

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS**

**VANESSA DE OLIVEIRA ARNOLDI PELLEGRINI**

Clonagem molecular, expressão, purificação e caracterização estrutural da endoglucanase de *Trichoderma harzianum* visando o desenvolvimento de coquetéis enzimáticos para a produção de etanol lignocelulósico

São Carlos

2016



**VANESSA DE OLIVEIRA ARNOLDI PELLEGRINI**

Clonagem molecular, expressão, purificação e caracterização estrutural da endoglucanase de *Trichoderma harzianum* visando o desenvolvimento de coquetéis enzimáticos para a produção de etanol lignocelulósico

Tese 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 Doutora em Ciências.

Área de concentração : Física Aplicada

Opção: Física Biomolecular

Orientador: Prof. Dr. Igor Polikarpov.

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2016

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

Pellegrini, Vanessa de Oliveira Arnoldi  
Clonagem molecular, expressão, purificação e  
caracterização estrutural da endoglucanase de  
*Trichoderma harzianum* visando o desenvolvimento de  
coquetéis enzimáticos para a produção de etanol  
lignocelulósico / Vanessa de Oliveira Arnoldi  
Pellegrini; orientador Igor Polikarpov - versão  
corrigida -- São Carlos, 2016.  
160 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em  
Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São  
Carlos, Universidade de São Paulo, 2016.

1. Celulase. 2. Endoglucanase. 3. Hidrólise de  
biomassa. 4. Etanol lignocelulósico. I. Polikarpov,  
Igor, orient. II. Título.

Para meu pai



## AGRADECIMENTOS

*Desafio grande é utilizar apenas duas páginas para agradecer as pessoas que fizeram parte dessa trajetória, e ainda, não esquecer de ninguém.*

*Acima de tudo agradeço à Deus, por se fazer presente em minha vida, me abençoando e colocando no meu caminho, pessoas que me fazem crescer intelectualmente e espiritualmente.*

*Ao Prof. Igor Polikarpov, pela oportunidade, orientação, apoio e confiança. Pelas conversas e discussões científicas. Pelas cobranças que me fizeram correr atrás do conhecimento, e pela paciência por entender minhas limitações.*

*Ao meu pai Edison, por ter sido o melhor pai do mundo. Porque sempre foi para você e por você.*

*À minha mãe Ana Maria, por ser meu espelho de vida, pelo amor incondicional sempre a mim dedicado. Mãe, você é minha guerreira e meu porto seguro. Eu te amo.*

*À minha irmã Aninha, confidente e companheira, por quem meu coração se preenche e se completa. Obrigada pela paciência, pelos conselhos, por me ouvir falar de fungo como se fosse o assunto mais interessante pra você, por fingir entender de clonagem e expressão só pra me deixar feliz.*

*Amanda, minha bonequinha tão aguardada e tão amada. Obrigada por me ensinar em tão pouco tempo, que a vida não é uma ciência exata, e que a órbita de tudo pode mudar com um simples sorriso teu.*

*Ao Henrique, nem sei como agradecer! Obrigada pelos mais de 20 anos de amor e dedicação. Obrigada por abrir mão das suas prioridades pelas minhas. Obrigada por mudar o rumo da tua vida para colocar a minha no lugar. Obrigada por ter acreditado em mim e incentivado todas minhas lutas. Obrigada pela companhia no laboratório de final de semana e feriado. Obrigada por me fazer sorrir, por me tornar uma pessoa melhor e me dar a certeza de que se tivesse de começar tudo de novo, sim, seria com você.*

*À minha filha de 4 patas, Pitty por todas as noites ao meu lado enquanto eu estudava ou escrevia, por todas lambidas e latidos que serviam de tranquilizante quando o surto era o limite.*

*Ao meu cunhado Igor, obrigada, pelos churrascos e comilanças. Obrigada por me mostrar as diferenças, por me mostrar que existe pessoas emburradas e mal humoradas além de mim.*

*Ao Bernardo pela consideração, por ser tão prestativo e por preencher a vida da minha mãe. À tia Ana e ao Fify que estiveram presente, me apoiando e incentivando.*

*Ao meu primo irmão Denis. O que te faz feliz? futebol, viagens e quebra de dieta! Por estar sempre na torcida e me acompanhando, aqui, ou ali! Nicoli, minha amiga prima, obrigada por completar a vida do meu primo e por dividir comigo as preocupações de laboratório e bolsa.*

