH12 em tampão fosfato de sódio pH 6,5.	99
Figura 39 - Perfil de desnaturação térmica da AtGH12 monitorado em 215 nm em dois tampões diferentes.	100
Figura 40 - Efeito do pH na atividade enzimática da AtGH12.	103
Figura 41 - Efeito da temperatura na atividade enzimática da AtGH12.	104
Figura 42 - Atividade catalítica da AtGH12 nos tampões do ThermoFluor.	105
Figura 43 - Efeito da estabilidade térmica frente a reação catalisada pela AtGH12.	106
Figura 44 - Espectro de massas do produto de hidrólise da AtGH12 com diferentes oligossacarídeos. No eixo das abcissas é representada a razão massa carga (m/z) e nas ordenadas a intensidade em a.u. (do inglês <i>arbitrary unit</i>).	109
Figura 45 - Detalhe do espectro de massas da celotriose presente no hidrolisado de diferentes oligossacarídeos. No eixo das abcissas é representada a razão massa/carga (m/z) e nas ordenadas a intensidade em a.u.	110
Figura 46 - Detalhe do espectro de massas da celobiose presente no hidrolisado de diferentes oligossacarídeos. No eixo das abcissas é representada a razão massa/carga (m/z) e nas ordenadas a intensidade em a.u.	110
Figura 47 - Diagrama de representação em fitas da estrutura cristalográfica da Cel12A de H. grisea em complexo com um celohexamero (cor dourada), que se estende do sítio -4 até +2. Sítios de ligação ao substrato: -4, -3 e -2; o sítio ativo: -1 e sítios do produto: +1 e +2.	111
Figura 48 - Espectro de massas do hidrolisado da AtGH12 com celohexaose nos tempos de 10 e 30 minutos. Em destaque, os picos referentes à celotetraose e celotriose. No eixo das abcissas é representada a razão massa carga (m/z) e nas ordenadas a intensidade em a.u.	112

Figura 49 - Valores em μMol de glicose equivalente da hidrólise em bagaço de cana-de-açúcar pré tratado utilizando os métodos hidrotérmico e organossolve.	113
Figura 50 - Gráfico de barras indica a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar em equivalentes de glicose nos diferentes pré-tratamentos no tempo de 20 horas. Em azul, a hidrólise da AtGH12; em laranja, o coquetel Acellerase®; em cinza, a soma das hidrólises separadas; em amarelo, a hidrólise sinérgica AtGH12 junto com Acellerase®.....	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do bagaço e da palha de cana-de-açúcar.....	40
Tabela 2 - Potencial de transformação do bagaço em bioetanol mediante tecnologias empregadas.....	41
Tabela 3- Valores de atividade específica para enzimasGH12 de diferentes organismos.	51
Tabela 4- Oligonucleídeos iniciadores utilizados para clonagem de AtGH12.....	58
Tabela 5 - Tampões explorados pela técnica de Termofluor	66
Tabela 6 - Parâmetros dos padrões de proteínas do gel nativo.	92
Tabela 7 - Valores calculados para a AtGH12 a partir da calibração de eletroforese de gel nativo.....	93
Tabela 8 - Parâmetros estruturais da enzima AtGH12 obtidos por SAXS	96
Tabela 9 - Distribuição dos resultados de espalhamento de luz dinâmico (DLS).	97
Tabela 10 - Painel de substratos da AtGH12.....	101
Tabela 11 - Efeito potencializador ou supressor da atividade enzimática.....	107
Tabela 12 - Valores do grau de sinergismo.	116

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
1.1	Panorama energético global	27
1.2	Biocombustíveis	29
1.3	Matéria-prima lignocelulósica	35
1.4	Sacarificação da biomassa lignocelulósica: pré-tratamento e hidrólise	40
1.5	Hidrólise enzimática	43
1.5.1	<i>Degradação enzimática da celulose: celulasas</i>	45
1.6	Hidrolases de Glicosídeos: classificação e estudos estruturais.	48
1.6.1	<i>Hidrolases de glicosídeos da família 12 (GH12)</i>	50
1.7	Expressão de enzimas lignocelulíticas em fungos filamentosos.	52
2	OBJETIVOS	55
2.1	Objetivos específicos	55
3	MATERIAIS E MÉTODOS	57
3.1	Clonagem	57
3.1.1	<i>Oligonucleotídeos iniciadores e plasmídeo</i>	57
3.1.2	<i>Obtenção do gene</i>	59
3.1.3	<i>Tratamento do gene</i>	59
3.1.4	<i>Tratamento do vetor</i>	59
3.1.5	<i>Reação de ligação</i>	60
3.1.6	<i>Transformação em células competentes</i>	60
3.1.7	<i>Identificação e confirmação das colônias positivas</i>	60
3.1.8	<i>Extração do DNA plasmidial</i>	61
3.2	Expressão heteróloga	61
3.2.1	<i>Meio mínimo de crescimento e expressão</i>	61
3.2.2	<i>Obtenção de protoplastos</i>	61
3.2.3	<i>Transformação</i>	62
3.2.4	<i>Confirmação do nível de expressão de GH12</i>	62
3.3	Purificação	63
3.4	Espectrometria de massas	64
3.5	<i>ThermoFluor</i>	64

3.6	Estado oligomérico	67
3.6.1	<i>Gel nativo</i>	67
3.6.2	<i>Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)</i>	67
3.6.3	<i>Espalhamento de luz dinâmica (DLS)</i>	69
3.7	Espectroscopia de dicroísmo circular (CD) de desnaturação térmica	71
3.8	Painel de substratos	73
3.9	Temperatura e pH ótimos	74
3.10	Atividade catalítica em diferentes tampões	75
3.11	Estabilidade térmica catalítica	75
3.12	Painel de aditivos	76
3.13	Espectrometria de massas do produto de hidrólise	76
3.14	Hidrólise em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado e sinergismo	77
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
4.1	Clonagem heteróloga da AtGH12	81
4.2	Expressão heteróloga	84
4.3	Purificação	86
4.4	Espectrometria de massa	87
4.5	<i>ThermoFluor</i>	89
4.6	Estado oligomérico	90
4.6.1	<i>Gel nativo</i>	90
4.6.2	<i>Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)</i>	93
4.6.3	<i>Espalhamento de luz dinâmica (DLS)</i>	97
4.7	Espectro de Dicroísmo Circular (CD) de desnaturação térmica	98
4.8	Painel de substratos	100
4.9	Temperatura e pH ótimos	102
4.10	Atividade catalítica em diferentes tampões	104
4.11	Estabilidade térmica catalítica	105
4.12	Painel de aditivos	106
4.13	Espectroscopia de massas do produto de hidrólise da AtGH12	109

4.14	Hidrólise em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratados e sinergismo	113
5	CONCLUSÕES	117
6	PERSPECTIVAS	119
	REFERÊNCIAS	121

1 INTRODUÇÃO

1.1 Panorama energético global

A necessidade mundial por energia é maior do que nunca, o esgotamento a médio prazo das reservas de petróleo, principal matriz energética, as questões ambientais, aquecimento global e sustentabilidade estão obrigando os governos e a sociedade a buscarem por fontes alternativas e limpas de energia com o mínimo de impacto ao meio ambiente.

Relatório sobre Panorama Energético Internacional de 2013 (IEO do inglês, *International Energy Outlook*)¹ aponta um crescimento do consumo mundial de energia de 56% entre 2010 e 2040. A exigência humana em 2010 de energia foi de aproximadamente $524 \cdot 10^{15}$ Btu (Btu do inglês, *British thermal unit* que equivale à 1055,05585 J) e será de $630 \cdot 10^{15}$ Btu em 2020 e subirá para $820 \cdot 10^{15}$ Btu em 2040¹. A energia recebida pela Terra do Sol é de $2,5 \cdot 10^{21}$ Btu/ano, cerca de 5000 vezes superior que a demanda em 2010. A energia do Sol que é armazenada em forma de carbono pela fotossíntese é aproximadamente 4 vezes o uso de energia em 2010 pelo mundo.

O impulso em busca de fontes de energias excludente ao petróleo se deu a partir de 1970 quando o preço do barril de petróleo aumentou subitamente (figura 1). A Crise do Petróleo provocou prolongada recessão no Estados Unidos da América (EUA) e Europa, desestruturou a economia mundial e trouxe a percepção de que fontes fósseis de energias, como carvão mineral e petróleo, eram finitas. Dessa forma, é possível se observar a escassez e o aumento do preço desta fonte não renovável de energia.

Dados estatísticos referentes a junho de 2013 (figura 2) apontam o petróleo como sendo o combustível líder contribuinte para a matriz energética global, respondendo por 33,1% do consumo mundial de energia. Mas este valor é a porcentagem mais baixa no registro, além de ter perdido quota de mercado por 13 anos consecutivos. A produção hidrelétrica e outras energias renováveis na geração de energia tem atingido ações recorde de consumo de energia primária global (6,7% e 1,9%, respectivamente).²

Figura 1 - Preço do petróleo por barril ao longo dos anos e os eventos históricos mais importantes. Em verde claro: preços calculados em dólares norte-americanos de 2012, com base nos dados da BP até o ano de 2012. Em verde escuro: preços calculados em dólares norte-americanos do dia. De 1945 a 1983, o preço de petróleo utilizado foi o Arabian Light em Ras Tanura. De 1984 adiante, foi utilizado o Brent Dated.

Fonte: Adaptado de BP...²

A crescente convicção em toda a sociedade de que alternativas aos combustíveis fósseis devem ser buscadas com urgência é alicerçada no progressivo reconhecimento em todo o mundo das consequências ambientais devidas ao aquecimento global e a correlação desta com o consumo de combustíveis fósseis. Além disso, um número crescente de especialistas afirmam que o aumento da gravidade de catástrofes climáticas, como ondas de calor, furacões, ciclones, inundações, secas, etc., (intensidade por um fator de 6 de 1970 a 2005, e de frequência de 2,5 a 3 no mesmo período) é consequência do aquecimento global ³. Assim, a busca por fontes renováveis de energia e de alternativas ao uso do petróleo, em especial o etanol, está mobilizando internacionalmente, setores acadêmicos, industriais, sociais e governamentais, com ênfase no desenvolvimento de processos biotecnológicos de menor impacto ambiental.⁴

Figura 2 - Consumo mundial de energia primária por ano em milhões de toneladas equivalentes de petróleo.

Fonte: Adaptado de BP...²

1.2 Biocombustíveis

Os biocombustíveis são os combustíveis de transporte, como etanol, gás e diesel, que são feitos a partir da biomassa. Esses combustíveis são geralmente misturados com os combustíveis derivados do petróleo - gasolina e óleo diesel, mas eles também podem ser usados isoladamente. A produção de biocombustíveis no mundo tem aumento significativo, seja pela escassez dos combustíveis fósseis, seja pelo clamor das políticas ambientais (figura 3). O biodiesel é um combustível produzido a partir da reciclagem, ou não, de óleos vegetais, gorduras ou graxas. O etanol é um álcool feito a partir de açúcares presentes em grãos (milho, sorgo, cevada) ou partes da reserva energética das plantas, como os colmos da cana-de-açúcar, beterraba sacarina, batatas, entre outros.

A produção mundial de líquidos não-petrolíferos, que em 2010 totalizaram apenas 1,6 milhões de barris por dia (menos de 2% da produção total de combustíveis líquidos mundiais), aumentará para 4,6 milhões de barris por dia em 2040, cerca de 4% da produção total de combustíveis líquidos do mundo. Os maiores componentes da futura produção de combustíveis líquidos não-petrolíferos são os biocombustíveis no Brasil e nos Estados Unidos, com 0,7 e 0,5 milhões de

barris por dia ¹. A maior parte do etanol usado nos EUA é obtido através do milho, enquanto que no Brasil todo o etanol vem da cana-de-açúcar.

Figura 3 - Produção de biocombustíveis no mundo equivalente à milhões de toneladas de petróleo.

Fonte: Adaptado de BP...²

A busca por maneiras econômicas de produção de etanol que fossem, de preferência, obtidas de matérias-primas abundantes, biodegradáveis e renováveis começou a ser foco de pesquisas, pois o etanol é um excelente combustível para transporte e, em alguns aspectos, superior à gasolina ⁵⁻⁶.

O etanol em comparação à gasolina pura (sem mistura) possui uma combustão mais eficiente, tem uma octanagem mais alta – a octanagem (índice de

resistência à detonação por compressão em altas temperaturas) do etanol comum é de 110, enquanto a da gasolina é de 87 – elevado calor de vaporização, baixa temperatura da chama; características que fazem com que o motor tenha maior desempenho.⁷ Também, a combustão do etanol é mais limpa, produz menos poluição atmosférica urbana, particularmente mais benéfico por emitir menos CO₂. A toxicidade do etanol para os seres humanos é menor do que a da gasolina e do metanol, além de reduzir a formação de fumaça por ser menos volátil, possui reatividade fotoquímica baixa e poucos produtos de combustão.⁷

Diversos países, como México, Índia, Argentina, Colômbia, Japão, alguns países da União Europeia e alguns Estados dos EUA, utilizam a mistura de álcool anidro à gasolina, de forma opcional ou obrigatória entre 5% a 10%. O Brasil é o país que utiliza a maior porcentagem, aproximadamente 24%, de etanol anidro misturado à gasolina.

A forma mais simples de obtenção de álcool é através da fermentação de moléculas de açúcares, dito etanol de primeira geração. A matéria-prima mais amplamente utilizada é a cana-de-açúcar no Brasil e o milho no EUA, podendo ser utilizado outras fontes vegetais sacarinas (sorgo, beterraba, batata, etc.). As etapas de produção de etanol a partir da cana-de-açúcar estão representadas na figura 4.

Os rendimentos de fermentação alcançados na época do Proálcool giravam em torno de 75-80%, hoje, as destilarias brasileiras alcançam de 92-93%. Esse rendimento refere-se à produção de etanol a partir de açúcar, no entanto, as leveduras também produzem glicerol, biomassa celular, succinato e malato, ou seja, cerca de 7-8% é dirigida ao metabolismo celular. Esses dados demonstram a melhoria no processo de fermentação que vão desde seleção de novas cepas de levedura como aos processos de controle da contaminação por bactéria e leveduras selvagens.⁸

Figura 4 - Etapas da produção de etanol a partir de cana-de-açúcar.

Fonte: Adaptado de SEABRA⁹

Em termos econômicos e históricos do nosso país, o governo brasileiro implementou políticas de incentivo à produção e consumo de etanol a partir de 1970 (Crise do Petróleo) em um esforço para lidar com a dependência do país referentes às importações do petróleo e ao superávit da cana-de-açúcar.¹⁰ O Brasil é o segundo maior produtor e consumidor de etanol do mundo, depois dos EUA. A produção de etanol pelo Brasil tem declinado desde 2011 devido à competitividade com os altos preços do açúcar no mercado mundial, falta de incentivo do governo e safra de cana pobre (figura 5).

Figura 5 - Produção de etanol pelo Brasil em mil barris por dia.

Produção de etanol brasileiro, 2002-2012

Fonte: Adaptado de INTERNATION...¹⁰

Atualmente, o governo não comanda mais práticas de incentivo a expansão de canaviais para o oferecimento do etanol. Agora, a corrida é movida pela iniciativa privada, que está convicta do papel cada vez mais importante do etanol no cenário mundial aliado à tecnologia dos motores *flex fuel* ou bicom bustíveis.³ No entanto, a expansão da produção de etanol a partir de fontes sacarinas tem sido foco de preocupações: (i) destruição de ecossistemas frágeis e indução do desmatamento; (ii) aumento nos preços dos alimentos; (iii) excessivo consumo de fertilizantes e agroquímicos; (iv) pressão sobre recursos híbridos; (v) desestruturação social e econômica dos setores sociais envolvidos; (vi) desrespeito aos direitos fundamentais do ser humano e do trabalhador.¹¹⁻¹²

O declínio brasileiro da produção de etanol (figura 5) aliado a esses fatores, juntamente com aqueles de ordem climáticas que afetam diretamente as culturas de cana-de-açúcar são empecilhos no que diz respeito ao atendimento do aumento da demanda interna e externa do etanol. No entanto, o advento da cultura de cana para produção de etanol de 1ª geração produz grandes excedentes de bagaço e palha, ou seja, material de natureza lignocelulósico, que possui elevado potencial na

geração de etanol, conhecido como etanol de 2^o geração.¹³ Isso sugere significativo aumento na oferta de álcool sem exigir aumento nas áreas de plantio. Nessa nova condição, o aproveitamento da cana é integral. Outras matérias-primas lignocelulósicas incluem gramíneas nativas da pradaria, árvores de crescimento rápido, serragem, e até mesmo resíduos de papel.¹⁴⁻¹⁵

A matéria ligno-celulósica produzida pelas plantas terrestres tem o equivalente energético de cerca de um quarto da necessidade energética mundial de 2010.¹ De acordo com estudos do *DOE-USDA Billion-Ton*, palha de milho e culturas perenes, como das espécies predominantemente tropicais *Panicum virgatum* e álamo híbrido poderiam fornecer cerca de $1,3 \cdot 10^9$ de toneladas de biomassa para a utilização na geração de bioenergia.¹⁶ Por exemplo, a quantidade potencial de etanol que pode ser produzido a partir de celulose é superior a uma ordem de grandeza do que seria se o fosse produzido a partir do milho.¹⁷ Assim, existe um grande interesse na utilização de biomassa ligno-celulósica como uma fonte renovável de energia, principalmente através da hidrólise dos oligossacarídeos em açúcares fermentescíveis que podem ser convertidos em combustível líquido, o etanol (figura 6).¹⁸

A obtenção de açúcares de 5 e 6 carbonos pela hidrólise para ser utilizado na etapa de fermentação conta com uma etapa inicial de pré-tratamento da matéria ligno-celulósica. Essa etapa é importante porque ela é responsável pela exposição de uma maior superfície de contato para ação mais eficiente da hidrólise (como ilustrado na figura 6 e figura 11).

O passo limitante da velocidade na conversão de celulose para etanol é a sua hidrólise, especialmente o ataque inicial sobre a estrutura altamente ordenada, insolúvel da celulose cristalina. Dessa forma, também um grande esforço é canalizado para o desenvolvimento de métodos para a conversão de celulose em açúcares.¹⁷

Figura 6 - Representação esquemática da produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica.

Fonte: SANTOS¹⁹

1.3 Matéria-prima lignocelulósica

A matéria-prima lignocelulósica é encontrada na biomassa vegetal que é tanto encontrada nas espécies de plantas quanto em seus resíduos. Resíduos florestais, produtos agrícolas, gramíneas com alto rendimento em fibras (bambu, sisal, juta, rami), resíduos agroindustriais (bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho, palha de arroz) são exemplos de matérias-primas lignocelulósica com grande potencial de aplicação para a produção de etanol de 2ª geração.²⁰

A arquitetura da parede celular das plantas é estruturada, basicamente, por microfibrila e macrofibrila. A macrofibrila é o conjunto de microfibrilas que é composta por um cerne celulósico revestido por hemicelulose e lignina (figura 7). A biomassa lignocelulose é difícil de hidrolisar porque a matriz celulósica está relacionada com a hemicelulose, que está rodeada por lignina através de ligações

covalentes entre si. Isso constitui uma barreira física – recalcitrância da parede celular, que confere resistência ao ataque químico e enzimático.²¹

Figura 7 - Organização da parede celular vegetal. Celulose, hemicelulose e lignina formam estruturas chamadas microfibrilas, que são organizadas em macrofibrilas.

Fonte: Adaptado de RITTER²²

A celulose é o constituinte mais abundante. Ela por sua vez é um homopolissacarídeo linear e não ramificado formado por moléculas de D-glicose na conformação β unidos por ligações glicosídicas do tipo $(\beta-1,4)$.²³ Possui regiões com potencial de formação de seis ligações de hidrogênio – quatro delas intramoleculares e as outras duas intermoleculares.²⁴ Quando o grau de orientação dessas interações é baixo, a celulose está na forma paracristalina (amorfa) e quando todas as interações são majoritárias ela é dita cristalina.²⁵

Na forma cristalina, essas interações saturam a capacidade de formação de ligação de hidrogênio com a água, explicando a baixa quantidade presente na estrutura (figura 8), dessa forma, garantindo um arranjo extremamente ordenado e bem empacotado que também acaba por dificultar a ação de hidrólise.²⁶

Figura 8 - Interações moleculares da celulose. As linhas pontilhadas esquematizam as ligações de hidrogênio possíveis.

Fonte: MORAIS²⁶

A hemicelulose, segundo componente mais abundante, é um heteropolissacarídeo formado por unidades de D-glucose, D-galactose, D-xilose, L-arabinose, ácido D-glucurônico e 4-O-metil ácido glucurônico (figura 9), com diferentes composições e estrutura dependendo da sua origem vegetal e método de extração. O tipo mais comum é a xilana, que é formada por ligações (β-1,4) entre resíduos de D-xilanopirosil, com ramificações formadas por unidades arabinosil e/ou acetil, dependendo da sua origem. A hemicelulose apresenta-se como uma cadeia curta, altamente ramificada, composta de monossacarídeos (figura 9) de cinco carbonos (pentoses, como xilose), e um menor conteúdo de monômeros de seis carbonos (hexoses, como glicose).

A hemicelulose não apresenta cristalinidade devido as suas ramificações e a presença de grupos acetil conectados na cadeia principal. Comparada à celulose, ela é mais susceptível à hidrólise química mesmo em condições mais brandas.²¹ A maioria hemicelulose também é insolúvel em água, mas sua hidrólise ocorre em temperaturas mais baixas que a da celulose, soluções ácidas também aumentam sua solubilidade.²⁷

Figura 9 - Componentes da fração hemicelulose.