*À Camila, minha fisioterapeuta querida por aliviar minhas dores no pescoço, minhas dores nos ombros, e por me aguentar falando do doutorado horas a fio. Ao Robson também, obrigada pela paciência durante a escrita da tese e pelas corridas para alívio da tensão!*

*Ao meu eterno chefinho Maurício Lacerda Nogueira e minha co-orientadora Roberta Bronzoni, por terem me aceito e me introduzido no mundo da pesquisa, compartilhando ensinamentos que levarei para a vida toda*

*À Flávia e ao Ronaldo, minha família dinamarquesa mais brasileira! Obrigada por terem aberto a porta da casa de vocês, e me recebido com tanto carinho. Vocês preencheram a ausência da minha terra e dos meus amores.*

*À Michelle, amiga querida e organizada! Obrigada por me ajudar tantas vezes com contas e protocolos. Obrigada pela paciência, e por aguentar e aceitar meu mal humor matinal.*

*Ao César, meu mala preferido! Obrigada por todo ensinamento, por toda colaboração e amizade. Obrigada pelas palhaçadas que deixavam meus dias menos ranzinzas.*

*Àquelas que deixaram o grupo de Biotecnologia Molecular mas que continuam no grupo da vida: Renatinha, Malu, Fran, Marisa, Ana e Vivi. Amigas que fizeram falta o tempo todo. Obrigada por terem compartilhado diferentes experiências comigo. Trago na memória e no coração. Lis, precisava ir pra tão longe? A saudade dói! Obrigada meninas, por essa jornada, por essa história.*

*Um agradecimento especial para minha amiga Viviane Serpa, que foi minha inspiração durante o doutorado. Você, que traça metas e vai atrás, você que não se satisfaz com o mais ou menos. Obrigada Vivi, pela oportunidade de trabalhar junto com você, por ter salvo meu projeto clonando minha proteína e, obrigada por ter me dado a oportunidade de ir para a Dinamarca, ampliando meus horizontes.*

*Aos meus companheiros de grupo e de sala: Atilio, Evandrinho, Marco, Mariana, Caio, Danilo e Bruno, pela ajuda nos experimentos, pelas conversas e risadas, pelas broncas e discussões, pelos bolos e sorvetes. Ao apoio técnico Maria Auxiliadora, Livia, Josimar e João Possatto, pela prontidão e auxílio.*

*André, meu amigo mais atrapalhado! Obrigada por toda colaboração. Obrigada por insistir comigo, cristalizar e resolver a estrutura da minha proteína. Você é um ótimo companheiro de bancada e de congressos, até de montanha russa.*

*Às Luluzinhas Aline, Amanda, Grazi, Marina, Mel e Renata. Obrigada pela oportunidade de conviver com vocês. Um grupo tão diferente, mas que é unido pela amizade e pelo respeito. Vocês, cada uma à sua maneira, tornaram meu dia a dia mais leve. Que nossos caminhos continuem se encontrando, mesmo com cada uma virando uma esquina.*

*Amanda, minha amiga sinérgica. Muito obrigada por tudo! Pelas tentativas em ensinar cristalografia, por toda colaboração em experimentos. Obrigada por ler e corrigir minha tese como se fosse a sua. Obrigada pelos cupcakes e mimos, obrigada pela amizade além "lab".*

*À Renata, que caiu na minha vida de paraquedas, mas pra ficar. Que me ensinou que somos capazes de vencer desafios, que me mostrou que a força que temos dentro de nós é maior do que conhecemos. Sabe Deus? Agradeço a Ele a oportunidade de ter conhecido você. Obrigada, pela pelas conversas e fofocas no corredor, na cantina ou no zap. Obrigada por sua amizade.*

*Ao Prof. Dr. Peter Westh e seu grupo de pesquisa, por me acolher e compartilhar do seu conhecimento durante o meu estágio de doutorado na Universidade de Roskilde, na Dinamarca.*

*Aos professores Dra. Camila Rezende e Dr. Fábio Skina pela colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.*

*Ao Instituto de Física de São Carlos pela estrutura, aos professores do IFSC e do grupo de Biotecnologia Molecular que contribuíram para minha formação.*

*Aos funcionários da pós-graduação, biblioteca e gráfica pela ajuda em tudo que precisei. Vocês são um ponto fora da reta. Vocês são sensacionais!*