Fonte: MORAIS²⁶

A lignina é o terceiro maior constituinte da biomassa, é um polímero polifenólico que rodeia a celulose e hemicelulose e é formada por unidade de fenilpropano cujo precursores são alcoóis aromáticos: p-cumárico, coniferílico e sinapílico (figura 10).²⁸ Ela é considerada como sendo o principal componente que atribui a biomassa lignocelulósica sua natureza recalcitrante, limitando a catálise hidrolítica de hemicelulases e celulases.²¹

A lignina representa um dos maiores estoques de carbono/energia da natureza, sendo o maior depósito de compostos aromáticos, constituindo-se, assim, em uma fonte potencial de valiosos insumos para a indústria química. Em elevadas temperaturas, ocorre uma gelatinização da estrutura da lignina, o que acelera as reações despolimerização dela em meios ácidos e alcalinos.²⁹

Além desses três componentes majoritários, a biomassa lignocelulósica é constituída por outros elementos em menores quantidades, algo em torno de 4-10%, destacando-se, principalmente, por: terpenos, resinas, óleos, ácidos graxos, álcoois, fitoesteróis e diferentes compostos fenólicos, além de carboidratos de baixo peso molecular, alcaloides e lignina solúvel.³⁰ Ela também apresenta uma fração de

cinzas, composta por minerais inorgânicos (silicatos, carbonatos e oxalatos de cálcio).³¹

Figura 10 - Estrutura química geral da macromolécula de lignina, com seus monômeros.

Fonte: VANHOLME²⁸

Uma análise das características das fontes de matéria lignocelulósica remanescente do processamento da cana (bagaço e resíduos da colheita) é primordial para atingir uma tecnologia de hidrólise específica para o setor sucroalcooleiro.³² O bagaço de cana-de-açúcar é a fração de biomassa resultante após os procedimentos de limpeza, preparo (redução por meio de jogos de facas rotativas niveladoras e desfibramento através de jogos de martelos oscilantes) e extração do caldo de cana (por meio de ternos de moagem ou de difusores).³³

No que diz respeito a composição da cana-de-açúcar, a tabela 1 resume a composição encontrada em suas partes: bagaço e palha. O bagaço pode ser dividido em três partes: fibra, medula e casca (valores não reportados); a palha é gerada na

colheita e é composta pelas folhas secas, folhas verdes e pelo ponteiro da cana-de-açúcar.

Tabela 1 - Composição do bagaço e da palha de cana-de-açúcar.

Fração	Composição % (base seca)			
	Bagaço	Fibra	Medula	Palha
Celulose	46,6	47,7	41,2	45,1
Pentosanos	25,2	25	26	25,6
Lignina	20,7	19,5	21,7	14,1
Organossolúveis	2 – 3	-	-	3,5
Aquosolúveis	2 – 3	-	-	
Cinzas	2 – 3	-	-	8
Umidade	48 – 52	-	-	9,7

Fonte: INSTITUTO...³⁴

A fibra e a medula apresentam diferenças na sua composição química, como observado na composição do bagaço. A medula apresenta proporções maiores de hemicelulose e lignina – já a fibra possui mais celulose. Estas diferenças de composição apontam uma vantagem comparativa para a fibra em relação aos rendimentos da hidrólise.

1.4 Sacarificação da biomassa lignocelulósica: pré-tratamento e hidrólise

Dois tipos de processos de hidrólise da biomassa lignocelulósica são conhecidos: hidrólise ácida e hidrólise enzimática. A hidrólise ácida se divide em hidrólise ácida concentrada, que permite o uso do ácido a temperaturas baixas e concentração de ácido 10-30% e a hidrólise ácida diluída, que usa ácido 2-5% em altas temperaturas.

A empresa novaCana com o intuito de quantificar o potencial do bagaço para produção de etanol, utilizou-se dados publicados na literatura de tecnologia aplicadas a esse propósito e, dessa forma, avaliaram o potencial de transformação do bagaço em bioetanol (etanol de 2ª geração) em função do avanço da tecnologia de hidrólise. Assim, foi possível estabelecer cinco cenários que incorporam gradativamente aumentos da eficiência de conversão de hexoses e pentoses para

hidrólise catalisada por ácidos diluídos e por enzimas, e a fermentação das pentoses a etanol.³⁵ A análise adaptada encontra-se na tabela 2.

Tabela 2 - Potencial de transformação do bagaço em bioetanol mediante tecnologias empregadas.

Situação	Pré-tratamento	Tipo de hidrólise	Fermentação		Tecnologia	Etanol (Lit de bagaço)
			Hexoses	Pentoses		
1	X	Ácida diluída	X		Atual	69,1
2	X	Ácida diluída	X		Otimizada	94,2
3	X	Ácida diluída	X	X	Otimizada	132,2
4	X	Enzimática	X		Atual	97,0
5	X	Enzimática	X	X	Otimizada	149,3

Fonte: Adaptado de NOVACANA³⁵

A hidrólise enzimática da lignocelulose parece ter o maior potencial para alcançar melhor rendimento na produção de etanol de 2ª geração considerando a tecnologia atual e a otimizada. A exploração fermentativa de açúcares de 5-carbonos introduzirá aumento significativo na obtenção de etanol.³⁶

No processo com ácido concentrado, há geração de muitos subprodutos e o ácido empregado deve ser reciclado, o que gera uma maior complexidade ao processo, além do mais, há o emprego de ácidos como o sulfúrico, que são extremamente corrosivos, podem promover o desgaste de equipamentos e podem degradar os açúcares, reduzindo as fontes de carbono e, conseqüentemente, diminuindo o rendimento do etanol.³⁷

A hidrólise acompanhada com o uso de ácido diluído e a altas temperaturas acelera a decomposição da hemicelulose, provocando assim a formação de compostos tóxicos como o furfural e o 5-hidroximetil-furfural, que são moléculas que inibem o crescimento dos microrganismos (principalmente leveduras) utilizados na etapa subsequente, conhecida como fermentação, causando, deste modo, uma redução na taxa de conversão dos açúcares em etanol.³⁸⁻³⁹

A hidrólise diluída é industrialmente desenvolvida pela Dedine Indústrias de Base, seu processo chama-se DHR (Dedine hidrólise rápida). Por outro lado, a hidrólise enzimática está em constante desenvolvimento industrial, e.g.: pela IOGEN Corporation, localizada em Ottawa (Canadá). Nos dois processos citados, é

empregado o pré-tratamento com impregnação por ácido, embora no processo IOGEN também se emprega explosão de vapor, este é de baixa eficiência.⁴⁰ Outros tipos de pré-tratamentos disponíveis como a pirólise, explosão com amônia, explosão com CO₂, ozonólise, hidrólise ácida, hidrólise alcalina, deslignificação oxidativa e processo Organossolve também são encontrados.⁴¹

Atualmente, no Brasil, desde quando a ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis) passou a controlar o setor alcooleiro, foi emitida uma autorização para construção de uma usina de etanol celulósico, a Granbio, a primeira usina de etanol de segunda geração do país com tecnologia própria. A Raizen já opera no Brasil desde 2014 em parceria com a IOGEN na produção de etanol celulósico.

O pré-tratamento é essencial para o processo de hidrólise enzimática da biomassa,⁴² a qual, tem como finalidade alterar a estrutura nativa da lignocelulose, auxiliando na remoção da camada de lignina e na descristalinização da celulose, o que facilita o acesso enzimático aos polímeros da biomassa (figura 11). Assim, para se alcançar as condições ideais do processo e atingir uma eficiência adequada na etapa de pré-tratamento, alguns parâmetros são de extrema importância e devem ser avaliados, entre eles: materiais pré-tratados altamente digestíveis para a etapa de hidrólise enzimática, mínima degradação de açúcares, mínima formação de produtos inibidores, não necessidade de moagem previa ao pré-tratamento, custo dos reatores, baixa produção de resíduos e necessidade mínima aquecimento e energia.

A hidrólise de ligninas e hemicelulose gera açúcares e subprodutos (principalmente, difenóis, derivados de fenilpropano, cetonas, furfural e ácido acético), que muitas vezes inibem a fermentação microbiana. Além disso, a celulase adsorve fisicamente sobre ligninas e, por esta razão, a biomassa sofre um pré-tratamento para separar a matriz de lignina, reduzir a cristalinidade da celulose e hidrolisar a hemicelulose, separando o hidrolisado da celulose, a qual sofre tratamento específico para a obtenção de glicose.⁴³

A hidrólise enzimática de biomassa bruta frequentemente possui um rendimento de produção de açúcar menor que 20% quando comparada à hidrólise enzimática com uma etapa de pré-tratamento utilizada, que pode alcançar até 90% de rendimento.⁴⁴

Figura 11 - Mecanismo de ação dos diferentes pré-tratamentos sobre o material lignocelulósico.

Fonte: MOSIER⁴⁵

Por fim, a utilização de enzimas na hidrólise de celulose é mais vantajosa, ocorrendo maior produção de monossacarídeos, que o uso de produtos químicos, pois as enzimas são altamente específicas e podem atuar em condições de processos suaves, não ocorrendo a degradação dos açúcares formados, os efluentes gerados são facilmente tratados e não há a formação de compostos que inibem a etapa de fermentação.⁴⁶

1.5 Hidrólise enzimática

Existe um conjunto amplo de enzimas especializadas na reação de hidrólise das diversas particularidades químicas atreladas à natureza complexa e diversa da biomassa.

A completa sacarificação da celulose é realizada pela ação sinérgica de um complexo coquetel enzimático, composto por pelo menos 3 grupos principais de enzimas, entre elas: as endoglucanases (EG), as exoglucanases ou

celobiohidrolases (CBH) e as β -glicosidasas (β G) (figura 12). Para a hidrólise de hemicelulose há enzimas específicas, como as xilanases ou mananases (figura 13).⁴⁷

A degradação da lignina é um pré-requisito para a hidrólise da celulose e hemicelulose e, portanto, para o uso das principais fontes de carbono e energia. No entanto, devido à sua hidrofobicidade e a estrutura complexa faltam ligações hidrolisáveis regulares. As enzimas que degradam a lignina são oxidativas, não específica e actuam através de mediadores não protéicos em contraste com celulasas e hemicelulasas hidrolíticas. A lignina é pouco degradada por muitos microrganismos capazes de degradar a biomassa.⁴⁸ As principais enzimas lignocelulíticas são lignina-peroxidases e lacases, que ajudam a remover uma quantidade considerável de lignina da biomassa.⁴³

No entanto, a produção em larga escala de todas essas enzimas envolvidas no processo de sacarificação da biomassa é dispendioso. Portanto, são necessárias reduções substanciais no custo de produção delas.⁴⁹ Ao longo dos últimos anos, muito esforço tem sido dedicado à isso. Como consequência, o conceito de biorrefinaria vem ganhando extrema importância. Este conceito engloba uma vasta gama de tecnologias capazes de separar os recursos da biomassa em seus blocos químicos. Estes podem ser convertidos em produtos de maior valor agregado, como produtos químicos valiosos, biocombustíveis, e outros materiais e energia.^{50 51} Por exemplo, a empresa brasileira Braskem AS detém a tecnologia em escala comercial de produção de polietileno a partir da conversão do etanol a etileno. Por analogia, isso evidencia uma forma de se converter e anexar valor ao etanol produzido a partir de biomassa nas biorrefinarias.

Por fim, em conformidade à indústria do petróleo, uma possível viabilidade econômica da biorrefinaria de lignocelulose pode ser conseguida através da produção simultânea de grandes volumes de combustíveis de baixo valor, juntamente com volumes menores de produtos químicos, porém de maior valor agregado, à base de carbono. Assim, o alto valor agregado da matéria lignocelulósica aliada com as tecnologias de aproveitamento completo dela ajudam a convergir os custos associados a produção a valores mais baixos.⁵²

1.5.1 Degradação enzimática da celulose: celulasas

Celulasas têm sido utilizadas no processamento de algodão, reciclagem de papel, produção de detergentes, extração de suco e aditivos para a alimentação animal.⁵³ A demanda por celulasas tende a aumentar, uma vez que a biomassa das plantas é uma importante fonte de açúcares fermentáveis para a produção de etanol de segunda geração.⁵⁴

As endoglucanases (EG; endo-1,4- β -D-glucanases, EC 3.2.1.4), preferencialmente, agem em regiões amorfas e clivam as ligações internas ao acaso das cadeias de glicano, proporcionando extremidades redutoras ou não-redutoras de celo-oligossacarídeos para que celobiohidrolases (CBH, ou exoglucanase, 1,4- β -D-glucano-celobiohidrolase, EC 3.2.1.91) ataquem. As CBHs, em seguida, hidrolisam aquelas extremidades da cadeia em forma processiva, originando celobiose como produto principal. Finalmente, β -glucosidase (BG; celobiase, β -D-glucosídeo glucosidase, EC 3.2.1.21) hidrolisam ainda a celobiose à glicose e também libera glicose a partir das extremidades não redutoras dos celo-oligossacarídeos solúveis (figura 12).^{13; 47}

Ao contrário dos substratos solúveis, a celulose é insolúvel e por isso ela não se difunde até os sítios ativos das celulasas. Dessa forma, uma das maneiras de aproximar o sítio ativo das enzimas, anexar e movimentar o segmento do polímero de celulose é através de um módulo de ligação à celulose, (CBM) que se liga à celulase através de um ligante flexível (do inglês, linker).⁵⁵⁻⁵⁶ O CBM propicia a aproximação física entre enzima e o substrato através da adsorção da celulase ao polímero, assim, ele promove maior concentração de enzima em contato com o substrato, favorecendo a catálise enzimática e aumentando a sua atividade.⁵⁷ O CBM também pode perturbar a celulose cristalina, gerando mais regiões propícias ao ataque enzimático.⁵⁶

Figura 12 - Esquema de hidrólise completa da celulose. EGs agem em regiões amorfas da celulose, atuando nas ligações internas dela e liberando celo-oligossacarídeos com extremidades redutoras e não-redutoras. As CBHs agem nesses celo-oligômeros produzindo celobiose que servirá de substrato para as BGs que disponibiliza a glicose como produto. As BGs também agem em extremidades não redutoras dos celo-oligômeros solúveis.

Fonte: PHITSUWAN⁵⁸

1.5.2 Degradação enzimática da hemicelulose: hemicelulases

A hemicelulose, possuidora de maior heterogeneidade, requer ampla atuação de enzimas para gerar seus monômeros constituintes em comparação a celulose. A hidrólise total da hemicelulose gera monossacarídeos e ácido acético. A cadeia principal da hemicelulose é a xilana e para sua hidrólise são requeridas as xilanases

e enzimas acessórias. Elas são em sua maioria hidrolases de glicosídeos, mas também algumas esterases são capazes de hidrolisar as ligações entre grupos acetato e ácidos ferúlicos das ramificações.

As xilanases incluem as endoxilanases de despolimerização (EC 3.2.1.8), que atuam na cadeia principal em ligações do tipo β -1,4 liberando xilo-oligossacarídeos solúveis, que servem de substrato para a exoatividade das β -xilosidases (EC 3.2.1.37), exoxilanases que liberam xilose dos terminais não-redutores.⁵⁹ Para garantir a quebra dos diferentes açúcares presentes nas ramificações, são necessárias outras enzimas acessórias,⁶⁰ como apresentado na figura 13.

Regiões ramificadas das xilanas requerem a intervenção de outras enzimas como α -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), que hidrolisam ligações α -1,2 e/ou α -1,3, que ligam arabinose a xilose, esterases de acetil (EC 3.1.1.72.), que hidrolisam as substituições acetil nos resíduos de xilose e estereases de feruolil (EC 3.1.1.73), que quebram ligações éster entre ácido ferúlico e arabinose (figura 13), esta última ligação éster está envolvida na ligação cruzada de xilana e lignina.⁶¹⁻⁶²

Figura 13 - Enzimas envolvidas na hidrólise da hemicelulose.

Fonte: QUIROZ-CASTAÑEDA⁶⁰

1.6 Hidrolases de Glicosídeos: classificação e estudos estruturais.

As hidrolases de glicosídeos, segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), que recebem um código específico denominado “*EC number*” (do inglês, *Enzyme Commission number*), são categorizadas de acordo com especificidade ao substrato e, ocasionalmente, em seu mecanismo molecular. O código *EC number* é representado como uma sequência de quatro dígitos, por exemplo EC 3.2.1.4 que representa uma endoglucanase GH12, sendo que o 1º dígito representa a classe da enzima de acordo com a reação catalisada, o 2º a subclasse, o 3º grupos químicos reacionais e o 4º dígito indica o substrato, mas também pode representar em alguns casos o mecanismo molecular ou tipo de ligação entre as moléculas. No exemplo, a GH12 catalisa uma endo-hidrólise de ligações β -1,4 D-glicosídica de celulose, liquenano e cereais β -D-glicanos.

Esta classificação não reflete as características estruturais das enzimas e tornou-se incompatível com o número crescente de hidrolases de glicosídeos que foram sendo identificadas, o qual chega a vários milhares.⁶³ Assim, elas são agrupadas em famílias de acordo com semelhanças em suas sequências de aminoácidos,⁶⁴ cuja classificação é atualizada regularmente e disponível no servidor CAZy (do inglês, *Carbohydrate Active Enzymes*).⁶⁵ Conforme estruturas terciárias dessas enzimas foram adicionadas, foi possível estabelecer que cada família possui conformações características e que ajudam a prever a de novas enzimas baseado na estrutura primária, uma vez que a sequência de aminoácidos reflete características conformacionais.

A classificação das enzimas ainda ajuda a inferir relações evolutivas e informações sobre os mecanismos de ação das hidrolases de glicosídeos. A classificação das hidrolases de glicosídeos em famílias estruturalmente ordenadas resolve a contradição acerca da especificidade do substrato em enzimas multifuncionais e complementa a classificação da IUBMB, a qual é funcionalmente ordenada.

O fato de algumas famílias conterem enzimas com diferentes especificidades pelo substrato sugere uma evolução divergente de uma conformação básica no sítio ativo de forma a acomodar substratos diferentes. Da mesma forma, a presença da mesma função em diferentes famílias sugere evolução convergente de várias conformações resultando na mesma especificidade de substrato.

Devido às relações evolutivas observadas através da estrutura terciária e caracterização bioquímica e biofísica das hidrolases de glicosídeos, é possível estabelecer estudos de engenharia de proteínas, visando o melhoramento da atividade catalítica das enzimas.⁶⁶

Em geral, as hidrolases de glicosídeos possuem como resídeos catalíticos do sítio ativo dois principais aminoácidos: aspartato e glutamato, cujas cadeias laterais estão envolvidas na assistência ácido/base. A desprotonação da molécula de água se dá devido a atuação de um catalisador básico, em que se dá a hidrólise, clivando a ligação glicosídica que une os monômeros. Essa clivagem pode ocorrer através de dois mecanismos: com inversão da configuração do centro anomérico ou com retenção da configuração do centro anomérico (figura 14).⁶⁷

Figura 14 - Mecanismo reacional geral de retenção e inversão das glicosidases

Fonte: Adaptado de WITHERS⁶⁸

1.6.1 Hidrolases de glicosídeos da família 12 (GH12)

Membros da família GH12 são largamente utilizadas em inúmeras aplicações industriais, tais como têxteis, detergentes, alimentos e farmacêutica.⁶⁹ Conforme classificado pelo CAZy, a enzima endoglucanase pertencente à família 12 das hidrolases de glicosídeos pode ser encontrada em vários táxons⁷⁰ e possui classificação estrutural hierárquica do tipo rocambole de folhas β (do inglês, *β -jelly roll*). Majoritariamente, estas enzimas clivam ligações glicosídicas e são do tipo endo- β -1,4-glicanase (EC 3.2.1.4), xiloglicano endoidrolase (EC 3.2.1.151) e endo- β -1,3-1,4-glicanase (EC 3.2.1.73). De forma geral, elas abrem o material polissacarídico inacessível para a atuação hidrolítica de outras hidrolases de glicosídeos.

O mecanismo de reação das GH12s pode ser do tipo de retenção (figura 14) – um mecanismo clássico de Koshland de duplo deslocamento onde há a formação de um intermediário glicosídeo-enzima. O mecanismo de retenção clássico de Koshland está associado a distância típica de 5,5 Å entre o nucleófilo e o catalisador ácido-base, contra 6-11 Å de distância entre os mesmos resíduos no mecanismo de inversão.⁶⁷⁻⁶⁸

O nucleófilo catalítico foi confirmado quando a primeira estrutura tridimensional de uma GH12 foi determinada⁷¹ e subsequente confirmada usando uma estratégia de rotulagem utilizada anteriormente com uma GH11.⁷² O nucleófilo identificado foi então o Glu¹²⁰ e como catalisador ácido-base o Glu²⁰³ ambos de uma GH12 de *Streptomyces lividans* e alinhamentos sequenciais sugerem que esses resíduos são conservados dentro da família 12.⁷²

Quanto à especificidade ao substrato, essa família exhibe diferenças notáveis (tabela 3). Uma possibilidade quanto a diversidade da seletividade enzimática dessa família sugere estar relacionada com a glicosilação dessas enzimas.⁷³ Outro fator pode ser o estado oligomérico, uma vez que a endo- β -1,4-glucanase xiloglucano-específica (GH12) de *Aspergillus niveus* que é dimérica a 20 °C e monomérica na temperatura de 60 °C, que é sua temperatura ótima de atividade.⁷⁴

Tabela 3 - Valores de atividade específica para enzimasGH12 de diferentes organismos.

Organismo	ENZIMA	ATIVIDADE ESPECÍFICA	
		β -glicano de cevada	CMC
<i>Stachybotrys atra bp-a</i>	Cel12A	27	0,5
<i>Aspergillus japonicus</i>	BG	263	3,9
<i>Cochliobolus carbonum</i>	Mlg2	25	Baixa
<i>Chrysosporium lucknowense</i>	Cel12A	125	11
<i>Rodothermus marinus</i>	Cel12A	7,2	0,7
<i>Pyrococcus furiosus</i>	Cel12A	58	7,1
<i>Trichoderma reesei</i>	Cel12A	17	23
<i>Aspergillus aculeatus</i>	XEG2	ND	ND
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	Cel12A	ND	42000
<i>Thermotoga neapolitana</i>	CelA	ND	1219
<i>Bacillus licheniformis</i>	Cel12A	ND	117

Fonte: PICART⁷⁵

Pequenas mudanças na estrutura primária das hidrolases de glicosídeos são capazes de alterar sua especificidade pelo substrato.⁷⁶ A sobreposição de estruturas de xiloglicanase de *Aspergillus nidulans* e endoglicanase de *Bacillus licheniformis* sugerem a participação de resíduos da superfície molecular como co-atuantes na seletividade dessas GH12.⁷⁷

Uma análise topológica da superfície xiloglicanase GH12 de *Bacillus licheniformis* (BIXG12), cujo o código de acesso 2JEN ao banco de dados de proteínas (PDB, do inglês *Protein Data Bank*) e uma GH12 de *Humicola grisea* (HgGH12; PDB: 1UU6) podem servir como esclarecimentos adicionais quanto a especificidade pelo substrato (figura 15). A bolsão de ligação mais aberto para a estrutura BIXG12 comparada com a da HgGH12, sugere interações mais fracas com polímeros lineares, o que é consistente com a baixa atividade celulolítica da BIXG12, sugerindo aumento para substratos ramificados. Em contra partida, um bolsão de ligação mais estreito reduz a interação com polímeros ramificados, apresentando uma forte preferência por celo-oligômeros como se observa para a HgGH12.^{77; 78; 79}

Figura 15 - Representação da superfície molecular da estrutura cristalográfica de BIXG12 revela um bolsão de ligação ao substrato mais amplo em comparação com estrutura HgGH12, sugerindo aumento da afinidade por substratos ramificados. Cor laranja: superfície de van der Waals para BIXG12 (PDB: 2JEN). Cor cinza: superfície de van der Waals para HgGH12 (PDB: 1UU6).

Fonte: Elaborado pelo autor.

1.7 Expressão de enzimas lignocelulíticas em fungos filamentosos.

A expressão de proteínas encontra na maquinaria celular bacteriana um ambiente mais simples, que, algumas vezes, refletem em enovelamento errado, degradação e baixa solubilidade, além das deficiências de etapas pós-traducionais e formação de corpos de inclusão.⁸⁰⁻⁸¹

Para tentar driblar esses resultados indesejados, usa-se levedura metilotrófica, *Pichia pastoris*. Embora tratemos agora de uma maquinaria mais robusta, a glicosilação variada, a secreção ineficiente e o comprometimento da estabilidade de proteínas torna a escolha desse mecanismo de expressão uma opção não muito confortável.⁸²⁻⁸³ No entanto, uma gama de diferentes tipos de proteínas recombinantes também tem sido expressa com sucesso em fungos filamentosos, esses organismos têm sido utilizados para expressão tanto de proteínas homólogas quanto heterólogas.

Os fungos filamentosos são capazes de converter uma variedade de fontes baratas e abundantes de carbono e nitrogênio em proteínas secretadas para o ambiente extracelular. Esses organismos são capazes de realizar corretamente modificações pós-traducionais como glicosilação e dessulfonação.⁸⁴⁻⁸⁶ Os gêneros

Aspergillus e *Trichoderma* são as principais linhagens fúngicas utilizadas para a produção de proteínas em larga escala.⁸⁷

Os fungos ainda são capazes de secretar grandes quantidades de proteínas recombinantes no meio de cultura, fazendo com que não haja necessidade de *lisar* as células e incluir etapas de purificação que podem ser custosas e morosas.

Muitos dos vetores designados para uso em *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha* e fungo filamentoso como *Aspergillus* e *Penicillium* são do tipo integrativo, ou seja, são incorporados dentro do DNA cromossômico da célula hospedeira. Isso sugere uma potencial estabilidade a longo prazo dos fungos transformantes. Esses vetores devem transportar uma marca de seleção para a célula transformada, pois a manipulação e seleção desse organismo deve ser direta e rápida. Também, a presença de um promotor forte, ou múltiplas cópias por célula do gene é extremamente importante para dirigir a produção do RNA_m heterólogo e, enfim, a síntese dessa proteína.⁸⁸

Um problema de se alcançar altos níveis de expressão em fungo vai além da clonagem e expressão de um gene. Ela também se relaciona com a expressão extracelular de proteases inerentes à maquinaria selvagem do hospedeiro. Quanto a isso, o desenvolvimento de estratégias para a construção de cepas de fungos deficientes de proteases tem sido empregada para contornar essa adversidade.^{89; 90} Ainda compõem novas estratégias para expressão em fungos o desenvolvimento em meio especializado⁸⁹ e mutagênese aleatória de proteínas juntamente com varredura de variantes para a secreção aumentada.⁹¹

Hoje, os produtos heterólogos são utilizados em aproximadamente um terço de todas as aplicações indústrias, com cepas de *Aspergillus* e alguns procariotos como os maiores organismos produtores. Assim, torna-se interessante o estudo da expressão heteróloga em fungos filamentosos visando o tratamento da biomassa para a obtenção de bioetanol.

2 OBJETIVOS

O atual cenário energético global é preocupante e está aliado às questões ambientais ainda mais dramáticas. É possível sentir o efeito de ambos de forma imediata. Concomitante, é do contexto contemporâneo o estudo de celulase da família 12 para a sacarificação da biomassa com a finalidade de se obter álcool combustível. Unido a isso, se objetiva caracterizar bioquímica e estruturalmente uma GH12 de *Aspergillus terreus* (AtGH12) e compreendê-la buscando correlacionar suas propriedades insígnies. Para tanto, se fazem os objetivos específicos:

2.1 Objetivos específicos

- ❖ Clonar o gene da AtGH12;
- ❖ Transformar e expressar o gene em *Aspergillus nidulans* linhagem A773 e purificá-la;
- ❖ Fazer a triagem da especificidade por substratos de ligações β -glicosídicas.
- ❖ Investigar as condições tamponantes ótimas por *Thermofluor* e atividade enzimática;
- ❖ Caracterizar as propriedades ótimas enzimáticas: temperatura, pH e aditivos;
- ❖ Estudar o produto hidrolisado por espectrometria de massas MALDI-TOF MS;
- ❖ Conhecer sua estabilidade térmica por dicroísmo circular (CD) e *ThermoFluor*.
- ❖ Investigar o estado oligomérico em solução, bem como homogeneidade, através do estudo concatenado de gel nativo, Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS) e Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS);
- ❖ Avaliar sua atividade e sinergismo com o coquetel comercial frente a biomassa de cana-de-açúcar pré-tratada;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Clonagem

3.1.1 Oligonucleotídeos iniciadores e plasmídeo

O vetor de expressão e secreção pEXPYR⁹², quando integrado no genoma do *Aspergillus nidullans*, direciona a superexpressão induzida por maltose com alta acumulação de proteínas no meio extracelular, facilitando a coleta e purificação das proteínas recombinantes. O vetor pEXPYR contém um marcador auxotrófico reciclável *pyrG* (gene orotidina 5'-fosfato carboxilase: 5-FOA) flanqueado por repetições diretas MATE1⁹³, em que o marcador pode ser eliminado através de seleção de resistência ao ácido 5-FOA com recuperação do fenótipo original *pyrG*⁻. Essa construção possibilita a transformação na mesma célula de uma série de vetores pEXPYR contendo genes diferentes (figura 16).

Figura 16 - SDS-PAGE da secreção de três proteínas recombinantes integrados em uma única cepa de *Aspergillus nidulans* carregando xilanase (Xync), esterease de ácido ferúlico (Faea) e arabinase (AbnA). A. *nidulans* A773 (tipo selvagem) representa a transformação com o vetor vazio; 3T1 e 3T2 são duas linhagens triplamente transformadas e MW é o marcador de peso molecular em quilo Daltons (kD).

Fonte: SEGATO⁹²

Os estudos de clonagem da enzima Endoglucanase I de *Aspergillus terreus* linhagem NIH2624 foram realizados utilizando o vetor pEXPYR (figura 17) contendo o gene marcador de auxotrofia *pyrG* de *Aspergillus niger*.⁹²

Figura 17 - Vetor pEXPYR, utilizado para expressão de proteínas em fungo filamentososo.

Fonte: SEGATO⁹²

A sequência do gene que codifica a enzima AtGH12 (hidrolase de glicosídeo da família 12 de *Aspergillus terreus* - 238 aminoácidos, ~24 kDa) foi obtida no banco de dados GenBank (acesso **XP_001216041.1**). A sequência foi submetida aos servidores *SignalP 4.1*,⁹⁴ *NetOGlyc 4.0*⁹⁵ e *NetNGly 1.0*.⁹⁶ Baseado na sequência da proteína madura apontada pelo *SignalP 4.1*, um par de oligonucleotídeos iniciadores foram planejados e sintetizados (*Sigma® - Life Science*) e os sítios para as enzimas de restrição (*NotI* e *XbaI* – em *negrito*) foram adicionados na região 5' de cada oligonucleotídeo (tabela 4) para a amplificação do gene e posterior utilização no sistema de clonagem pEXPYR, através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR – do inglês, *Polymerase Chain Reaction*).⁹⁷

Tabela 4 - Oligonucleídeos iniciadores utilizados para clonagem de AtGH12

Orientação	Oligonucleotídeos
AtGH12_F	TATAG CGGCCG CCAGGTGTCGACGCTATGCGGTCAATACTCG
AtGH12_R	TATAT CTAGAT CAGTTCACGCTGGCCGAAAAGCTCG

Fonte: Elaborado pelo autor.

A predição computacional dos parâmetros físicos e químicos da proteína madura foi feita utilizando a ferramenta *ProtParam*.⁹⁸

3.1.2 Obtenção do gene

A reação de amplificação foi realizada com o sistema *PhusionTM* (*New England Biolabs*), que consiste em uma DNA polimerase de alta fidelidade, e como molde para amplificação o genoma extraído e purificado a partir do micélio de *Aspergillus terreus* linhagem NIH2624. A amplificação do gene (669 bp) correspondente à proteína madura (peptídeo sinal clivado) foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% e o produto da reação de amplificação purificado com o kit *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

3.1.3 Tratamento do gene

A quantidade de 2-3 µg de fragmento amplificado (*NanoDrop 2000* - *Thermo Scientific*) foi digerido duplamente com 10 U de *XbaI* (*Promega Corp*) e 10 U de *NotI* (*Promega Corp*), 5 µL de tampão de tipo 4 10X (*kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* – *Promega*) concentrado e água *MilliQ* estéril para completar o volume final de reação de 50 µL, seguido por uma incubação à 37 °C durante 2 horas e posterior inativação da reação a 65 °C durante 15 minutos.

3.1.4 Tratamento do vetor

Reagiu-se, também, 3 µg do vetor pEXPYR diluído em água *MilliQ* estéril, tampão do tipo 4 10X (*kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* – *Promega*) com 10 U cada das enzimas *NotI* (*Promega Corp*) e *XbaI* (*Promega Corp.*), e água até completar o volume de 50 µL de reação para formação de extremidades coesivas de ligação. Seguindo-se de incubação a 37 °C durante 2 horas e inativação das enzimas a 65 °C por 15 minutos. A amostra resultante foi submetida a uma eletroforese em gel de agarose 1% sob uma voltagem constante 90 V, durante 2 horas, para completa separação entre as formas linear e superenovelada. Em seguida, o gel foi corado e visualizado com luz UV, a banda correspondente a forma linear de DNA duplamente digerido, foi cortada do gel e purificada.

3.1.5 Reação de ligação

A reação de ligação entre os respectivos, genes e plasmídeos, foi conduzida em 10 µL de reação contendo a mistura do inserto com o vetor linearizado na proporção inserto/vetor de 80:100 e a proporção T4 DNA ligase (*Invitrogen*)/DNA de 1 U:50 ng e 1 µL de tampão de ligação. As reações foram incubadas por 16 horas a 16 °C.

3.1.6 Transformação em células competentes

As respectivas reações foram utilizadas para transformar células de *E. coli* TOP10 (*Invitrogen*) cálcio-competentes. A reação de ligação foi adicionada à 200 µL de células competentes e homogeneizada, tudo conduzido no gelo e em ambiente estéril. Transcorridos 30 minutos, as células foram submetidas ao choque térmico à 42 °C por 45 segundos e foram colocadas em gelo logo em seguida por mais 2 minutos. 1 mL de meio SOC (triptona 20 g.L⁻¹, extrato de levedura 5 g.L⁻¹, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 20 mM e glicose 20 mM) foi adicionado ao meio de transformação e incubou-se por 1,5 hora à 37 °C sob agitação de 250 rpm. Aproximadamente 200 µL da reação de transformação, foi plaqueado em meio LB sólido (1% (m/v) de triptona, 1% (m/v) NaCl, 0,5% (m/v) de extrato de levedura e 1,5% (m/v) de ágar) contendo 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina e incubadas a 37 °C por 16 horas.

3.1.7 Identificação e confirmação das colônias positivas

A fim de identificar as colônias contendo o fragmento de DNA da endoglucanase de *A. terreus*, a presença do plasmídeo nos clones recombinantes foi avaliada através de PCR de colônia. 10 colônias foram pinçadas e utilizadas para a reação de PCR contendo 5 µL de tampão 10X, 1 µM dNTPs, 10 pmol de cada primer do vetor, 1-U de Taq polimerase (*Fermentas*), e água para completar 50 µL de reação. As reações foram colocadas em um termociclador *MyCycler* (*Bio-Rad*), nas seguintes condições: passo 1: 98 °C por 5 min; passo 2: por 24 vezes - 95 °C por 45 seg; 50 °C por 45 seg; 72 °C por 2 min e 30 seg; passo 3: 72 °C por 5 min. O

produto do PCR foi analisado em gel de agarose 1% (m/v), utilizando como marcadores 1 Kb *plus DNA Ladder* (Invitrogen).

3.1.8 Extração do DNA plasmidial

Das colônias de *E. coli* confirmadas na etapa 3.1.7 foi escolhida uma e esta foi incubada em meio LB líquido com 100 µg.mL⁻¹ de Ampicilina por 16 h, 250 rpm à 37 °C. O DNA plasmidial das construções foi extraído centrifugando o meio por 15 minutos à 14.000 rpm e o *pellet* submetido ao *kit Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification System* (Promega).

3.2 Expressão heteróloga

3.2.1 Meio mínimo de crescimento e expressão

Um litro de meio de crescimento continha 50 mL de sais Clutterbuck 20 vezes concentrado (em 1 L de água *MilliQ*: 120 g de NaNO₃, 10,4 g de KCl, 10,4 g de MgSO₄, 30,4 g de KH₂PO₄), 1 mL de elementos traço 1000 vezes concentrado (em 100 mL de água *MilliQ*: 2,2 g ZnSO₄, 1 g de H₃BO₃, 0,5 g de MnCl₂.4H₂O, 0,5 g de FeSO₄.7H₂O, 0,16 g de CoCl₂.5H₂O, 0,16 g de CuSO₄.5H₂O, 0,11 g de Na₂MoO₄.4H₂O e 5 g de Na₂EDTA em pH 6,5), 10 g de glicose, suplementado com piridoxina (1mg.L⁻¹) e uracila e uridina (2,5 mg.L⁻¹ cada) em pH 6,5. O mesmo é feito para o meio de expressão, no entanto, adicionado de 50g de maltose.

3.2.2 Obtenção de protoplastos

Inoculou-se 10⁷ esporos (contados em microscópio ótico, utilizando-se uma câmara de Neubauer) de *Aspergillus nidulans* A773 em meio mínimo suplementado com uracila (10 mM) e uridina (100 mM) e manteve-se à 37 °C, sob agitação (180 rpm) por 18 horas. Separou-se o micélio por filtração com papel de filtro (*Whatman*) e lavou-se com MgSO₄ 0,6 M. Transferiu-se o micélio para um tubo falcon estéril e adicionou-se as seguintes enzimas: “*Lysing enzymes from Trichoderma harzianum*” (*Sigma L1412*), 100 mg.mL⁻¹ de DSPS (KCl 1,1 M, ácido cítrico 0,1 M, ajustado o pH para 5,8 com KOH e esterilizado por filtração), “*Lysozyme from Chicken Egg White*”

(Sigma L6876), 100 mg.mL⁻¹ de DSPS e albumina bovina (BSA), 100 mg.mL⁻¹ de DSPS. Incubou-se a 30 °C, 100 rpm por 1-2 horas ou até que não houvesse precipitados visíveis. Coletou-se os protoplastos por filtração com uma camada de *Miracloth* (DM Chemicals), em tubo de vidro estéril. Lavou-se, no mínimo, 2 vezes os protoplastos com 50 mL de STC (Sorbitol 1,2 M, tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 7,5, autoclavou-se e manteve-se a 4 °C) através de centrifugação à 4500 x g, 4 °C por 10 minutos. Ressuspendeu-se o precipitado em 1 mL de STC.⁹⁹

3.2.3 Transformação

Adicionou-se o DNA plasmidial (~5 µg - como descrito em 3.1.8) em um tubo falcon e diluiu-se para 100 µL com STC. Em seguida, acrescentou-se 200 µL de protoplastos. Incubou-se à temperatura ambiente por 10-15 minutos. Adicionou-se 2 mL de solução de PEG 60% (6g de PEG 4000 em 5 mL de STC) e agitou-se cuidadosamente e extensivamente para uma perfeita mistura dos protoplastos com a solução de PEG. Incubou-se à temperatura ambiente por 15-20 minutos. Adicionou-se 8 mL de STC, misturou-se bem e transferiu-se 1 mL para placas com meio mínimo para recuperação dos protoplastos (1,2M de sorbitol) e seleção de transformantes (sem uracila, uridina ou 5-FOA, adicionado de 100 µg.mL⁻¹ de zeocina). Incubou-se a 37 °C por 1 dia e inverteu-se as placas.⁹⁹

As colônias que cresceram foram selecionadas em placa com meio mínimo sólido (meio mínimo com 20 g.L⁻¹ de ágar) e 24 colônias foram transferidas para placas de 24 poços com meio mínimo de expressão e incubados a 37 °C, sob condições estáticas, por 48 horas.

3.2.4 Confirmação do nível de expressão de GH12

A triagem da cepa com melhor nível de expressão foi conduzida através do protocolo para utilização do sistema *Caliper LabChip® - PerkinElmer*, utilizando o extrato bruto do meio de expressão. Esse método, assim como um gel SDS-PAGE (do inglês, *Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis*), visa identificar e quantificar as proteínas secretadas no meio. Após isso, a fim de se obter um melhor perfil de expressão, a cepa escolhida foi inoculada em meio de

expressão acrescido de HEPES 200mM pH 6,5 e o nível de expressão foi observado depois de transcorridos 2, 3 e 4 dias, através de gel SDS-PAGE.

3.3 Purificação

Após a seleção do melhor transformante, a expressão da proteína recombinante foi feita cultivando o fungo em meio mínimo de expressão adicionada de 200 mM HEPES em placas de Petri a 37 °C. Após 72 horas, o micélio é filtrado através de membrana *Miracloth™* (EMD Chemicals). Com o sistema *Hollow Fiber Cartridge - 10 kDa* (GE Healthcare), o meio bruto foi concentrado através de uma coluna de filtração tangencial de corte 5 kDa e, posteriormente, submetido a etapa de *salting out* por adição de sulfato de amônio. Após atingida a saturação do sal em solução, o meio foi incubado *over night* sob agitação e refrigeração. Em seguida, essa solução é centrifugada a 19000 rpm por 40 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em tampão citrato de sódio 50 mM e novamente centrifugado. O sobrenadante foi recuperado e injetado em uma coluna de *Phenyl Sepharose Hight Performance* (GE Healthcare) com tampão inicial de citrato de sódio 50 mM e 1 M de sulfato de amônio pH 5,5. O pico correspondente à enzima foi recuperado utilizando a cromatografia de interação hidrofóbica, acoplada ao sistema *ÄKTA™ FPLC™* (GE Healthcare), com um gradiente linear de concentração de tampão de eluição (citrato de amônio, pH 5,5). As frações correspondentes ao pico da enzima de interesse são então separadas.

Após isso, mais uma etapa de purificação foi aplicada. Utilizando os concentradores do tipo *Amicon®* (Millipore) com corte de 10 kDa, leva-se as frações obtidas na coluna de interação hidrofóbica foram levadas ao volume necessário para a aplicação na coluna de exclusão de massa molecular *HiLoad Superdex 75 prep grade* acoplada ao sistema *ÄKTA™ FPLC™* (GE Healthcare) e utilizando um fluxo de 1 mL.min⁻¹ e pressão máxima de 0,5 MPa. O tampão de eluição utilizado foi o citrato de sódio 50 mM, NaCl 200 mM, pH 5,5. As frações produzidas são analisadas com *Caliper LabChip* e gel SDS-PAGE para identificação do pico cromatográfico correspondentes às frações puras da enzima.

3.4 Espectrometria de massas

A análise de espectrometria de massas foi desenvolvida no presente trabalho a fim de confirmar a expressão de AtGH12 em *Aspergillus nidulans*. A partir de um gel SDS-PAGE corado com azul brilhante de comassie, foi cortada a banda correspondente à AtGH12 para ser tratada como descrito em Schevchenko et al. (1996)¹⁰⁰ e digerida com tripsina (20 ng.mL⁻¹). A amostra resultante desse processo foi utilizada na preparação da solução a ser empregada no espectrômetro de massas.

A preparação dessa solução consiste em uma alíquota de 1 µL da amostra de proteína tratada com a tripsina, 1 µL de matriz α-ciano-4-hidroxi ácido cinâmico (HCCA, do inglês: *alpha-cyano-4-hydroxy cinamic acid*). Após misturadas, essa solução resultante foi aplicada sobre a placa de amostras. Após sua secagem, a mesma foi analisada utilizando um espectrofotômetro de massas *Microflex LT MALDI-TOF (Bruker Daltonics)*. As medidas são feitas em modo linear positivo entre 300-4000 m/z. As massas médias foram atribuídas e processadas usando software *flexAnalysis™ (Bruker Daltonics)*. A busca por impressão digital do mapa peptídico (do inglês: *mass fingerprint*) foi realizado usando o *BioTools™ (Bruker Daltonics)* e a lista m/z de peptídeo foi gerado *in silico* por digestão por tripsina da sequência de aminoácidos da proteína.

3.5 ThermoFluor

A determinação da estrutura terciária de proteínas é um processo difícil e demorado.¹⁰¹ São vários os parâmetros, tais como: pH, força iônica, aditivos, precipitantes, concentração de proteína, que governam o caminho que conduz à condição em que a proteína seja capaz de se organizar, formando um cristal difratável.¹⁰² Dessa forma, a técnica de fluorimetria diferencial de varredura (DSF, do inglês *Differential Scanning Fluorimetry*), também conhecida como *ThermoFluor*, vem auxiliar de forma robusta e eficiente na triagem dos melhores tampões e aditivos e, conseqüentemente, assiste no aumento da probabilidade da proteína de formar cristais.

O conceito base do *ThermoFluor* é a exposição do núcleo hidrofóbico, quando a proteína é desnaturada, que foi usada como artifício na ligação de uma molécula

de prova (*SYPRO Orange – Molecular Probes*) que é hidrossolúvel, mas liga-se preferencialmente em regiões hidrofóbicas, como o interior das proteínas.¹⁰¹ Com o desenovelamento induzido termicamente, o cerne hidrofóbico da proteína é exposto e com isso a emissão de fluorescência da amostra aumenta devido a exposição da molécula de prova. Assim, a fluorescência facilmente detectada pelo aparelho de *Real-Time PCR* e pode ser tratada como função da temperatura (figura 18). Dessa forma, o T_m é definida como o ponto médio da temperatura de transição entre o estado enovelado e desenovelado.

Figura 18: Curva de fluorescência em unidades arbitrárias (u.a.) da desnaturação térmica de diferentes proteínas (cores) na presença da molécula de prova *SYPRO Orange*.

Fonte: Adaptado de Ericsson¹⁰¹

O ensaio de *ThermoFluor* foi acompanhado de acordo com estudos previamente descritos na literatura.^{101,103} As medidas foram realizadas no equipamento *CFX96 Real-Time System (Bio-Rad)*, usando uma placa de PCR de parede fina com 96 poços e fita de vedação de qualidade óptica (do inglês, *optical-quality sealing tape*) *MiniOpticon Real-Time PCR (Bio-Rad)*. Em cada poço foi adicionado 30 µg da proteína AtGH12, diferentes soluções tamponantes com pH entre 1,2 e 10,0 na concentração final de 50 mM (tabela 5) e 1:2000 da sonda fluorescente *SYPRO Orange* diluída em tampão fosfato de sódio 50 mM (*Molecular*

Probes). O gradiente de temperatura aplicado na análise foi de 25 °C a 90 °C com um aumento de 1 °C e incubação de 30 segundos em cada temperatura, para ser atingido o equilíbrio. A variação da fluorescência da *SYPRO Orange* foi medida usando excitação em 490 nm e emissão em 530 nm. A construção e análise das curvas, incluindo a determinação da temperatura de fusão T_m (do inglês, *melt temperature*) de cada amostra, foram realizadas usando o software *GraphPad Prism* (versão 5.0).

Tabela 5 - Tampões explorados pela técnica de Termofluor

Tampão (100mM)	pH	NaCl (mM)	Tampão (100mM)	pH	NaCl (mM)
Água	-	0	Fosfato de Sódio	7,5	0
Ác. Clorídrico	1,2	0	Tris	7,5	0
Ác. Clorídrico	2,0	0	Imidazol	8,0	0
Ác. Cítrico	3,0	0	Hepes	8,0	0
Citrato de Sódio	4,0	0	Tris	8,0	0
Acetato de Sódio	4,5	0	Bicina	8,0	0
Citrato de Sódio	4,7	0	Tris	8,5	0
Acetato de Sódio	5,0	0	Bicina	9,0	0
Fosfato de Sódio	5,0	0	Carbonato de Sódio	9,5	0
Citrato de Sódio	5,5	0	Carbonato de Sódio	10,0	0
Fosfato de Sódio	5,5	0	Ác. Cítrico	3,0	300
Mes	5,8	0	Acetato de Sódio	4,5	300
Fosfato de Sódio	6,0	0	Fosfato de Sódio	5,0	300
Bis-Tris	6,0	0	Acetato de Sódio	5,0	300
Mes	6,2	0	Citrato de Sódio	5,5	300
Fosfato de Sódio	6,5	0	Mes	5,8	300
Cacodilato de Sódio	6,5	0	Bis-Tris	6,0	300
Bis-Tris	6,5	0	Cacodilato de Sódio	6,5	300
Mes	6,5	0	Fosfato de Sódio	6,5	300
Bis-Tris	6,7	0	Bis-Tris	7,0	300
Fosfato de Sódio	7,0	0	Hepes	7,0	300
Hepes	7,0	0	Acetato de Amônio	7,3	300
Bis-Tris	7,0	0	Tris	7,5	300
Acetato de Amônio	7,3	0	Hepes	8,0	300

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.6 Estado oligomérico

Muitas proteínas apresentam diversas cadeias polipeptídicas interagindo, que podem servir a diversas funções e auxiliar nas investigações a respeito das relações que podem existir entre as moléculas, mediante a ligação do substrato. Um método preliminar e qualitativo da análise do estado oligomérico e da homogeneidade em solução da proteína é a eletroforese em gel nativo. Adicionalmente, outros dois métodos analíticos também foram empregados para complementar a caracterização oligomérica da AtGH12, e são eles: espalhamento de luz dinâmica (DLS) e espalhamento de luz a baixo ângulo (SAXS).

3.6.1 Gel nativo

Mediante as características de carga, massa e conformação, a proteína migra em um gel, que está submetido a um campo elétrico. Esse experimento foi realizado no equipamento *Phast System* (Amersham Biosciences), utilizando-se um gel não desnaturante, o *Phast Gel* 8-25 com gradiente de 8 a 25 % de acrilamida (GE) e um padrão de proteínas de alta massa molecular: tiroglobulina bovina (669 kDa), ferritina de cavalo (445 kDa), catalase (232 kDa), aldolase (140 kDa) e soroalbumina bovina (66 kDa). O gel foi corado com *Comassie Blue* em solução aquosa de metanol 25% e ácido acético 10% e, em seguida, descorado com solução aquosa de ácido acético 10%.

3.6.2 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

Os dados coletados no experimento de SAXS quando analisamos um sistema monodisperso permitem a determinação da dimensão máxima ($D_{\text{máx}}$) das proteínas na amostra, bem como seu raio de giro (R_g), que corresponde à distância quadrática médias dos elétrons relativa a posição do centro de massa da molécula. Isso acontece porque os átomos de uma amostra interagem com o feixe monocromático de raios-X incidente. Os elétrons pertencentes a esses átomos se comportam como se fossem livres, já que a energia dos fótons incidentes é bem menor que a de ligação deles nos átomos.

Portanto, considerando que partículas livres e oscilantes produzem ondas eletromagnéticas em todas as direções e coerentes com a onda incidente (mesma frequência e fase), no caso de um espalhamento elástico, a intensidade da onda espalhada dependerá do ângulo de espalhamento (2θ).¹⁰⁴ Como as partículas em solução estão desordenadas em movimento browniano, ao contrário do que ocorre em um cristal, onde as partículas estão organizadas de forma periódica em uma rede tridimensional,¹⁰⁵ ocorre a perda de informação em experimentos de espalhamento de raios-X a baixo ângulo, principalmente devido à necessidade de se obter a média do espalhamento sobre todas as direções no espaço.

Um gráfico das distribuições de distâncias, $p(r)$, pode ser obtido através de cálculos dos dados de espalhamento e, dessa forma, pode se ter uma ideia do estado oligomérico da proteína em solução. Também, a partir do fator de forma $I(q)$ vs. q , pode ser obtido um modelo tridimensional *ab initio*, que permite inferir comparações estruturais através da inspeção visual entre esse modelo gerado e de proteínas homólogas que já possuem estrutura de alta resolução (obtida por cristalografia ou RMN) determinada.

A amostra submetida ao SAXS estava a uma concentração de 0.8 mg.mL⁻¹. Os dados de SAXS foram coletados na linha SAXS-2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas, São Paulo, utilizando um comprimento de onda $\lambda = 1,55 \text{ \AA}$, em detector bidimensional (MarCCD) disposto a 986,45 mm da amostra, cobrindo um intervalo de transferência de momento de $0,01512 \text{ \AA}^{-1} < q < 0,3383 \text{ \AA}^{-1}$.

As medidas do espalhamento da solução de proteína e do tampão foram feitas em dois *frames* de 150 segundos, para o monitoramento de possíveis danos causados pela radiação à amostra, além da estabilidade do feixe. A análise sistemática e o processamento inicial dos dados foram realizados por meio do programa FIT2D,¹⁰⁵ normalizando-se os dados pela intensidade do feixe e multiplicando-se pela absorção da amostra. Também foi realizada a subtração do espalhamento do tampão do espalhamento da amostra analisada, para se contabilizar apenas o efeito espalhador das moléculas de proteína. O padrão bidimensional da amostra proteica foi integrado em 2θ . O R_g (raio de giro) foi obtido por dois métodos distintos, primeiramente utilizando a equação de Guinier (equação 1).¹⁰⁶

$$I(q) = I(0)\exp\left(-\frac{R_g^2}{3}q^2\right) \quad (1)$$

Onde,

“ R_g ” é o raio de giro;

“ $I(0)$ ” é a intensidade no ângulo zero.

“ q ” é o módulo do vetor espalhamento e é dado por (equação 2):

$$q = 4\pi \sin(\theta/\lambda) \quad (2)$$

Posteriormente, utilizamos o método de Transformada Inversa de Fourier implementado no programa *Gnom*,¹⁰⁷ onde também obtivemos a função de distribuição de distâncias $p(r)$ e o $D_{\text{máx}}$ (diâmetro máximo) do envelope protéico. A partir da curva de espalhamento, contida no arquivo de saída do programa *Gnom*¹⁰⁷ e com o valor de $I(0)$ (extrapolado) normalizado para a concentração de proteína na amostra, estimamos o estado oligomérico da proteína no programa *SAXS MoW*¹⁰⁸ a partir da massa molecular teórica fornecida.

A determinação do modelo de baixa resolução, a partir dos dados de SAXS, foi realizada utilizando um procedimento *ab initio*, implementado no programa *Dammin*. De modo a tornar o modelo mais verossímil possível, corroborando com os dados experimentais, buscou-se a minimização da função do parâmetro discrepância, “ χ ” que leva em consideração a intensidade da luz espalhada e aquela calculada a partir do modelo gerado. Para melhor estatística dos resultados e qualidade do modelo final gerado, foram geradas dez construções *ab initio* independentes no *Dammin*,¹⁰⁹ que foram promediadas através do programa *DAMAVAR*¹¹⁰ e sobrepostas no programa *SUPCOMB*.¹⁰⁹ Por fim, foi sobreposta a estrutura terciária homóloga da AtGH12, sob código PDB: 1KS4, com 63% de identidade, ao modelo de SAXS, também por meio do programa *SUPCOMB*.¹⁰⁹

3.6.3 Espalhamento de luz dinâmica (DLS)

O espalhamento de luz dinâmico (DLS) é aplicado na caracterização de partículas, emulsões e moléculas que foram dispersas ou dissolvidas em um líquido. Quando o tamanho da partícula possui a mesma ordem de magnitude do

comprimento de onda (λ) da luz incidente, a intensidade da luz dispersa muda em função do ângulo. Desta forma, é possível saber o diâmetro da proteína.

A luz será espalhada por uma proteína em solução se a primeira possuir uma polarizabilidade diferente da do meio ao redor. Nesse caso, o momento dipolar induzido pelo campo elétrico da radiação incidente irá espalhar luz em todas as direções. A intensidade da luz dispersa está relacionada com a direção de polarização da luz incidente, o ângulo de espalhamento e de parâmetros da solução. O movimento browniano das partículas ou moléculas dispersas num meio líquido causa flutuações em função do tempo (figura 19).

Figura 19 - Autocorrelação das flutuações da intensidade em função do tempo de luz dispersa.

Fonte: Adaptado de XU¹¹¹

As flutuações da luz espalhada é constante observando um pequeno elemento de volume, onde o número de macromoléculas flutua com o tempo devido à difusão. Do coeficiente de difusão,¹¹¹ o tamanho da partícula pode ser calculada.

Um feixe de laser (633 nm) incide sobre a amostra e as partículas em solução espalham a luz, os fótons espalhados são coletados por um fotomultiplicador a um ângulo fixo de 90°. Um correlacionador digital é usado para calcular a função de auto-correlação (figura 19). Admite-se que essa função tem um decaimento exponencial para partículas esféricas e monodispersa.¹¹²

As medidas de espalhamento de luz dinâmica foram realizadas com a intenção de verificar e complementar a análise a respeito do estado oligomérico da AtGH12 em solução e em diferentes concentrações: 0,2; 0,5 e 1 mg.mL⁻¹ a 25 °C em tampão citrato de sódio 50 mM e 200 mM de NaCl pH 5,5 e 0,2 e 0,5 mg.mL⁻¹ em fosfato de sódio 50mM pH 6,5 e 100 mM de NaCl.

3.7 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD) de desnaturação térmica

As substâncias que exibem capacidade de absorver luz circularmente polarizada, como proteínas, são ditas opticamente ativas. Essa característica está relacionada com a quiralidade das moléculas em questão, em especial, a presença de carbono assimétrico – carbono alfa dos aminoácidos (exceto glicina). Dessa forma, o dicroísmo circular pode ser definido como a diferença entre a absorção das componentes circularmente polarizadas à direita (A_D) e à esquerda (A_E),¹¹³ com “ ΔA ” dada pela equação abaixo (equação 3):

$$\Delta A = A_D - A_E \quad (3)$$

Por razões históricas, a maioria das medições são referidas em graus de elipticidade, em que elipticidade, “ θ ”, é o arco tangente da razão entre o raio do eixo menor (b) pelo raio do eixo maior (a) da luz elipticamente polarizada (equação 4, figura 20). A luz elipticamente polarizada é formada pela combinação desigual de luz circularmente polarizada a esquerda com a direita. Essa desigualdade entre as componentes é dada pela absorção de substâncias opticamente ativas. Uma vez que, se não houver diferenças entre as componentes circulares, a combinação produz luz linearmente polarizada (figura 20).

Figura 20 - (A) Luz linearmente polarizada produzida pela superposição de componentes circularmente polarizadas para a direita e para a esquerda de iguais amplitudes. (B) Luz elipticamente polarizada produzida quando luz linearmente polarizada (A) tem uma de suas componentes absorvidas. E_D e E_E vetor campo elétrico da luz circularmente polarizada a direita e a esquerda, respectivamente; α rotação óptica.

As moléculas biológicas em sua maioria são opticamente ativas e a atividade óptica está relacionada à sua conformação estrutural. Como as proteínas estão repletas de centros quirais, devido a presença do carbono α dos aminoácidos, exceto a glicina, e o carbono β das cadeias laterais de alguns aminoácidos, como a treonina e a isoleucina, essas estruturas podem ser analisadas e quantificadas por meio da técnica de CD.¹¹³

Nas proteínas, alguns componentes comuns exibem sinal em regiões típicas, como a ligação peptídica que apresenta absorção abaixo de 240 nm, cadeias laterais de aminoácidos aromáticos (absorção no intervalo de 260 a 320 nm), ligações dissulfeto que exibem sinal na região de 260 nm¹¹⁵ e os componentes de estrutura secundária, como as α -hélices, folhas- β e voltas- β (figura 21).¹¹⁶

Figura 21 - Espectro de CD característicos das mais comuns estruturas secundárias de proteínas.

Fonte: Adaptado de KELLY¹¹⁷

$$\tan \theta = \frac{(E_D - E_E)}{(E_D + E_E)} = \frac{b}{a} \quad (4)$$

Esse experimento investigou o efeito do desenovelamento da AtGH12 a 0,1 mg.mL⁻¹ com o aumento da temperatura em dois tampões: 20 mM citrato de sódio,

20 mM de NaCl em pH 5,5; 20 mM fosfato de sódio, 20 mM NaCl em pH 6,5 – ambos apontados pelo *thermofluor* como melhores tampões para garantir a estabilidade térmica da proteína. Os tampões também foram medidos e utilizados como referência no experimento.

O espectro de dicroísmo circular da enzima foi obtido utilizando-se um espectropolarímetro *JASCO J-815 (Jasco International Co. Ltd)*, equipado com um sistema de controle de temperatura do tipo *PELTIER PTC 423S/15*. O espectro foi coletado na região do UV distante, no intervalo de comprimento de onda de 200 a 260 nm para o tampão fosfato de sódio e de 205 a 260 nm para o tampão citrato de sódio, com resolução de 0,2 nm, utilizando uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 0,1 cm. A sensibilidade foi mantida em 100 miligraus e o tempo de resposta em 1 segundo. A desnaturação térmica foi realizada por meio do monitoramento a 215 nm da mudança de elipticidade em um gradiente de temperatura de 10 a 90 °C, com incremento de 5 °C a 1 °C.min⁻¹. O programa *Spectra Manager (JASCO)* foi utilizado para o registro dos dados. Os espectros de CD foram recuperados empregando-se uma média de 8 varreduras e foram filtrados com Transformada de Fourier, preservando as bandas típicas de cada um. Os espectros de CD podem ser obtidos em elipticidade (θ) e convenientemente convertidos para elipticidade molar ($[\theta]$), de acordo com a equação 5,. Os espectros dos tampões (referência) foram subtraídos das amostras.

$$[\theta] = \theta / Cl \quad (5)$$

Onde,

“C” é o valor da concentração da amostra;

“l” o caminho óptico;

3.8 Painel de substratos

Com o propósito de elucidar a especificidade da atividade catalítica da enzima, submetemos a AtGH12 purificada a uma reação frente a diferentes polissacarídeos: β -glicano, xiloglicano, xilano, AVICEL, CMC, 1,4- β -D-manana, arabinoxilano de centeio, xilano de madeira de faia, liquenano, galactonano, açúcar

de beterraba, arabinano, goma arábica e laminarina (adquiridos de *Megazyme* ou *Sigma Aldrich*). O meio reacional continha 100 μL sendo 5 μL da enzima, 50 μL a 0,5% de solução com oligossacarídeos e 45 μL de tampão da enzima. A hidrólise enzimática ocorreu por uma hora sob temperatura e pH ótimos da enzima (55 °C e pH 5,5) em termociclador *MyCycler* - *Bio-Rad*; posteriormente, os açúcares redutores foram evidenciados pelo método de DNS¹¹⁸ e mensurados no espectrofotômetro *Multiskan® Spectrum* - *Thermo Scientific* a 540 nm.

3.9 Temperatura e pH ótimos

A atividade catalítica das enzimas é especialmente sensível à mudanças no pH e na temperatura em que se encontram. As enzimas exibem uma faixa de pH e temperatura em que sua performance catalítica é máxima. Esses valores são denominados pH e temperatura ótimos da enzima e foram determinados para a AtGH12 purificada.

O sistema reacional consistia em 50 μL de solução 0,5% de β -glicano (β -glicano de cevada de baixa viscosidade - *Megazyme*), 5 μL de de AtGH12 0,15 mg.mL⁻¹ (*NanoDrop* 2000 - *Thermo Scientific*) em tampão 50 mM de citrato de sódio e 100 mM NaCl, pH 5,5 e 45 μL do tampão da enzima. O pH ótimo foi avaliado utilizando o tampão *Mcllvaine* com glicina dentro da faixa de pH de 2,0 a 9,0 variando a cada 0,5 unidade de pH). O sistema reacional foi incubado a temperatura de 50 °C por 30 minutos em termociclador *MyCycler* - *Bio-Rad* para que a hidrólise enzimática fosse conduzida.

Na identificação da temperatura ótima, foi utilizado o pH ótimo obtido anteriormente e efetuado a reação de catálise da AtGH12 sob temperaturas no intervalo de 20-80 °C variando a cada 5 °C.¹¹⁹ A quantificação dos açúcares redutores liberados foram analisados pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)¹¹⁸ adicionando ao meio reacional igual volume (100 μL) de DNS, o que cessa a reação catalítica, seguido de aquecimento a 100 °C por 5 minutos em termociclador *MyCycler* (*Bio-Rad*) para evidenciar os açúcares e ser lido pelo espectrofotômetro *Multiskan® Spectrum* - *Thermo Scientific* a 540 nm. As condições foram feitas em triplicata, os valores foram reportados em termos de atividade relativa. A atividade relativa de 100% foi estabelecida como sendo a condição que

apresentou maior absorbância. O desvio padrão de cada condição foi calculado e os erros relativos foram obtidos utilizando a teoria de propagação de erros.

3.10 Atividade catalítica em diferentes tampões

Com a finalidade de comparar o efeito da estabilidade térmica dos tampões utilizados no *Thermofluor* (tabela 5) com o efeito deles sobre a atividade da AtGH12, reagiu-se 50 μL de solução 0,5% de β -glicano (β -glicano de cevada de baixa viscosidade - *Megazyme*), 5 μL de de AtGH12 0,15 mg.mL^{-1} nos referidos tampões (tabela 5). O sistema reacional foi incubado a temperatura de 50 $^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos em termociclador *MyCycler* - *Bio-Rad* para que a hidrólise enzimática fosse conduzida. A quantificação dos açúcares redutores foi conduzida da mesma forma que está descrita no experimento de temperatura e pH ótimos.

3.11 Estabilidade térmica catalítica

Visando o potencial biotecnológico da AtGH12, foi investigado a estabilidade catalítica da enzima frente a diferentes intervalos de tempo (5 a 30 minutos) em diferentes temperaturas (45 a 75 $^{\circ}\text{C}$). Para isso, a enzima foi pré-incubada em tampão adicionando 5 μL de de AtGH12 0,15 mg.mL^{-1} (*NanoDrop 2000* - *Thermo Scientific*) e 45 μL do tampão da enzima (50 mM de citrato de sódio e 100 mM NaCl, pH 5,5) sob as temperaturas de 45, 55, 65 e 75 $^{\circ}\text{C}$ cada uma nos tempos de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos no termociclador *MyCycler* - *Bio-Rad*. Após período de tempo pré-determinado, adicionava-se ao meio 50 μL de solução de 0,5% de β -glicano (β -glicano de cevada de baixa viscosidade - *Megazyme*) e incubava à 55 $^{\circ}\text{C}$ no termociclador *MyCycler* - *Bio-Rad* por 30 minutos.

Os açúcares redutores foram mensurados pelo método DNS¹¹⁸ seguido de leitura no espectrofotômetro *Multiskan® Spectrum* - *Thermo Scientific* a 540 nm. Cada condição reacional foi feita em triplicata. A atividade relativa de 100% foi estabelecida como sendo a condição que resultou em maior absorbância. O desvio padrão de cada condição foi calculado e os erros relativos foram obtidos utilizando a teoria de propagação de erros.

3.12 Painele de aditivos

Afim de melhorar a performance catalítica da enzima e investigar o possível efeito inibitório de íons, foi analisado o comportamento da proteína frente a sua ação endoglicolítica sob a adição de compostos iônicos no sistema reacional. Os aditivos foram analisados na reação catalítica a uma concentração de 5mM e foram eles: KCl, ZnSO₄, FeCl₃, MgCl₂, MnCl₂, CoCl₂, CuSO₄, CaCl₂, CsCl, EDTA, sendo a solução estoque de 40 mM.

A reação enzimática era composta de 12,5 µL de aditivo, 33,5 µL de tampão (citrato de sódio pH 5,5 e 100 mM de NaCl), 4 µL de AtGH12 (0,05mg.mL⁻¹) e 50 µL de solução 0,5% de β-glicano (β-glicano de cevada de baixa viscosidade - *Megazyme*). Também foram analisados, na concentração de 0,5% em reação, o DMSO, *Tween*, *Triton*, sendo a solução estoque de 2%. Dessa vez, a reação enzimática era composta de 25 µL de aditivo, 21 µL de tampão (citrato de sódio pH 5,5 e 100 mM de NaCl), 4 µL de AtGH12 (0,05 mg.mL⁻¹) e 50 µL de solução 1% de β-glicano (β-glicano de cevada de baixa viscosidade – *Megazyme*). A reação foi mantida a 55 °C por 30 minutos no termociclador *MyCycler* - *Bio-Rad*. Os açúcares redutores foram mensurados pelo método DNS¹¹⁸ seguido de leitura no espectrofotômetro *Multiskan® Spectrum* - *Thermo Scientific* a 540 nm. A atividade relativa de 100% foi estabelecida como sendo a condição sem a adição de aditivo. O desvio padrão de cada condição foi calculado e os erros relativos foram obtidos utilizando a teoria de propagação de erros.

3.13 Espectrometria de massas do produto de hidrólise

A espectroscopia de massas do produto de hidrólise foi conduzida no encargo de possivelmente elucidar um mecanismo de clivagem da AtGH12. Os oligossacarídeos utilizados como substrato foram: celohexaose, celopentaose e celotetraose. O volume de 100 µL de reação de hidrólise consistia em 1 mM de substrato em tampão de 20 mM de acetato de amônio e 0,08 mg.mL⁻¹ de AtGH12. Os tempos de incubação foram de 10 e 30 minutos em *Termociclador MyCycler-BioRad* à 55 °C. Após atingido o tempo, a reação foi cessada mantendo-as no gelo.

Os produtos da reação de hidrólise foram analisados por espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (*MALDI-TOF MS*)¹²⁰.

Os produtos de reacção foram analisados por espectrometria de massa MALDI-TOF em modo de íon-positivo num *Microflex LT MALDI-TOF (Bruker Daltonics)*. As amostras foram suplementadas com NaCl a uma concentração final de 20 mM e misturou-se com ácido 2,5-di-hidroxibenzóico (10 mg.mL^{-1}) na proporção de 1:1 e colocadas na placa de análise do espectrofotômetro. Os espectros foram gerados por 300 disparos de laser a 60% de potência.

3.14 Hidrólise em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado e sinergismo

Com o intuito de avançarmos na caracterização bioquímica da *AtGH12*, avaliamos seu potencial de hidrólise diretamente na biomassa. Foi utilizado o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratados a partir da combinação de dois processos: hidrotérmico e organossolve que é atualmente um projeto desenvolvido no Grupo de Biotecnologia Molecular do IFSC-USP pela aluna de mestrado Melissa Espírito Santo.

O tratamento hidrotérmico foi realizado na temperatura de 160 °C e as amostras foram retiradas, após atingir a temperatura de 160 °C, nos tempos de 0, 30, 45 e 60 minutos. O reator utilizado foi a autoclave eletrônica (*Regmed*). Seguidamente, as amostras foram secas em estufa a 40 °C por 72 hs. O tratamento organossolve foi realizado em etanol 50% a temperatura de 190 °C, nos tempos de 50, 100 e 150 minutos em banho de glicerina (Marconi), empregando-se reatores fabricados pela oficina do Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP). Após os tratamentos, cada amostra foi filtrada em bomba a vácuo, sendo realizada a primeira lavagem com etanol absoluto e as restantes com água até pH neutro. Foi separado o filtrado e a parte sólida, sendo esta seca e seguidamente armazenada. O tratamento combinado desses dois processos foi realizado com a biomassa tratada hidrotérmicamente nos tempos de 30 e 60 minutos, seguida de tratamento organossolve nos tempos de 50, 100 e 150 minutos.

A amostra de biomassa pré-tratada escolhida foi baseada nos resultados pré-eliminatórios obtidos pela aluna frente à hidrólise daqueles com coquetel industrial, são eles: “hidro30/org100” (30 minutos de processo hidrotérmico seguido de 100 minutos com organossolve), “hidro30/org150” (30 minutos de processo hidrotérmico seguido de 150 minutos com organossolve), “hidro60/org100” (60 minutos de processo

hidrotérmico seguido de 100 minutos com organossolve), “hidro60/org150” (60 minutos de processo hidrotérmico seguido de 150 minutos com organossolve); “org100” (100 minutos de processo organossolve) e “org150 (150 minutos de processo organossolve)”. Além desses, também foi avaliado a hidrólise frente ao bagaço *in natura* (não tratado) e os bagaços pré-tratados com processo hidrotérmico nos tempos de 0, 30 e 60 minutos.

A principal característica do tratamento organossolve é contribuir para deslignização da amostra.¹²¹ O pré-tratamento organossolve é capaz de quebrar ligações tipo alfa-aril éter e arilglicerol-beta-aril éter (beta-O-4) na macromolécula de lignina, provocando uma mudança na estrutura da lignina, incluindo diminuição do número de seus grupos fenólicos e metoxil e diminuindo sua massa molecular.¹²² O tratamento hidrotérmico atua basicamente na retirada da hemicelulose.

A avaliação hidrolítica da AtGH12 foi verificada em 10 mg de bagaço e 10 µg de enzima nos volumes de 0,3 e 0,6 mL de tampão e fracionada em duas etapas: a primeira consistia de 24 horas de hidratação da biomassa com tampão citrato de sódio 50 mM e 200 mM de NaCl pH 5,5 nos volumes considerados sob a temperatura de 55 °C e agitação de 250 rpm; a segunda – a hidrólise em si, foi mantida por 18 horas em 55 a 250 rpm.

O experimento de sinergismo foi conduzido utilizando um coquetel enzimático comercial, *Accellerase®* (Acel) no volume de 300 µL com os mesmos parâmetros descritos acima. O experimento se compôs da reação de bagaço apenas com o coquetel, reação do bagaço apenas com a AtGH12 e reação do bagaço com o coquetel e a AtGH12 na mesma proporção. Com isso, o grau de sinergismo pode ser calculado segundo a equação 6.¹²³

$$\text{Grau de sinergismo} = \frac{\text{atividade combinada AtGH12/Acel}}{\text{atividade AtGH12+atividade Acel}} \quad (6)$$

A quantificação dos açúcares redutores liberados na solução foram analisados pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)¹¹⁸ adicionando ao meio reacional igual volume (100 µL) de DNS, o que cessa a reação catalítica, seguido de aquecimento a 100 °C por 5 minutos em termociclador *MyCycler (Bio-Rad)* para evidenciar os açúcares e ser lido pelo espectrofotômetro *Multiskan® Spectrum - Thermo Scientific* a 540 nm. Para cada condição foi feito um branco (sem adição de

enzima) e as medidas feitas em duplicada, exceto as condições com volume de reação igual a 0,3 mL. O resultado da absorbância (Abs) foi convertido em μmol de glicose equivalente (y) através de uma curva de calibração ($y=0,0049 \cdot \text{Abs}$; $r^2=0,99$), utilizando a glicose na reação com DNS.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Clonagem heteróloga da AtGH12

A sequência obtida no banco de dados *GenBank* (acesso **XP_001216041.1**) foi submetida ao servidor *SignalP 4.1*⁹⁴ para identificação do peptídeo sinal que sinaliza a maquinaria celular que a proteína será secretada no meio extracelular. A posição de clivagem foi localizada entre os aminoácidos 16 e 17 (figura 22)

Figura 22 - Resultado da análise da sequência de aminoácidos da AtGH12 submetida ao servidor SignalP 4.1.

Sítio de clivagem entre as posições 16 e 17

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em seguida, os possíveis sítios de glicosilação O- e N- ao longo da sequência da proteína madura foram questionados e analisados utilizando os servidores *NetNGlyc 1.0 Server*⁹⁶ e *NetOGlyc 4.0 Server*.⁹⁵ O servidor *NetOGlyc* não apontou sítios de glicosilação e o servidor *NetNGlyc* apontou um potencial de 0,53 na asparagina 153 (figura 23).

Figura 23 - Resultado da análise da AtGH12 submetida à NetNGlyc. A barra azul no gráfico indica o valor excedente (0,5386) ao limiar de 0,5 utilizado como parâmetro para indicar possível glicosilação N- ligada.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Segundo o servidor *NetNGlyc* é esperado que a proteína tenha baixa probabilidade de ter uma glicosilação N-ligada. A glicosilação N-ligada de proteínas promove o enovelamento das proteínas de três maneiras:

- promovendo intermediários de conformação mais solúveis, impedindo sua agregação;
- estabelecem um “glico-código” que marca a progressão do enovelamento e medeia a ligação com as biomoléculas que direcionam o transporte do RE (retículo endoplasmático) para o Golgi;

- iii. devido à flexibilidade limitada das cadeia de açúcares, ela tende a tornar uma glicoproteína mais resistente a digestão por proteases por limitar a aproximação de outras macromoléculas à superfície proteica;¹²⁴

Os oligonucleotídeos iniciadores desenhados baseado na sequência do gene que codifica para a proteína madura e os sítios de restrições *NotI* e *XbaI* (tabela 4) foram adicionados para posterior ligação ao vetor de clonagem pEXPYR (figura 17)⁹².

As etapas de amplificação do gene a partir do DNA genômico de *A. terreus* seguiram para a etapa de tratamento. As enzimas de restrições foram adicionadas ao produto de amplificação juntamente com o vetor de clonagem para a formação das extremidades coesivas, que, assim, puderam seguir para a etapa de ligação.

O fragmento que codifica para a enzima endoglucanase GH12 de *A. terreus* NHI2624 foi clonada no vetor e transformadas em células de *E. coli* TOP10 (*Invitrogen*) cálcio-competentes e o gel agarose 1% confirmou o resultado da amplificação do gene a partir da colônias transformadas com o vetor (figura 24). A banda correspondente ao gene foi identificada, cujo peso molecular é correspondente à 700 pb (figura 24).

Figura 24 - Gel de agarose 1% mostrando produto de PCR de colônia da endoglucanase GH 12 de *A. terreus* (AtGH12) amplificado a partir do DNA genômico. Primeira coluna: marcador de pares de base (1Kb)

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Expressão heteróloga

O vetor de expressão pEXPYR, quando integrado ao genoma do hospedeiro *Aspergillus sp* garante super expressão do gene induzido por maltose e secreção no meio extracelular de alto rendimento.⁹² Esse vetor tem demonstrado um resultado bastante satisfatório em termos de alto nível de expressão e integração de múltiplos genes em série, oferecendo tecnologia para construção de fábricas de coquetéis de enzimas dentro de células em um único hospedeiro.¹²⁵⁻¹²⁶

Figura 25 - Padrão gráfico utilizado pelo *Caliper LabChip* para representar a análise de proteínas contidas nas amostras do meio bruto de *A. nidulans* transformado com AtGH12.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O vetor foi transformado em cepas de *A. nidulans* A773 e o nível de expressão da proteína frente a transformação em *A. nidulans* A773 de 24 colônias transformadas positivamente foram escolhidas da placa e avaliada utilizando o equipamento *Caliper LabChip*. Por ele foi possível observar as colônias que estavam com boa expressão (figura 25). A cepa A7 foi selecionada e seu perfil de expressão pode ser comparado com o cultivo do *A. nidulans* A773 transformado com o vetor vazio (figura 26).

Apesar da capacidade em produzir proteínas recombinantes, a complexa biologia do *Aspergillus* e a maneira que ele secreta as proteínas heterólogas

permanecem pouco compreendidas e o desenvolvimento de sistemas de super-expressão e produção ainda estão em demanda.¹²⁷

Figura 26 - Gel SDS-PAGE confirmação da expressão de At_GH12. MW: Marcador molecular; 1: *A. nidulans* transformado com vetor vazio; 2: *A. nidulans* transformado com vetor contendo AtGH12.

Fonte: Elaborado pelo autor

O efeito da secreção de proteases nativas acionadas pelo aumento do pH do meio ou à exaustão das fontes de carbono¹²⁸⁻¹²⁹ é um problema quando se deseja estender o cultivo da cepa mutante por mais de dois dias.^{119,130} No entanto, o tamponamento do meio com HEPES, tem atrasado o efeito das proteases induzidas por aumento de pH em até 4 dias.⁹²

Assim, a otimização da expressão da cepa A7 foi realizada observando a expressão protéica por 2, 3 e 4 dias em meio tamponado com HEPES 200mM pH 6,5. Foi identificada através de gel de poliacrilamida que no 4º dia a quantidade da enzima era maior. Portanto, a cepa A7 cultivada por 4 dias em meio tamponado apresentava maior nível de proteína no extrato bruto comparado ao tempo de cultivo de 2 e 3 dias (figura 27). Isso pode indicar que o aumento na concentração de proteína foi devido ao acúmulo dela no meio e não a uma mudança/aumento no nível de expressão induzido por maltose. Embora o tamponamento com HEPES

evite, parcialmente, a ação de proteases nativa, foi possível obter maior rendimento após 4 dias em comparação ao menor tempo de cultivo.

Figura 27 - Gel SDS-PAGE mostrando a expressão por *A. nidulans* da AtGH12 em meio tamponado com HEPES ao longo do tempo de cultivo de 48h, 72h e 96h. MW: Marcador molecular

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Purificação

O meio de cultivo do *A. nidulans* transformado com o vetor como gene da AtGH12 foi filtrado com a ajuda de uma membrana *Miracloth™* (*EMD Chemicals*) para separar o micélio do extrato bruto do fungo. Esse extrato é concentrado através do sistema *Hollow Fiber Cartridge - 10 kDa* (*GE Healthcare*) de 100 a 500 mL para seguir a etapa de precipitação por sulfato de amônio, em que o sal é adicionado ao volume sob agitação até atingir saturação. Após isso, a solução foi incubada sob agitação em câmara fria *over night*. A próxima etapa foi centrifugar essa solução à 19.000 rpm, em que o sobrenadante foi descartado e o decantado foi ressuspenso em tampão de citrato de sódio pH 5,5 e novamente centrifugado a 19.000 rpm. Dessa vez, o sobrenadante foi recuperado e este foi utilizado na etapa de cromatografia de afinidade hidrofóbica no sistema *Akta*. Através de gel SDS-PAGE, as frações correspondentes ao pico cromatográfico foram concentrados através do

sistema *Amicon*® (*Millipore*) com corte de 10 kDa para concentrar e ser aplicado na coluna cromatografia por-exclusão molecular.

Figura 28 - A) Gel SDS-PAGE confirmando a purificação da AtGH12 por cromatografia de gel-exclusão. B) Padrão gráfico utilizado pelo *Caliper LabChip* para representar a análise de proteínas contidas nas frações da cromatografia de-exclusão molecular. MW representa as bandas do padrão de massa de proteína utilizado pela técnica; Retângulo azul destaca a banda referente à AtGH12.

Fonte: Elaborado pelo autor.

As frações cromatográficas foram analisadas com o equipamento *Caliper LabChip* para identificação do pico cromatográfico da AtGH12 (figura 28 B). Através de gel SDS-PAGE as frações puras correspondentes à AtGH12 pura (figura 28 A) foram separadas para posterior utilização nos ensaios bioquímicos e estruturais. A enzima AtGH12 pura foi empregada nos testes de pré-cristalização e posterior montagem das condições de cristalização para produção de cristais protéicos, no intuito de elucidar a estrutura tridimensional da enzima AtGH12.

4.4 Espectrometria de massa

A identificação de proteínas é um procedimento de grande relevância na abordagem proteômica. Um dos procedimentos utilizados para identificar proteínas sem que ela seja sequenciada é utilizar a impressão digital do mapa peptídico (*peptide mass fingerprint*). Esse método corresponde a uma clivagem enzimática *in*

vitro da proteína a ser analisada, seguida de uma análise espectrométrica dos peptídeos gerados.

A análise espectrométrica gera um lista da razão massa por carga (m/z) dos fragmentos, que é comparada contra um banco de dados teórico. Esse banco de dados é gerado *in silico* utilizando a sequência de proteínas depositadas em banco de sequências, uma vez que a clivagem enzimática obedece padrões de sequências de clivagem. Dessa forma, é possível fazer a identificação da proteína em questão contra um banco de dados contendo várias proteínas ou mesmo contra a própria sequência da enzima em estudo a fim de confirmar a expressão da mesma.¹³¹⁻¹³⁴

Figura 29 - Espectro dos fragmentos obtidos da AtGH12 digerida com tripsina e análise dos peptídeos identificados e confirmados contra a sequência de aminoácido traduzida da sequência depositada no *GenBank*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A identificação da banda correspondente à enzima endoglucanase AtGH12 foi feita por espectrometria de massas. A obtenção dos fragmentos foi obtida pela digestão por tripsina em gel SDS-PAGE¹⁰⁰ e os fragmentos foram identificados pelo espectrômetro de massas *Microflex LT MALDI-TOF (Bruker Daltonics)*. O programa *BioTools™* apontou uma cobertura de 41% entre o espectro obtido e a sequência da proteína em questão (figura 29). Três peptídeos foram encontrados e correspondem aos resíduos: 78-104, 89-104 e 202-225. Uma vez que 20% é o limiar de confiabilidade, podemos afirmar que a proteína AtGH12 foi identificada e confirmada por espectrometria de massas.

4.5 *ThermoFluor*

Os fatores altamente correlacionados com a probabilidade das proteínas formarem cristais que difratem são: homogeneidade da amostra de proteína, estabilidade e solubilidade.¹⁰¹ Dois dos componentes essenciais que permeiam os fatores acima citados e que controlam os eventos potencialmente direcionadores do crescimento do cristal são tampão e aditivos. Dessa forma, a técnica de *ThermoFluor* vem ao encontro da otimização desses componentes de forma rápida, eficiente e barata.

A fim de elucidar o comportamento da AtGH12 frente a diferentes tampões (tabela 5) e, com isso, utilizar esse tampão nos processos de purificação e caracterização e, montagem das condições de cristalização, subtemos uma amostra à técnica citada.

O gráfico representado na figura 30 mostra a análise obtida pelo *ThermoFluor*. As barras em verde indicam os tampões que aumentaram a T_m em 4 °C quando comparado com o valor obtido sem adição de tampão (barra indicada como “água” na figura 30). Isso demonstra que esses tampões asseguraram maior estabilidade estrutural da proteína conforme seu desenovelamento é influenciado pelo aumento de temperatura. Os tampões que exibiram esse perfil foram: citrato de sódio pH 5,5, fosfato de sódio com NaCl pH 6,5 e HEPES com NaCl pH 7,0.

De acordo com o gráfico da figura 30, quando analisamos o fosfato de sódio e o HEPES ambos sem adição de NaCl e depois ambos com adição de NaCl, os dados indicam que o NaCl em combinação com esses tampões tiveram um efeito sinérgico na estabilização da estrutura da AtGH12 fazendo com que o T_m aumentasse em 4 °C, alcançando os 58 °C atingidos também pelo citrato de sódio sem adição de NaCl. Outros tampões obtiveram efeito similar quando adicionados de NaCl e comparados ao seu T_m sem a adição do sal. Isso sugere que a adição de NaCl no tampão da proteína tem efeito sinérgico de estabilização por aumento da força iônica do meio tamponante.

É possível notar a mudança conformacional da proteína, T_m baixo, quando nos aproximamos de pHs muito baixos ou muito altos, indicando a ionização dos resíduos de aminoácidos, desestabilizando, conseqüentemente, a estrutura e expondo o cerne hidrofóbico da proteína.

Figura 30 - Gráfico obtido pela análise de ThermoFluor que mostra o T_m da AtGH12 frente a diferentes condições tamponantes. As barras em cor verde indicam as condições que proporcionaram maiores valores de T_m para a AtGH12.

Fonte: Elaborado pelo autor.

É válido destacar o fato que o tampão proporcione um ambiente local que mantenha a proteína estável e minimize as chances de agregação e precipitação por redução da flexibilidade conformacional. Assim, os tampões com maiores valores de T_m , tampões de estabilização, são competentes ao preservar a amostra de proteína de uma forma mais homogênea por mais tempo. Portanto, foi estabelecido o citrato de sódio 50 mM, NaCl 200 mM em pH 5,5 como tampão nas etapas de purificação e ensaios de caracterização.

Os tampões com maior valor para T_m obtidos para AtGH12 corresponderam aos mesmos tampões comumente obtidos pelo *ThermoFluor* para a maioria das proteínas da classe de hidrolases de glicosídeos, submetidos à técnica.¹⁰¹ Estes tampões, citrato de sódio, fosfato de sódio, HEPES, fosfato de potássio, frequentemente têm se observado o favorecimento do aumento da probabilidade de cristalização das proteínas. Com isso, esses tampões constituem um campo de investigação para a construção de condições de cristalização.

4.6 Estado oligomérico

4.6.1 Gel nativo

A eletroforese em gel-nativo foi utilizado para verificar a homogeneidade e o estado oligomérico da AtGH12 em solução e como uma forma de estimar da massa molecular e o raio de Stokes da proteína baseado no padrão de proteínas conhecidas (“MM” na figura 31).

Figura 31 - Digitalização do gel nativo. MM: massa molecular dos padrões de proteína. Em destaque, a banda referente à AtGH12.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na figura 31, podemos observar a presença de uma única banda no gel-nativo, isso indica que a AtGH12 está presente apenas no estado oligomérico referente a monômero (MM = 21 kDa, tabela 7), ou seja, a amostra está homogênea.

Com as características da corrida do padrão de proteínas no gel nativo é possível estimar a massa e o raio de Stokes da AtGH12. Para isso, na tabela 6, encontra-se os dados referentes a esse padrão disponível na literatura juntamente com os valores das distâncias (d) percorridas pelas proteínas no gel, onde a distância total de corrida, “D”, é o espaço entre a marca de aplicação das amostras no gel e o final da corrida equivale a 530 u.d. (unidades digitais). A forma de medida dessas distâncias foi feita em “u.d.” utilizando a imagem do gel acima (figura 31).

Tabela 6 - Parâmetros dos padrões de proteínas do gel nativo.

PADRÕES	MM (KDA)	R _H (Å)	D (U.D.)	D/D
Aldolase	140	43,0	222	0,42
Catalase	232	52,2	157	0,30
Tiroglobulina Bovina	669	85,0	29	0,05

Fonte: Elaborado pelo autor.

Com esses dados, foi possível construir a curva de calibração referente à massa molecular e ao raio de Stokes (figura 32) utilizando a distância percorrida no gel como variável independente.

Figura 32 - Curvas de calibração dos padrões de proteína do gel nativo.

$$\text{Log}(MM) = (2,926 \pm 0,009) - (1,87 \pm 0,03)\left(\frac{d}{D}\right)$$

$R^2 \sim 0,999$

Fonte: Elaborado pelo autor.

$$R_H = (27 \pm 3) - (44 \pm 4)\text{Log}\left(\frac{d}{D}\right)$$

$R^2 \sim 0,99$

Utilizando as equações mostradas na figura 32, foi possível estimar os valores da massa molecular (MM) e do raio de Stokes da AtGH12. Esses valores estão dispostos na tabela abaixo (tabela 7), onde é possível observar que a massa estimada a qual é bastante próxima a teórica.

Tabela 7 - Valores calculados para a AtGH12 a partir da calibração de eletroforese de gel nativo.

AtGH12	D/d	MM teórica*	MM estimada‡	Erro relativo#	R _h estimado‡
	0,86	24,3 kDa	(21 ± 2) kDa	14%	(29 ± 2) Å

* MASSA MOLECULAR CALCULADA A PARTIR DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO MONÔMERO

‡ VALORES CALCULADOS ATRAVÉS DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Razão entre a diferença da MM teórica e a MM estimada pela MM teórica

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados da tabela acima, sugerem que a AtGH12 está presente na solução na forma de monômero.

4.6.2 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

A figura 33 mostra a curva de espalhamento experimental da AtGH12 (a 0,8 mg.mL⁻¹ em 50 mM de citrato de sódio, 200 mM de NaCl em pH 5,5), os ajustes feitos pelo programa *Dammin*¹⁰⁹ e a curva de espalhamento de raios-X a baixo ângulo simulada para a estrutura homóloga de alta resolução. O modelo criado para a AtGH12 obteve um bom ajuste com a curva experimental de espalhamento (Discrepância χ 1,92).

Figura 33 - Curvas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo para AtGH12. Espalhamento experimental (círculos pretos), resultado do ajuste do programa Dammin¹⁰⁹ (linha verde) e curva simulada para o modelo de alta resolução do homólogo da AtGH12 (linha magenta). Na figura, encontra-se em anexo a região inicial da curva experimental a região de Guinier [$\ln(I(q)) \times q^2$], de onde pode ser extraído o R_g (raio de giro) experimental da AtGH12 pela aproximação de Guinier (equação 1). $R_g = (20 \pm 1) \text{Å}$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A curva de distribuição de distâncias foi gerada pelo método de Transformada Inversa de Fourier implementado no programa *Gnom*¹⁰⁷ juntamente com a $p(r)$ para a estrutura homóloga, PDB: 1KS4. Neste mesmo programa foram calculados os valores de R_g e $D_{\text{máx}}$. Comparando as duas curvas (figura 34), pode-se inferir que as distribuições de distâncias se aproximam ligeiramente, sugerindo que a proteína em solução apresentaria distâncias atômicas internas próximas a sua homóloga de alta resolução.

Figura 34 - Curva de distribuição de distâncias, para os dados experimentais de AtGH12 (linha preta) e simulada para o modelo de alta resolução (PDB: 1KS4) (linha vermelha).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Com a curva de espalhamento gerada é possível construir modelos *ab initio* do envelope da proteína pelo programa *Dammin*¹⁰⁹. A imagem obtida é uma média de 10 modelos (figura 35), alinhado pelo programa *SUPCOMB*¹⁰⁹ com o modelo de alta resolução tridimensional de mais alta identidade sequencial (PDB: 1KS4).

A tabela 8 resume os dados obtidos no experimento de SAXS. Adicionalmente, a linearidade do gráfico de Guinier indicou que a amostra é monodispersa, constituída principalmente por espécies monoméricas. Dessa maneira, ambos os resultados apontam para o estado oligomérico mais provável e prevalente da AtGH12 como sendo monomérico. O valor de R_g Guinier de 19,5 Å para uma GH12 de *Gloeophyllum trabeum* monomérica em solução e que possui massa molecular teórica de 26,1 kDa,¹³⁵ comparativamente, reafirma a hipótese de que AtGH12 também se apresenta sob o mesmo estado oligomérico (24,3 kDa e $R_g = 20$ Å para AtGH12).

Tabela 8 - Parâmetros estruturais da enzima AtGH12 obtidos por SAXS

	Experimental	DAM [‡]	PDB
R _G (Å)	(19,82±1,32) (Guinier)	(18,92±0,02)	(16,32±0,04)
D _{MÁX} (Å)	53,09		48,57
X	--	1,92	3,80
Resolução [€] (Å)	19,11	--	--

[‡]DAM, parâmetros do modelo de átomoms *Dummy* calculado no programa *DAMMIN*

[€]Resolução: $2\pi/q_{\text{máx}}$

Fonte: Elaborado pelo autor.

Por fim, o modelo *ab initio* do envelope molecular da AtGH12 sobreposto ao modelo de alta resolução da proteína homóloga (figura 35) corrobora visualmente, para o apontamento da existência de uma única subunidade proteica.

Figura 35 - (A) Modelo *ab initio* para o envelope molecular da AtGH12 e (B) o envelope alinhado com a estrutura de alta resolução (PDB: 1KS4) de sua homóloga no programa *SUPCOMB*.¹⁰⁹ As diferentes imagens são geradas por rotação da anterior de 180° em relação ao plano do papel.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6.3 Espalhamento de luz dinâmica (DLS)

Os dados de DLS vêm ao encontro dos resultados obtidos com gel nativo e SAXS ao indicarem que a AtGH12 se apresenta na forma monomérica e monodispersa (pico com maior porcentagem em massa na amostra e de menor diâmetro efetivo) em solução para as concentrações de 0,2 e 0,5 mg.mL⁻¹ em qualquer das condições tamponantes investigadas (tabela 9). Isso aponta que nenhum dos tampões influenciou no estado oligomérico mais predominante da proteína, portanto, nem na medida. Os dados também apontam a presença de outras espécies em solução, no entanto, em porcentagem de massa, elas não são relevantes.

O valor de saída do DLS referente à massa molecular estimada se encontra na faixa de 20-30 kDa o que engloba a massa teórica da AtGH12 de 24,3 kDa e condiz com a determinada através do experimento de gel nativo: (21 ± 2) kDa. O raio hidrodinâmico (raio de Stokes) em torno de 2,5 nm (25 Å) sustenta o estimado pelo gel nativo: (29 ± 2) Å.

Tabela 9 - Distribuição dos resultados de espalhamento de luz dinâmico (DLS).

	Amostra (mg.mL ⁻¹)	Picos	Raio Stokes (nm)	%Pd	Massa Molecular estimada (kDa)*	%Massa	Dispersividade do pico
50 mM citrato de sódio, 200 mM NaCl em pH 5,5	1,0	pico 1	(14±2) e+1	17,2	(33±6) e+4	100,0	Monodisperso
	0,5	pico 1	2,2±0,1	5,9	21±3	100,0	Monodisperso
		pico 2	(11±2) e+1	15	(23±1) e+4	0,0	Monodisperso
	0,2	pico 1	2,6±0,2	8,8	28±8	99,8	Monodisperso
		pico 2	19±2	11,5	(3,6±0,3) e+3	0,2	Monodisperso
		pico 3	(2±3) e+1	25,4	(20±2) e+4	0,0	Polidisperso
50 mM citrato de sódio, 90 mM NaCl em pH 5,5	0,5	pico 1	2,3±0,2	8,9	23±5	99,8	Monodisperso
		pico 2	19±2	12,2	(3,2±0,2) e+3	0,2	Monodisperso
		pico 3	(2±3) e+1	22,8	(22±3)e+4	0,0	Polidisperso
	0,2	pico 1	2,5±0,2	8,8	30±8	100,0	Monodisperso
		pico 2	(10±3) e+1	26,9	(16±1) e+4	0,0	Polidisperso

* Fornecido pelo programa *Zetasizer 6.20 - Malvern Instruments*: cálculo usando calibração de massa empírica vs. tamanho da curva.

Fonte: Elaborado pelo autor

É observável que a medida de DLS na concentração de 1,0 mg.mL⁻¹ indicou a existência de uma única espécie em solução de alta massa molecular e de diâmetro efetivo. Isto sugere que a proteína atingiu o estado de saturação e se apresenta na

forma de agregado. Assim, a concentração da proteína em solução é um limitante e indica a inviabilidade de ensaios cristalográficos com a AtGH12, uma vez que, para este, é necessária alta concentração de proteína.¹³⁶⁻¹³⁷

O valor obtido para o raio de giro (R_g) em SAXS e os valores para o raio hidrodinâmico ou de Stokes (R_h) obtidos por gel nativo e DLS mostram que o R_g é menor do que o R_h . Isso se observa devido ao fenômeno como ilustrado na figura 36. Portanto, os experimentos corroboram entre si e sustentam o estado monomérico, monodisperso e enovelada da AtGH12 em solução.

Figura 36 - Comparação entre o raio de giro (R_g) e raio hidrodinâmico ou de Stokes (R_h) para uma cadeia polimérica enovelada (esquerda) e para uma estendida (direita).

Fonte: MERTINS¹³⁸

4.7 Espectro de Dicroísmo Circular (CD) de desnaturação térmica

Além de assegurar o enovelamento estrutural de predominância de folhas- β características de enzimas da Família 12 (CAZy), o ensaio de CD foi conduzido com o propósito de fortalecer os experimentos de *ThermoFluor*.

Os gráficos das figuras 37 e 38 mostram o espectro de CD da AtGH12 e, através do mesmo, é possível notar a predominância de estrutura secundária referente à folhas- β (mínimo em 215 nm), além de certificar o correto enovelamento da enzima AtGH12. A diferença entre os espectros se deu devido à diferença entre os tampões (citrato e fosfato). O maior problema surge no intervalo de pH entre 4 e 6, uma vez que a maior parte dos tampões nesta região são baseados na ionização dos grupos ácidos carboxílicos (por exemplo, ácido etanóico, ácido acético, ácido, ácido cítrico), que absorvem fortemente a 200 nm.¹¹⁷ No entanto, era interessante

verificar o comportamento do ponto de vista de desenovelamento estrutural no tampão citrato para efeito de comparação com o experimento de *ThermoFluor*.

Figura 37 - Espectro de CD de desnaturação térmica da AtGH12 em tampão citrato de sódio pH 5,5. Por razão de clareza, foi mostrado apenas algumas temperatura

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 38 - Espectro de CD de desnaturação térmica da AtGH12 em tampão fosfato de sódio pH 6,5. Por razão de clareza, foi mostrado apenas algumas temperatura

Fonte: Elaborado pelo autor.

Dessa forma, o gráfico da figura 39 mostra o comportamento da elipticidade em função da temperatura nos dois tampões investigados. Por ele, observa-se que a temperatura de transição entre o estado enovelado e desenovelado (T_m) foram adjacentes e se aproximam do T_m de 58 °C apontado pelo *ThermoFluor* nos dois tampões. O perfil tipo sigmoide do tampão citrato pH 5,5 foi mais súbito para variações de temperatura em torno de T_m . Ambos os espectros de CD mostram o comportamento cooperativo de perda de estrutura secundária.²³

Todos os valores de T_m determinados por ambos os experimentos, se comparado com o ensaio de temperatura ótima (figura 41) e de estabilidade térmica catalítica (figura 43), mostram que são próximas e isso leva a indagar a respeito da atividade ótima numa temperatura em que a estrutura proteica começa a se desestabilizar. No entanto, deve se considerar que para o ensaio de atividade, a concentração de enzima é, aproximadamente, uma ordem de grandeza menor, além do fato de que, em reação, a presença de substrato pode refletir no aumento da estabilidade estrutural.

Figura 39 - Perfil de desnaturação térmica da AtGH12 monitorado em 215 nm em dois tampões diferentes.

Fonte: Elaborado pelo autor

Em termos de comparação, o valor de T_m monitorado por CD da AtGH12 (60,7 °C para tampão citrato e 61,6 °C para fosfato) se encontra dentro das temperatura de outras Cel12A já reportadas – 54,4 °C para *T. reesei*, 60,2 °C para *Gloeophyllum trabeum*¹³⁵ e 68,7 °C para *Humicola grisea* (a mais alta já reportada para essa família).¹³⁹

4.8 Painel de substratos

A especificidade catalítica da AtGH12 frente a reação de hidrólise de diferentes polissacarídeos foi investigada e os resultados em termos de atividade relativa encontram-se na tabela 10. Por ela pode-se confirmar a predição de domínio da hidrolase de glicosídeo da família 12 (pfam01670) observando a atividade em β -glucano, assim como atividade em xilano.

No entanto, a enzima tem atividade relativa de apenas 2,7% para substrato xiloglicano, quando comparado aos 22,9% e 14,1% de atividade relativa em xilano de madeira de faia e xilano, respectivamente. O xiloglicano possui cadeia

principal de glicoses unidas por ligação β -1,4 glicosídicas com substituição de xilose nas cadeias laterais. Dessa forma, podemos sugerir que, em detrimento da baixa especificidade da AtGH12 com a xiloglicano, a xilose das ramificações desempenha o papel de proteger o cerne do glicano do xiloglicano

Tabela 10 - Paineis de substratos da AtGH12

Substrato	Atividade relativa (%)
B-glicano	100,0
Xilano de madeira de faia	22,9
Xilano	14,1
Liquenano	12,3
1,4-β-d-manana	11,8
Laminarina	11,8
Arabinogalactano	6,8
Cmc	6,7
Goma arábica	5,4
Arabinoxilano de centeio	3,7
Xiloglicano	2,7
Arabinano	2,5
Galactonano	0,5
Avicel	0,0
Açúcar de beterraba	0,0

Fonte: Elaborado pelo autor.

Já a cadeia principal do xilano é composta por unidades de β -D-xilopiranosose unidas por ligação 1-4 glicosídica de onde partem ramificações que podem apresentar arabinose, glicose, galactose e glicorunato unidos no carbono três de um resíduo de xilose o que pode servir de substrato para a AtGH12 e explicar a diferença nas atividades observadas entre xiloglicano, xilano de madeira de faia e xilano (tabela 10).

A baixa atividade em CMC (celulose metilada) indica que a metilação também bloqueia a atividade catalítica da enzima, diferentemente de endoglucanases Cel12A de *Gloeophyllum trabeum*¹⁴⁰, *Trichoderma reesei*¹⁴¹⁻¹⁴² e *Bacillus Licheniformis*¹⁴³

que mostram alta atividade em CMC. Tudo isso demonstra que as enzimas pertencentes à família GH12 exibem significativa especificidade a inúmeros substratos.⁷⁵

Estudos têm apontado que o pré-tratamento da biomassa com xilanases melhora a atividade de β -glicanases pois aumenta a acessibilidade ao substrato.¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ Dessa forma, esse resultado aponta para uma relevância biotecnológica e industrial da AtGH12, haja vista que ela apresenta atividade contra xilano, principal componente da hemicelulose e β -glicano, que é o constituinte da celulose. Também, considerando a natureza dos polissacarídeos testados e a atividade ainda mensurada da AtGH12 frente a eles, a AtGH12 se torna um alvo bastante interessante para a investigação da especificidade enzimática, uma vez que a GH12 por exemplo, de *Fomitopsis palustris*¹⁴⁷ e de *Stachybotrys atra*⁷⁵ não apresentam atividade em xilanos.

Até o momento existem poucas estruturas de GH12 resolvidas e caracterizadas bioquimicamente, assim, se torna difícil fazer generalizações sobre os componentes determinantes da especificidade ao substrato. No entanto, uma vez conseguido dados de conformação tridimensional de várias dessas enzimas, será possível explorar esses contrastes de forma mais robusta e concatenada através de estudos de alinhamento de sequência,⁷⁸ mutação sítio dirigida¹⁴⁸ e sobreposição estrutural.^{77,149}

4.9 Temperatura e pH ótimos

A eficiência catalítica da enzima é intimamente influenciada pelo pH e temperatura na qual se dá o encontro efetivo entre ela e o substrato. Desse modo, é esperado encontrar uma curva de pH onde se exiba a máxima conversão enzimática do substrato em produto. Ao comprovar experimentalmente a influência do pH e da temperatura na catálise enzimática da AtGH12, os gráficos obtidos indicam um pH e temperatura ótimos.

Para a curva de pH, o máximo de atividade enzimática foi observado em pH 5,5 (figura 40) e corrobora o resultado encontrado na análise de tampões do ThermoFluor (figura 30), em que o maior valor de T_m (58 °C) para o tampão livre de NaCl (citrato de sódio) foi o pH de 5,5. Na curva de temperatura, a enzima apresentou um perfil catalítico superior em 55 °C (figura 41). Dessa forma, é

esperado que o efeito sinérgico de pH e temperatura ótimos garantam à reação enzimática maior eficiência catalítica.

Figura 40-Efeito do pH na atividade enzimática da AtGH12.

Fonte: Elaborado pelo autor.

As endoglucanases da família 12 exibem perfil de pH ótimo variável, como, por exemplo: enquanto a GH12 de *Fomitopsis palustris* exibe uma atividade ótima em pH 3,5¹⁴⁷, a GH12 de *Humicola grisea* tem seu pH ótimo de 5,5.⁷⁹ Já as endoglucanases de rúmen de bovinos tem o pH ótimo por volta de 7,0.¹⁵⁰ A atividade da AtGH12 quando o pH aumenta ou diminui em uma unidade cai para valores próximos a 50%. Isso sugere que AtGH12 é influenciada pela mudança de pH e, segundo estudos, as GH12 quando são fortemente sensíveis à mudança de pH indicam que são mais ativas do que as que exibem perfis menos influenciáveis pela variação deste.¹⁵¹

Figura 41 - Efeito da temperatura na atividade enzimática da AtGH12.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.10 Atividade catalítica em diferentes tampões

Como forma de avaliar se o tampão que garante maior estabilidade térmica (*ThermoFluor*) também permite maior atividade enzimática, foram testados os mesmos tampões (tabela 5) frente a reação de hidrólise do β -glicano pela AtGH12. O resultado está na figura 42 e o que se observa é que no *ThermoFluor* a estabilidade térmica se perde para pH acima de 9,5 para os tampões sem sal. Valores de pH menores que 9,5, a proteína ainda exibe T_m acima de 50 °C em comparação ao T_m de 58 °C dos melhores tampões. Isso não se observa na atividade catalítica, onde para pHs acima de 7,5 diminui a catálise enzimática.

Concorda-se que a faixa de pH próximo de 5,5 condiz com o pH ótimo da enzima e, olhando especificamente para o tampão citrato de sódio com adição de NaCl, observa-se que este foi uma boa escolha para desenvolver os experimentos de atividade enzimática. O apontamento de tampões pelo *ThermoFluor* que mais estabilizam a enzima na faixa de pH 6,5 e 7,0 com adição de sal (Fosfato de sódio

em pH 6,5 e HEPES em pH 7,0) produzem também uma atividade catalítica considerável, embora não estejam no pH ótimo da enzima, que é em tampão citrato de sódio com NaCl.

Figura 42 - Atividade catalítica da AtGH12 nos tampões do *ThermoFluor*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.11 Estabilidade térmica catalítica

Sob o ponto de vista de um coquetel enzimático para a administração em biorreatores com o intuito de se obter sacarídeos simples, é importante observarmos a atividade enzimática frente ao estresse de temperatura por determinados períodos de tempo. Dessa forma, submetemos a AtGH12 a temperaturas que variavam de 45 à 75 °C em intervalos de tempos de 5 à 30 minutos (figura 43).

Para as temperaturas a baixo de 65 °C a enzima manteve a atividade próxima do seu máximo em todo o intervalo de tempo analisado. Isso demonstra que a enzima é capaz de se manter ativa numa faixa de temperatura ampla e por um bom período de tempo. Quando se analisa a temperatura de 65 °C é percebido um ligeiro decréscimo com o passar do tempo e a 75 °C nos primeiros 5 minutos a enzima já desnatura perdendo seu poder catalítico.

Existe grande incentivo do mercado de enzimas para pesquisas de novas celulasas com característica adequadas para a aplicação em processos industriais¹⁵² ou que após identificadas possam ser modificadas para obterem os parâmetros bioquímicos que se adaptem as condições desejadas.¹⁵³ A AtGH12, por manter sua atividade ao longo do tempo em um amplo intervalo de temperatura (figura 43), pode servir como objeto de estudo para modificações estruturais visando o seu próprio melhoramento ou de outras GH12s.

Figura 43 - Efeito da estabilidade térmica frente a reação catalisada pela AtGH12.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Observando os valores de T_m da AtGH12, em 65 °C a enzima já possui desestabilização estrutural considerável, o que, certamente, implicaria em perda de função. No entanto, esse experimento sugere que a AtGH12 é capaz de se renovar e, assim, voltar a ser ativa novamente em sua temperatura ótima.

4.12 Painel de aditivos

Diante da proposta de sacarificação do material lignocelulósico, é importante analisarmos as possíveis influências sobre a atividade das enzimas que catalisam as reações necessárias para a produção de açúcares fermentescíveis, devido à

complexidade e diversidade química da matéria-prima. Dessa maneira, foi verificado a influência de alguns solventes orgânicos, íons metálicos, detergentes e agentes quelantes frente a atividade catalítica da AtGH12. Os valores de atividade relativa à condição reacional sem aditivo estão reportados na tabela 11. A concentração reacional dos aditivos foi mantida a mesma para efeitos de comparação e, dessa forma, identificar os aditivos que tiveram resultado supressor ou potencializador da catálise enzimática.

Alguns metais funcionaram como inibidores da atividade enzimática por desempenhar papel um desnaturante levando à desestabilização da estrutura tridimensional da enzima, ou por se ligarem a grupos funcionais do sítio ativo - metais pesados possuem a capacidade de se ligarem aos grupamentos sulfidrilas de cisteínas.¹⁵⁴

Tabela 11 - Efeito potencializador ou supressor da atividade enzimática

Aditivos	Atividade relativa (%)
MnCl₂ (5 mM)	184,8
CaCl₂ (5 mM)	110,8
FeCl₃ (5 mM)	109,0
Sem aditivo	100,0
ZnSO₄ (5 mM)	94,8
CsCl (5 mM)	89,9
KCl (5 mM)	88,7
MgCl₂ (5 mM)	87,4
CuSO₄ (5 mM)	86,1
DMSO (0,5%)	84,5
Tween (0,5%)	75,5
EDTA (5 mM)	73,2
CoCl₂ (5 mM)	66,4
Triton (0,5%)	61,6

Fonte: Elaborado pelo autor.

No painel de aditivos (tabela 11), pode-se perceber a relação entre o aumento da atividade enzimática e a adição de íons divalentes (Mn⁺², Ca⁺², Zn⁺²) de raio

atômico médio (4ª camada da tabela periódica), que é reforçada pelo fato de que agentes quelantes (EDTA) desfavorece a atividade catalítica. Isso sugere que os íons interagem com os resíduos de aminoácidos e ocupem certas regiões da enzima que potencializa a hidrólise catalisada através de diversos motivos, como:

- i. coordenação dos grupos funcionais na reação catalisada. Ao atuarem individualmente ou em grupo, estes íons podem proporcionar a geometria do estado de transição. Do mesmo modo, eles podem ajudar a alinhar o nucleófilo com os reagentes, reduzindo assim os obstáculos entrópicos da reação.¹⁵⁵⁻¹⁵⁸
- ii. correto direcionamento do substrato aos resíduos catalíticos do sítio ativo devido à diminuição das possibilidades de interação intermolecular entre o substrato e os resíduos responsáveis pela catálise;
- iii. mudança do pKa e da reatividade das cadeias laterais de aminoácidos adjacentes que participam diretamente da catálise.¹⁵⁹⁻¹⁶⁰ Assim, através de efeitos eletrostáticos, íons metálicos podem desempenhar um papel essencial na catálise sem interagir diretamente com qualquer dos aminoácidos no sítio ativo;^{155,161}
- iv. redução da flexibilidade e posicionamento de alças que participem da reação ou da interação enzima/substrato;
- v. convergência dos graus de liberdade da interação para os resíduos potencialmente catalíticos.

Por outro lado, aditivos tensioativos como o *Tween* e *Triton*, contribuem desfavorecendo a catálise. Isso pode significar que as regiões hidrofóbicas da enzima são importantes para a interação enzima-substrato. A ação surfactante desses aditivos aumenta a porção de enzima solúvel em detrimento da adsorvida sobre o polímero de β -glicano o que prejudica a catálise enzimática. Também, pode ocorrer o bloqueio do acesso ao sítio ativo pelo substrato através da tendência de formação das micelas. Portanto, isso propõe uma natureza hidrofóbica à enzima que é inerente a sua capacidade catalítica de hidrolisar polímeros de β -glicanos.

4.13 Espectroscopia de massas do produto de hidrólise da AtGH12

A espectroscopia de massas do produto de hidrólise revelou os oligossacarídeos liberados durante a atividade endocatalítica da AtGH12 (figuras de 44-46 e 48), que serviu de análise a respeito do mecanismo de reconhecimento e clivagem dos substratos.

Figura 44 - Espectro de massas do produto de hidrólise da AtGH12 com diferentes oligossacarídeos. No eixo das abscissas é representada a razão massa carga (m/z) e nas ordenadas a intensidade em a.u. (do inglês *arbitrary unit*). Estrela majenta: celotriose; estrela verde: celotetraose. Espectros de cima para baixo: padrão enzima, celohexaose, reação em celohexaose, padrão celopentaose, reação em celopentaose, padrão celotetraose, reação em celotetraose.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na figura 44 encontra-se os espectros da hidrólise dos oligossacarídeos testados e nas figuras 45 e 46 foram destacados os picos de celotriose e da celobiose que não foram indicados na figura do espectro todo (figura 44) por estar fora de escala – a glicose não rende uma quantidade considerável de íons em um experimento *MALDI-TOF MS*.

Figura 45 - Detalhe do espectro de massas da celotriose presente no hidrolisado de diferentes oligossacarídeos. No eixo das abcissas é representada a razão massa/carga (m/z) e nas ordenadas a intensidade em a.u. Espectros de cima para baixo: padrão enzima, celohexaose, reação em celohexaose, padrão celopentaose, reação em celopentaose, padrão celotetraose, reação em celotetraose.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 46 - Detalhe do espectro de massas da celobiose presente no hidrolisado de diferentes oligossacarídeos. No eixo das abcissas é representada a razão massa/carga (m/z) e nas ordenadas a intensidade em a.u.

Fonte: Elaborado pelo autor.

As análises dos espectros dos gráficos sugerem que:

- A AtGH12 é uma endoglucanase, uma vez que é possível observar no espectro de reação da celohexaose o surgimento de celotetraose, celotriose e celobiose;
- A menor unidade hidrolisada é a celobiose. Tendo em vista a especificidade deste tipo de enzima (endoglucanase);¹⁶²
- No espectro de reação com a celopentaose aparecem os espectros referentes à celobiose e celotriose (figuras 45 e 46), o que sugere a atividade de hidrólise vinculando o substrato nos sítios de -3 até +2 (figura 47) tal como mostram os dados cristalográficos de Cel5A de *Bacillus agaradhaerens*¹⁶³ na presença de celopentaose. No entanto, também observamos nesse mesmo espectro a presença do pico

referente à celotetraose, mas endoglucanases não deveriam ser capazes de hidrolisar celopentaose em celotetraose.^{79,162} Isso pode sugerir que a AtGH12 possui atividade de transglicosilação. Essa reação produz substratos com maiores dimensões que podem, concomitantemente, serem hidrolisados. Dessa forma, se pode explicar o espectro da celotetraose observado e, também, dos outros picos. A transglicosilação é frequentemente observada em hidrolases de glicosídeos com mecanismo de retenção, incluindo a Cel12A de *Humicola*^{79,162}, Cel12 de *Pyrococcus furiosus*¹⁶⁴ e *Thermotoga neapolitana*¹⁶⁵ e, também, de uma endo- β -1,4-glicanase de *Tricoderma reesei*¹⁶⁶.

Figura 47 - Diagrama de representação em fitas da estrutura cristalográfica da Cel12A de *H. grisea* em complexo com um celohexamero (cor dourada), que se estende do sítio -4 até +2. Sítios de ligação ao substrato: -4, -3 e -2; o sítio ativo: -1 e sítios do produto: +1 e +2.

Fonte: SANDGREN⁷⁹

- O espectro de reação da celotetraose não identifica picos referentes a possível hidrólise, nem mesmo que ocorreu reação a de transglicosilação. Assim, a celotetraose não é um substrato para reação de hidrólise¹⁶² e sugere que também não o é, caso exista, o de transglicosilação. A partir do pressuposto de que a reação de transglicosilação não ocorra apenas na presença de celotetraose devido à falta de substrato para a reação de ligação, o gráfico da figura 48 mostra o espectro de celohexaose no tempo de 10 e 30 minutos. Por ele, pode-se observar a não existência de pico para a celopentaose e que a celotetraose não é hidrolisável e pode não ser um substrato para a transglicosilação. Mais experimentos são necessários, como a cromatografia de troca iônica de alta performance e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) da reação com celopentaose e celotetraose em diferentes tempos de incubação.⁷⁹

Figura 48 - Espectro de massas do hidrolisado da AtGH12 com celohexaose nos tempos de 10 e 30 minutos. Em destaque, os picos referentes à celotetraose e celotriose. No eixo das abcissas é representada a razão massa carga (m/z) e nas ordenadas a intensidade em a.u. Espectros de cima para baixo: padrão enzima, celohexaose, 10 min. reação em celohexaose, 30 min. reação em celohexaose.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.14 Hidrólise em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratados e sinergismo

Como mais uma caracterização bioquímica, avaliamos a atividade de hidrólise da AtGH12 frente à biomassa. Como biomassa, foi escolhida o bagaço de cana-de-açúcar, que é um excedente industrial das usinas sucro-alcooleiras, em que reside um dos interesses biotecnológicos para a produção de etanol de segunda geração. Uma vez que as etapas de pré-tratamento são limitantes para uma maior sacarificação da matéria ligninocelulósica, utilizamos, para esta abordagem, o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado através de dois processos combinados: hidrotérmico e organossolve. Esse material foi gentilmente cedido pela aluna de mestrado Melissa Espírito Santo do Grupo de Biotecnologia Molecular do IFSC-USP.

Após a etapa de hidratação, o perfil hidrolítico frente aos diferentes pré-tratamentos da AtGH12 foi graficado como ilustrado na figura 49.

Figura 49 - Valores em μMol de glicose equivalente da hidrólise em bagaço de cana-de-açúcar pré tratado utilizando os métodos hidrotérmico e organossolve.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Pelo gráfico (figura 49), podemos inferir que o tratamento hidrotérmico aumenta o rendimento catalítico da AtGH12 (“h0”, “h30” e “h60”), mas ele é

relativamente pouco influente na atividade da enzima. No entanto, quanto maior o tempo de tratamento organossolve pior é para a atividade enzimática (“o100” e “o150”). Todavia, se o tratamento hidrotérmico está combinado com o organossolve (“h30/o150 e h60/o150”), ele contribui para o aumento da hidrólise da AtGH12. O tratamento hidrotérmico atua basicamente na retirada da hemicelulose presente na fração líquida, enquanto que na fração sólida permanecem a lignina e a celulose.

O processo organossolve é capaz de clivar as ligações tipo alfa-aril éter e arilglicerol-beta-aril éter (beta-O-4) na macromolécula de lignina, provocando uma mudança na estrutura, incluindo diminuição do número de seus grupos fenólicos e metoxil e diminuindo sua massa molecular,¹²² isso denota que um maior tempo de reação do pré-tratamento produz maior número de moléculas solúveis de ligninas modificadas, que são capazes de adsorver a estrutura da celulose e hemicelulose que permanecem e, desta forma, podem influenciar de maneira mais acentuada que o tratamento em si na reação de hidrólise com a AtGH12.

Tal fato pode ser observado quando se compara os perfis de atividade nos dois volumes considerados. Para o *in natura*, observamos que o volume de 600 µL apresentou maior quantidade de açúcar redutor, o que não se observa para as outras reações, onde a concentração de enzima na reação com 300 µL é maior. A reação *in natura* está em desacordo com esse fato. Portanto, a atividade da AtGH12 em bagaço *in natura* não pode ser considerada pois pode apresentar adsorção de sacarose proveniente do processo de moagem da cana, além de apresentar um aspecto heterogêneo das fibras em contraste com a homogeneidade das fibras dos bagaços pré-tratamentos.

Em comparação, o processo “o100” foi o melhor pré-tratamento. Simplificando e idealizando, a diferença dos pré-tratamentos reside no fato de que no tratamento hidrotérmico não há hemicelulose e no organossolve não há lignina; o tratamento organossolve deixa a matriz celulosica mais porosa também. Desse modo, se explica um maior produto de hidrólise enzimática da AtGH12 no bagaço pré-tratado pelo método organossolve – lembrando, também, que a enzima possui atividade em xilano de madeira de faia (tabela 10), que é o maior componente da hemicelulose da parede celular das plantas e que permanece após pré-tratamento organossolve.¹²¹

Figura 50 - Gráfico de barras indica a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar em equivalentes de glicose nos diferentes pré-tratamentos no tempo de 20 horas. Em azul, a hidrólise da AtGH12; em laranja, o coquetel Acellerase®; em cinza, a soma das hidrólises separadas; em amarelo, a hidrólise sinérgica AtGH12 junto com Acellerase®.

Fonte: Elaborado pelo autor.

De forma complementar, o gráfico acima (figura 50) mostra a produção de glicose em μmol pela AtGH12 e o coquetel Acel (*Acellerase*®) nos diferente pré-

tratamentos indicados. A tabela 12 resume os valores do grau de sinergismo calculados a partir da equação 6.

Tabela 12 - Valores do grau de sinergismo.

Grau de	<i>in natura</i>	h30	o150	h30/o150
sinergismo	1,0	1,2	1,1	1,0

Fonte: Elaborado pelo autor.

Uma vez que o grau de sinergismo foi maior que uma unidade para os pré-tratamentos “h30” e “o150”, pode-se inferir que houve sinergia na combinação da AtGH12 com o coquetel comercial *Acellerase*® apenas nessas condições. Em destaque, aponta-se a sinergia da AtGH12 com o coquetel no bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com o método hidrotérmico de 30 minutos (“h30”), uma vez que esse processo é bem mais barato e menos eficiente que o organossolve. Esse resultado adiciona a AtGH12 uma interessante característica.

5 CONCLUSÕES

O gene correspondente à AtGH12 foi corretamente clonado e expresso heterologamente no fungo filamentoso *Aspergillus nidulans* linhagem A773 e confirmado por diversos experimentos.

As características enzimáticas de atividade foram estabelecidas, juntamente com os supressores e potencializadores. A característica catalítica da endoglucanase da família 12, foi comprovada frente ao seu produto de hidrólise de oligossacarídeos. Em uma situação mais realista, a enzima AtGH12 apresentou atividade contra a biomassa complexa de bagaço-de-cana de açúcar pré-tratada, além de apresentar sinergia quando atuando na presença de um coquetel enzimático comercial.

Ao que se refere à estrutura, a AtGH12 está enovelada em solução e possui conteúdo de estrutura secundária predominante de folhas- β , o que coincide com as enzimas da família GH12. O estado oligomérico da AtGH12 em solução é majoritariamente, de monômero. O estado de agregação observado à 1,0 mg.mL⁻¹ da AtGH12 sugere a inviabilização de testes de cristalização.

A AtGH12 mostrou-se estável com valores de T_m entre 58 °C e 61 °C no que se refere a manutenção da arquitetura tridimensional. O teste de atividade após a incubação em temperatura de 65 °C apontou que a AtGH12 permanece cataliticamente ativa em sua temperatura ótima de 55 °C.

6 PERSPECTIVAS

Um estudo mais completo das características da AtGH12, bem como contribuir com conhecimentos no campo da expressão heteróloga em fungo filamentoso, contaria com as seguintes propostas:

- ❖ Caracterizar cineticamente a AtGH12;
- ❖ Determinar o tempo de meia vida da AtGH12 em 55, 60, 65 e 70 °C;
- ❖ Realizar experimentos para avaliar o estado de agregação na presença de diferentes tampões e aditivos, visando testes de cristalização;
- ❖ Investigar a atividade de transglicosilação na presença de celobiose, celotriose e celopentaose;
- ❖ Realizar modelagem computacional da estrutura terciária da AtGH12 através da estrutura dos homólogos já elucidados para promover estudos de mutação sítio dirigida que possam estar associado com o estado de agregação em concentrações altas;
- ❖ Clonar o gene em plasmídeo integrativo e expressar heterologamente a AtGH12 em outros vetores como espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, para avaliar possíveis modificações pós-traducionais relacionados aos níveis de expressão e secreção proteica;
- ❖

REFERÊNCIAS

- 1 INTERNATIONAL Energy Outlook 2013. Disponível em <<http://www.eia.gov/forecasts/ieo/pdf/0484%282013%29.pdf>>. Acesso em: 13 set. 2014.
- 2 BP Statistical Review of World Energy. 2013. Disponível em: <http://www.bp.com/content/dam/bp/pdf/statistical-review/statistical_review_of_world_energy_2013.pdf>. Acesso em: 23 set. 2014.
- 3 NOVACANA. Perspectivas do etanol no mercado de combustíveis para veículos leves. 2014. Disponível em: <<http://www.novacana.com/etanol/perspectivas-mercado-combustiveis-veiculos-leves/>>. Acesso em: 04 jun. 2014.
- 4 BON, E. P. S.; PICATAGGIO, S. Enzyme and microbial biocatalysts. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, p. 98-100, 2002.
- 5 LYND, L. R. et al. Fuel ethanol from cellulosic biomass. **Science**, v. 251, n. 4999, p. 1318-23, 1991.
- 6 _____. Thermophilic ethanol production investigation of ethanol yield and tolerance in continuous culture. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 28-29, n. 1, p. 549-570, 1991.
- 7 WYMAN, C. E.; HINMAN, N. D. Ethanol. fundamentals of ethanol production from renewable feedstocks and use as a transportation fuel. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 24-25, p. 735-753, 1990.
- 8 CABRINI, K. T.; GALLO, C. R. Yeast identification in alcoholic fermentation process in a sugar cane industry unit of São Paulo state, Brazil. **Scientia Agricola**, v. 56, n. 1, p. 207-216, 1999.
- 9 SEABRA, J. E. A. **Technical-economic evaluation of options for whole use of sugar cane biomass in Brazil**. 2007. 274p.Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- 10 U. S. Energy Information Administration. Brasil: overview. Disponível em <<http://www.eia.gov/countries/analysisbriefs/brazil/brazil.pdf>>. Acesso em: 20 maio. 2014.
- 11 SHEEHAN, J. J. Biofuels and the conundrum of sustainability. **Current Opinion Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 318-24, 2009.
- 12 SANTA BARBARA, J. **The false promise of biofuels**. 2007.Disponível em: <<http://ifg.org/v2/wp-content/uploads/2014/05/biofuels.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2014.
- 13 LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology Molecular Biology and Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-77, 2002.

- 14 HU, G.; HEITMANN, J. A.; ROJAS, O. J. Feedstock pretreatment strategies for producing ethanol from wood, bark, and forest residues. **BioResources**, v. 3, n. 1, p. 270-294, 2008.
- 15 CARDONA, C.; QUINTERO, J.; PAZ, I. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4754-4766, 2010.
- 16 PERLACK, R. D. et al. **Biomass as feedstock for a bioenergy and bioproducts industry the technical feasibility of a billion-ton annual supply**. 2005. Disponível em:
<http://www1.eere.energy.gov/bioenergy/pdfs/final_billionton_vision_report2.pdf>.
Acesso em: 30 abr. 2014.
- 17 DEMAİN, A. L.; NEWCOMB, M.; WU, J. H. D. Cellulase, clostridia, and ethanol†. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 1, p. 124-54, Mar. 2005.
- 18 BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA JUNIOR, N. Enzimas na produção de etanol. In: BON, E. P. S.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; FERRARA, M. A.; COELHO, R. R. R. (Ed.) **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência Brasil, 2008. p. 241-271.
- 19 SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.
- 20 DUFF, S. J.; MURRAY, W. D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v. 55, n. 1, p. 1-33, 1996.
- 21 BETANCUR, G. J. V.; PEREIRA JUNIOR, N. Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production: part II: hemicellulose hydrolysate fermentability. **Electronic Journal Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 14-15, 2010.
- 22 RITTER, S. K. Lignocellulose: a complex biomaterial **Chemical & Engineering News**, v. 86, n. 49, p. 15, 2008.
- 23 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- 24 WEIL, J. et al. Cellulose pretreatments of lignocellulosic substrates. **Enzyme and Microbial Technology** v. 16, n. 11, p. 1002-4, 1994.
- 25 HAMELINCK, C. N.; VAN HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass and Bioenergy**, v. 28, n. 4, p. 384-410, 2005.
- 26 MORAIS, S. A. L. D.; NASCIMENTO, E. A. D.; MELO, D. C. D. Análise da madeira de *Pinus oocarpa* parte I - estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. **Revista Árvore**, v. 29, n. 3, p. 461-470, 2005.

- 27 FELLER, R. L.; LEE, S. B.; CURRAN, M. Three fundamental aspects of cellulose deterioration. **Art and Archaeology Technical Abstracts**, v.22, n.1, p. 278-354, 1985.
- 28 VANHOLME, R. et al. Lignin biosynthesis and structure. **Plant Physiology**, v. 153, n. 3, p. 895-905, 2010.
- 29 SELIG, M. J. et al. Deposition of lignin droplets produced during dilute acid pretreatment of maize stems retards enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology Progress**, v. 23, n. 6, p. 1333-9, 2007.
- 30 DEMIRBAS, A. Relationships between heating value and lignin, moisture, ash and extractive contents of biomass fuels. **Energy Exploration & Exploitation**, v. 20, n. 1, p. 105-111, 2002..
- 31 _____. Potential applications of renewable energy sources, biomass combustion problems in boiler power systems and combustion related environmental issues. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 31, n. 2, p. 171-192, 2005.
- 32 SOARES, P. A.; ROSSELL, C. Conversão da celulose pela tecnologia organosolv. **NAIPPE/USP**, v. 3, p. 5-29, 2004.
- 33 LEITE, R. **Bioetanol combustível: uma oportunidade para o Brasil**. Brasília: CGEE, 2009. 536p.
- 34 INSTITUTO CUBANO DE INVESTIGACIONES DE LOS DERIVADOS DE LA CAÑA DE AZÚCAR (ICIDCA). **Derivatives manual**..Habana, Cuba, 1999
- 35 NOVACANA. Matérias-primas na produção do etanol de 2ª geração. 2014. Disponível em: <<http://www.novacana.com/etanol/materias-primas/>>. Acesso em: 09 de junho.
- 36 SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.
- 37 COOPER, C. et al. A renewed boost for ethanol. **Chemical Engineering**, v. 106, n. 2, p. 35, 1999.
- 38 KOOTSTRA, A. M. J. et al. Comparison of dilute mineral and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, n. 2, p. 126-131, 2009.
- 39 LARSSON, S. et al. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, n. 3-4, p. 151-159, 1999.
- 40 CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS. **Estudo sobre as possibilidades e impactos da produção de grandes quantidades de etanol visando à substituição parcial de gasolina no mundo**. Brasília: 2009

- 41 SUN, Y.; CHENG, J. J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 14, p. 1599-606, 2005.
- 42 BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, p. 551-573, 2008.
- 43 OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.
- 44 GHOSH, P.; GHOSE, T.; SCHEPER, T. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. New York: Springer, 2003, v. 85.
- 45 MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresources Technology**, v. 96, n. 6, p. 673-86, 2005.
- 46 PHILIPPIDIS, G. P.; SMITH, T. K. Limiting factors in the simultaneous saccharification and fermentation process for conversion of cellulosic biomass to fuel ethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 51, n. 1, p. 117-124, 1995.
- 47 JORGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels Bioproducts & Biorefining**, v. 1, n. 2, p. 119-134, 2007.
- 48 ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 719-39, 2005.
- 49 DIPARDO, J. **Outlook for biomass ethanol production and demand**. Disponível em: http://www.madrimasd.org/queesmadrimasd/Pricit/PlanNet/documentos/03/documentos/publico/Renovables/biomass_ethanol.pdf >. Acesso em: 10 jun. 2014.
- 50 SANNIGRAHI, P. A. R. A. J. A. T. G. A. Poplar as a feedstock for biofuels: a review of compositional characteristics. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 4, n. 2, p. 209--226, 2010.
- 51 LYND, L. R. et al. How biotech can transform biofuels. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 169-72, 2008
- 52 SERRANO-RUIZ, J. C.; LUQUE, R.; SEPULVEDA-ESCRIBANO, A. Transformations of biomass-derived platform molecules: from high added-value chemicals to fuels via aqueous-phase processing. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 11, p. 5266-81, 2011.
- 53 BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 5, p. 355-83, 2000.
- 54 WILSON, D. B. Cellulases and biofuels. **Current Opinion Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 295-9, 2009.

- 55 _____. Microbial diversity of cellulose hydrolysis. **Current Opinion Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 259-63, 2011.
- 56 SHOSEYOV, O.; SHANI, Z.; LEVY, I. Carbohydrate binding modules: biochemical properties and novel applications. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, n. 2, p. 283-95, 2006.
- 57 ARAKI, Y. et al. Family 17 and 28 carbohydrate-binding modules discriminated different cell-wall sites in sweet potato roots. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 74, n. 4, p. 802-5, 2010.
- 58 PHITSUWAN, P. et al. Present and potential applications of cellulases in agriculture, biotechnology, and bioenergy. **Folia Microbiologica**, v. 58, n. 2, p. 163-76, 2013.
- 59 WAKIYAMA, M. et al. An extracellular endo-1,4-beta-xylanase from *Aspergillus japonicus*: Purification, properties, and characterization of the encoding gene. **Journal Bioscience Bioengineering**, v. 109, n. 3, p. 227-9, 2010.
- 60 QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E.; FOLCH-MALLOL, J. L. Plant cell wall degrading and remodeling proteins: current perspectives. **Biotecnología Aplicada**, v. 28, n. 4, p. 205-215, 2011.
- 61 SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 219-28, 2003.
- 62 SMAALI, I. et al. Biocatalytic conversion of wheat bran hydrolysate using an immobilized GH43 beta-xylosidase. **Bioresources Technology**, v. 100, n. 1, p. 338-44, 2009.
- 63 NAUMOFF, D. G. Hierarchical classification of glycoside hydrolases. **Biochemistry**, v. 76, n. 6, p. 622-35, 2011.
- 64 COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B. Carbohydrate-active enzymes: An integrated database approach. **Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering**, n. 246, p. 3-12, 1999.
- 65 HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemistry Journal**, v. 280, pt.2, p. 309-16, 1991.
- 66 PERCIVAL ZHANG, Y. H.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 5, p. 452-81, 2006.
- 67 MCCARTER, J. D.; WITHERS, S. G. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. **Current Opinion Structural Biology**, v. 4, n. 6, p. 885-92, 1994.

- 68 WITHERS, S.; WILLIAMS, S. **Glycoside hydrolases**. Disponível em: <http://www.cazypedia.org/index.php?title=Glycoside_hydrolases&oldid=9143>. Acesso em: jun. 2014.
- 69 GOEDEGEBUUR, F. et al. Cloning and relational analysis of 15 novel fungal endoglucanases from family 12 glycosyl hydrolase. **Current Genetics**, v. 41, n. 2, p. 89-98, 2002.
- 70 HENRISSAT, B.; DAVIES, G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 7, n. 5, p. 637-44, 1997.
- 71 MIAO, S. et al. Identification of glutamic acid 78 as the active site nucleophile in *Bacillus subtilis* xylanase using electrospray tandem mass spectrometry. **Biochemistry**, v. 33, n. 23, p. 7027-32, 1994.
- 72 ZECHEL, D. L. et al. Identification of Glu-120 as the catalytic nucleophile in *Streptomyces lividans* endoglucanase celB. **Biochemical Journal**, v. 336, p. 139-45, 1998.
- 73 SANDGREN, M. et al. Comparison of family 12 glycoside hydrolases and recruited substitutions important for thermal stability. **Protein Science**, v. 12, n. 4, p. 848-60, 2003.
- 74 DAMASIO, A. R. et al. Functional characterization and oligomerization of a recombinant xyloglucan-specific endo-beta-1,4-glucanase (GH12) from *Aspergillus niveus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1824, n. 3, p. 461-7, 2012.
- 75 PICART, P. et al. Expression of novel β -glucanase Cel12A from *Stachybotrys atra* in bacterial and fungal hosts. **Fungal Biology**, v. 116, n. 3, p. 443-51, 2012.
- 76 ANDREWS, S. R. et al. Substrate specificity in glycoside hydrolase family 10. Tyrosine 87 and leucine 314 play a pivotal role in discriminating between glucose and xylose binding in the proximal active site of *Pseudomonas cellulosa* xylanase 10A. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 30, p. 23027-33, 2000.
- 77 POWLOWSKI, J. et al. Substrate recognition and hydrolysis by a fungal xyloglucan-specific family 12 hydrolase. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 10, p. 1175-9, 2009.
- 78 MASTER, E. R. et al. A xyloglucan-specific family 12 glycosyl hydrolase from *Aspergillus niger*: recombinant expression, purification and characterization. **Biochemistry Journal**, v. 411, n. 1, p. 161-70, 2008.
- 79 SANDGREN, M. et al. Crystal complex structures reveal how substrate is bound in the -4 to the +2 binding sites of *Humicola grisea* Cel12A. **Journal of Molecular Biology**, v. 342, n. 5, p. 1505-17, 2004.

- 80 CASTRO, A. M. D.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, p. 181-188, 2010.
- 81 PEROUTKA III, R. J. et al. SUMO fusion technology for enhanced protein expression and purification in prokaryotes and eukaryotes. **Methods in Molecular Biology**, v. 705, p. 15-30, 2011. Pubmed 21125378.
- 82 YURIMOTO, H.; SAKAI, Y. Methanol-inducible gene expression and heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 53, pt 2, p. 85-92, 2009.
- 83 BAUER, S. et al. Development and application of a suite of polysaccharide-degrading enzymes for analyzing plant cell walls. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 30, p. 11417-22, 2006.
- 84 WANG, L. et al. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 2, p. 115-29, 2005.
- 85 IBRAHIM, C. O. Development of applications of industrial enzymes from Malaysian indigenous microbial sources. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p. 4572-82, 2008.
- 86 SHARMA, R. et al. Approaches for refining heterologous protein production in filamentous fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 12, p. 2083-2094, 2009.
- 87 SEGATO, F. et al. Two structurally discrete GH7-cellobiohydrolases compete for the same cellulosic substrate fiber. **Biotechnology Biofuels**, v. 5, p. 21, 2012.
- 88 FALCH, E. A. Industrial enzymes--developments in production and application. **Biotechnology Advances**, v. 9, n. 4, p. 643-58, 1991.
- 89 SWIFT, R. J. et al. The effect of organic nitrogen sources on recombinant glucoamylase production by *Aspergillus niger* in chemostat culture. **Fungal Genetics and Biology**, v. 31, n. 2, p. 125-33, 2000.
- 90 PUNT, P. J. et al. Characterization of the *Aspergillus niger* prtT, a unique regulator of extracellular protease encoding genes. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, n. 12, p. 1591-9, 2008.
- 91 WEENINK, X. O. et al. A new method for screening and isolation of hypersecretion mutants in *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 6, p. 711-7, Feb. 2006.
- 92 SEGATO, F. et al. High-yield secretion of multiple client proteins in *Aspergillus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, n. 2, p. 100-6, 2012.

- 93 ALEKSENKO, A.; GEMS, D.; CLUTTERBUCK, J. Multiple copies of MATE elements support autonomous plasmid replication in *Aspergillus nidulans*. **Molecular Microbiology**, v. 20, n. 2, p. 427-34, 1996.
- 94 PETERSEN, T. N. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, p. 785-786, 2011.
- 95 STEENTOFT, C. et al. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. **Embo Journal**, v. 32, n. 10, p. 1478-88, 2013.
- 96 NETNGLYC 1.0 server. Disponível em <<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>>. Acesso em: 25 mai de 2013.
- 97 MULLIS, K. et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 51, p. 263-73, 1986.
- 98 GASTEIGER, E. et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. **Proteomics Protocols Handbook**, p. 571-607, 2005. doi: 10.1385/1-59259-890-0:571.
- 99 TILBURN, J. et al. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. **Gene**, v. 26, n. 2-3, p. 205-21, 1983.
- 100 SHEVCHENKO, A. et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2856-60, 2007.
- 101 ERICSSON, U. B. et al. Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. **Analytical Biochemistry**, v. 357, n. 2, p. 289-98, 2006.
- 102 _____. Expression, purification, crystallization and preliminary diffraction studies of the tRNA pseudouridine synthase TruD from *Escherichia coli*. **Acta Crystallography D**, v. 60, p. 775-6, 2004.
- 103 PHILLIPS, K.; DE LA PENA, A. H. The combined use of the Thermofluor assay and ThermoQ analytical software for the determination of protein stability and buffer optimization as an aid in protein crystallization. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 10, p. 1028-1-1028-15, 2011. doi: 10.1002/0471142727.mb1028s94
- 104 SVERGUN, D. I. Small-angle X-ray and neutron scattering as a tool for structural systems biology. **Biological Chemistry**, v. 391, n. 7, p. 737-43, 2010.
- 105 HAMMERSLEY, A. **FIT2D: an introduction and overview**. Grenoble, France. European Synchrotron Radiation Facility, 1997. ESRF Internal Report, ESRF97HA02T.

106 PILZ, I.; GLATTER, O.; KRATKY, O. [11] Small-angle x-ray scattering. **Methods in Enzymology**, v. 61, p. 148-249, 1979.

107 SVERGUN, D. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. **Journal of Applied Crystallography**, v. 25, n. 4, p. 495-503, 1992.

108 FISCHER, H. et al. Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale. **Journal of Applied Crystallography**, v. 43, n. 1, p. 101-109, 2009..

109 SVERGUN, D. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. **Biophysical Journal**, v. 76, n. 6, p. 2879-2886, 1999.

110 VOLKOV, V. V.; SVERGUN, D. I. Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. **Journal of Applied Crystallography**, v. 36, n. 3, p. 860-864, 2003.

111 XU, R. **Particle characterization**: light scattering methods. Massachusetts: Kluwer Academic Publishers, 2001.v.13.

112 TANNER, R. et al. Conformational change of protein sodium dodecylsulfate complexes in solution: A study of dynamic light scattering. **Journal of Chemical Physics**, v. 76, n. 8, p. 3866-3872, 1982.

113 CANTOR, C. R. **Biophysical chemistry**: Part II: Techniques for the study of biological structure and function. San Francisco: W. H. Freeman, 1980.

114 ADLER, A. J.; GREENFIELD, N. J.; FASMAN, G. D. Circular dichroism and optical rotatory dispersion of proteins and polypeptides. **Methods in Enzymology**, v. 27, p. 675-735, 1973.

115 BEROVA, N.; NAKANISHI, K.; WOODY, R. **Circular dichroism**: principles and applications. John Wiley & Sons, 2000.

116 SREERAMA, N.; VENYAMINOV, S. Y.; WOODY, R. W. Analysis of protein circular dichroism spectra based on the tertiary structure classification. **Analytical Biochemistry**, v. 299, n. 2, p. 271-4, 2001.

117 KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1751, n. 2, p. 119-139, 2005.

118 MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

119 SQUINA, F. M. et al. Xylan decomposition by *Aspergillus clavatus* endo-xylanase. **Protein Expression and Purification**, v. 68, n. 1, p. 65-71, 2009.

120 PENA, M. J. et al. 7 Methods for Structural Characterization of the Products of Cellulose-and Xyloglucan-Hydrolyzing Enzymes. **Methods in Enzymology**, v. 510, p. 121, 2012.

121 ZHAO, X.; CHENG, K.; LIU, D. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 5, p. 815-27, 2009.

122 NAKAGAME, S. **The influence of lignin on the enzymatic hydrolysis of pretreated biomass substrates**. 2010. Ph. D. Thesis(Philosophy) - Philosophy in the Facult of Graduate Studies (Forestry), University of British Columbia,Vancouver, 2010.

123 BELDMAN, G. et al. Synergism in cellulose hydrolysis by endoglucanases and exoglucanases purified from *Trichoderma viride*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 31, n. 2, p. 173-178, 1988.

124 ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artmed, 2010.

125 COUTINHO, P. M. et al. Post-genomic insights into the plant polysaccharide degradation potential of *Aspergillus nidulans* and comparison to *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. **Fungal Genetics Biology**, v. 46, p. 161-169, 2009. doi:10.1016/j.fgb.2008.07.020

126 VAN DEN BRINK, J.; DE VRIES, R. P. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 6, p. 1477-92, 2011.

127 FLEISSNER, A.; DERSCH, P. Expression and export: recombinant protein production systems for *Aspergillus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 4, p. 1255-70, 2010.

128 NEVALAINEN, K. M.; TE'O, V. S.; BERGQUIST, P. L. Heterologous protein expression in filamentous fungi. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 9, p. 468-74, 2005.

129 PUNT, P. J. et al. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 200-6, 2002.

130 DAMÁSIO, A. R. D. L. et al. Heterologous expression of an *Aspergillus niveus* xylanase GH11 in *Aspergillus nidulans* and its characterization and application. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 6, p. 1236-1242, 2011.

131 JAMES, P. et al. Protein identification by mass profile fingerprinting. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 195, n. 1, p. 58-64, 1993.

132 YATES, J. R. et al. Peptide mass maps: a highly informative approach to protein identification. **Analytical Biochemistry**, v. 214, n. 2, p. 397-408, 1993.

133 PAPPIN, D. J.; HOJRUP, P.; BLEASBY, A. J. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. **Current Biology**, v. 3, n. 6, p. 327-32, 1993.

134 HENZEL, W. J. et al. Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 11, p. 5011-5, 1993.

135 MIOTTO, L. S. et al. SAXS Studies of the endoglucanase Cel12A from *Gloeophyllum trabeum* show its monomeric structure and reveal the influence of temperature on the structural stability of the enzyme. **Materials**, v. 7, n. 7, p. 5202-5211, 2014.

136 LEUNISSEN, M. **Protein crystalization**: An essay on several aspects of protein crystallization research. Department of solid state chemistry, 2001.

137 GEORGE, A.; WILSON, W. W. Predicting protein crystallization from a dilute solution property. **Acta Crystallography D**, v. 50, n. Pt 4, p. 361-5, 1994.

138 MERTINS, O. **Estudos físico-químicos e estruturais de lipossomas compósitos de fosfatidilcolina e quitosana**. 2008. 186p. Tese (Doutorado) - Instituto de química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

139 SANDGREN, M. et al. The hgrisea Cel12A enzyme structure at 1.2 Å resolution and the impact of its free cysteine residues on thermal stability. **Protein Science**, v. 12, n. 12, p. 2782-93, 2003.

140 COHEN, R.; SUZUKI, M. R.; HAMMEL, K. E. Processive endoglucanase active in crystalline cellulose hydrolysis by the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 2412-7, 2005.

141 KARLSSON, J. et al. Enzymatic properties of the low molecular mass endoglucanases Cel12A (EG III) and Cel45A (EG V) of *Trichoderma reesei*. **Journal of Biotechnology**, v. 99, n. 1, p. 63-78, 2002.

142 GRISHUTIN, S. G. et al. A lichenase-like family 12 endo-(1→4)-beta-glucanase from *Aspergillus japonicus*: study of the substrate specificity and mode of action on beta-glucans in comparison with other glycoside hydrolases. **Carbohydrate Research**, v. 341, n. 2, p. 218-29, 2006.

143 LIU, Y. et al. Molecular cloning of novel cellulase genes cel9A and cel12A from *Bacillus licheniformis* GXN151 and synergism of their encoded polypeptides. **Current Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 234-8, 2004.

144 DE JONG, E.; WONG, K. K. Y.; SADDLER, J. N. The mechanism of Xylanase prebleaching of kraft pulp: an examination using model pulps prepared by depositing lignin and xylan on cellulose fibers. **International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood**, v. 51, n. 1, p. 7, 1997.

- 145 SUURNÄKKI, A. et al. Effects of enzymatic removal of xylan and glucomannan on the pore size distribution of kraft fibres. **International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood**, v. 51, n. 1, p. 27-33, 1997.
- 146 ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, p. 4, 2010. doi:10.1186/1754-6834-3-4
- 147 SHIMOKAWA, T. et al. Purification, molecular cloning, and enzymatic properties of a family 12 endoglucanase (EG-II) from *fomitopsis palustris*: role of EG-II in larch holocellulose hydrolysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 18, p. 5857-61, 2008.
- 148 YOSHIKAWA, T. et al. Structural basis for inhibition of xyloglucan-specific endo-beta-1,4-glucanase (XEG) by XEG-protein inhibitor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 22, p. 18710-6, 2012.
- 149 GLOSTER, T. M. et al. Characterization and three-dimensional structures of two distinct bacterial xyloglucanases from families GH5 and GH12. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 26, p. 19177-89, 2007.
- 150 WONG, D. D. et al. A novel xyloglucan-specific endo-beta-1,4-glucanase: biochemical properties and inhibition studies. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 5, p. 1463-71, 2010.
- 151 HABRYLO, O. et al. Characterization of the four GH12 Endoxylanases from the plant pathogen *Fusarium graminearum*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 8, p. 1118-26, 2012.
- 152 VAN SOLINGEN, P. et al. Cloning and expression of an endocellulase gene from a novel streptomycete isolated from an East African soda lake. **Extremophiles**, v. 5, n. 5, p. 333-41, Oct. 2001.
- 153 BOMMARIUS, A. S. et al. Protein engineering of cellulases. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 29c, p. 139-145, 2014. doi:10.1016/j.copbio.2014.04.007
- 154 BLACKBURN, N. J. et al. Metal-metal bonding in biology: EXAFS evidence for a 2.5 Å copper-copper bond in the CuA center of cytochrome oxidase. **Biochemistry**, v. 33, n. 34, p. 10401-7, 1994.
- 155 SIGEL, R. K.; PYLE, A. M. Alternative roles for metal ions in enzyme catalysis and the implications for ribozyme chemistry. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 1, p. 97-113, 2007.
- 156 SMITH, C. A.; RAYMENT, I. X-ray structure of the magnesium(II).ADP.vanadate complex of the *Dictyostelium discoideum* myosin motor domain to 1.9 Å resolution. **Biochemistry**, v. 35, n. 17, p. 5404-17, 1996.

- 157 SAGI, I. et al. The penta-coordinated vanadium formed on binding of ADP-vanadate-Mg (II) to CF1-ATPase functions as a transition-state inhibitor. **Journal of Synchrotron Radiation**, v. 6, n. 3, p. 409-410, 1999.
- 158 DAVIES, D. R.; HOI, W. G. J. The power of vanadate in crystallographic investigations of phosphoryl transfer enzymes. **FEBS Letters**, v. 577, n. 3, p. 315 - 321, 2004.
- 159 KESVATERA, T. et al. Focusing of the electrostatic potential at EF-hands of calbindin D(9k): titration of acidic residues. **Proteins**, v. 45, n. 2, p. 129-35, Nov. 1 2001.
- 160 HARRIS, T. K.; TURNER, G. J. Structural basis of perturbed pKa values of catalytic groups in enzyme active sites. **IUBMB Life**, v. 53, n. 2, p. 85-98, Feb. 2002.
- 161 SCHWEINS, T. et al. The role of the metal ion in the p21ras catalysed GTP-hydrolysis: Mn²⁺ versus Mg²⁺. **Journal of Molecular Biology**, v. 266, n. 4, p. 847-56, 1997.
- 162 SCHOU, C. et al. Stereochemistry, specificity and kinetics of the hydrolysis of reduced cellodextrins by nine cellulases. **European Journal of Biochemistry**, v. 217, n. 3, p. 947-53, 1993.
- 163 SCHAGERLOF, H. et al. Use of ¹⁸O water and ESI-MS detection in subsite characterisation and investigation of the hydrolytic action of an endoglucanase. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 394, n. 7, p. 1977-84, 2009.
- 164 BAUER, M. W. et al. An endoglucanase, eg1A, from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* hydrolyzes β -1,4 bonds in mixed-linkage (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 4)- β -D- glucans and cellulose. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 1, p. 284-290, 1999.
- 165 BOK, J. D.; YERNOOL, D. A.; EVELEIGH, D. E. Purification, characterization, and molecular analysis of thermostable cellulases CelA and CelB from *Thermotoga neapolitana*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4774-4781, 1998.
- 166 BIELY, P.; VRSANSKA, M.; CLAEYSSSENS, M. The endo-1,4-beta-glucanase I from *Trichoderma reesei*. Action on beta-1,4-oligomers and polymers derived from D-glucose and D-xylose. **European Journal of Biochemistry**, v. 200, n. 1, p. 157-63, 1991.