*À Fapesp pelo apoio financeiro.*

*À todas as pessoas que colaboraram direta ou indiretamente para realização deste trabalho*

*O meu mais sincero, Obrigada!*



*“Você nunca sabe que resultados  
virão da sua ação.  
Mas se você não fizer nada,  
não existirão resultados”.*

*Mahatma Gandhi*



## RESUMO

PELLEGRINI, V.O.A. **Clonagem molecular, expressão, purificação e caracterização estrutural da endoglucanase de *Trichoderma harzianum* visando o desenvolvimento de coquetéis enzimáticos para a produção de etanol lignocelulósico.** 2016. 160 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

O aumento na demanda mundial por energia, a perspectiva de encolhimento dos recursos energéticos e a preocupação global com a questão ambiental, despertaram o interesse por fontes alternativas de energia. A biomassa lignocelulósica é abundante e de baixo custo, com potencial para complementar a produção em larga escala de combustíveis. A degradação das moléculas constituintes da parede celular à açúcares fermentescíveis e então à etanol, ocorre através da hidrólise enzimática da biomassa. Contudo, a utilização de enzimas para esse fim encontra-se em estágio exploratório e representa um gargalo na implementação de tecnologias de etanol 2G em escala industrial, desencadeando a busca de celulasas bioquimicamente mais ativas, estáveis e economicamente viáveis. O presente trabalho visou a caracterização da endoglucanase I do fungo *Trichoderma harzianum*, e para isso foi realizada expressão, ensaios bioquímicos e biofísicos do domínio catalítico (*ThCel7B-CCD*) e da proteína inteira (*ThCel7B-full*). A enzima exibiu um perfil acidofílico, com atividade ótima em pH 3,0 a 55°C. A proteína também se mostrou capaz de hidrolisar uma variedade de substratos, sendo a maior atividade hidrolítica em  $\beta$ -glucano (75 U mg<sup>-1</sup>). Ao analisar a estabilidade térmica medida a 55°C em pH 5, a atividade residual manteve-se intacta por mais de 2 meses. Outra característica relevante foi o elevado grau de sinergismo entre *ThCel7B* e *ThCel7A*. Análises de microscopia eletrônica de flocos de aveia submetidas à hidrólise com *ThCel7B* evidenciaram os efeitos de degradação do substrato em relação às amostras controle. O conjunto desses resultados, além de importante para a compreensão do mecanismo molecular de *ThCel7B* e de outras endoglucanases da família GH7, também revelou uma enzima de interesse biotecnológicos uma vez que o comportamento ácido e sua estabilidade térmica são características relevantes para aplicações industriais sob condições extremamente ácidas.

Palavras-chave: Celulase. Endoglucanase. Hidrólise de biomassa. Etanol lignocelulósico



## ABSTRACT

PELLEGRINI, V.O.A. **Molecular cloning, expression, purification and structural characterization of endoglucanase from *Trichoderma harzianum* aiming the development of enzymatic blends for production of lignocellulosic ethanol** 2016. 160 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

The increase in global energy demand, shrinkage perspective of energy resources and global concern about environmental issues, aroused interest in finding alternative sources of energy. Lignocellulosic biomass is plentiful and inexpensive, and has the potential to complement the large-scale production of fuel. The degradation of molecules that constitute the cell wall to fermentable sugars and then to ethanol, occurs via the enzymatic hydrolysis of biomass. However, the use of enzymes for this purpose is in exploratory stage and represents a bottleneck in the implementation of 2G ethanol technologies in industrial scale, supporting studies about biochemically most active, stable and economically viable cellulases. This work aimed the characterization of endoglucanase I from fungus *Trichoderma harzianum* and for that, was performed expression and biochemical and biophysical assays of the catalytic domain (*ThCel7B*-CCD) and full protein (*ThCel7B*-full). The enzyme exhibited an acidophilic profile, with optimal activity at pH 3.0 at 55°C. The protein was also able to hydrolyze a variety of substrates, with higher hydrolytic activity in  $\beta$ -glucano (75 U mg<sup>-1</sup>). Analyzing the thermal stability at pH 5, residual activity remained intact for over 2 months. Another important feature was the high degree of synergy between *ThCel7B* and *ThCel7A* (DS 3). Electron microscopy analysis of oat samples subjected to hydrolysis with *ThCel7B* show the substrate degradation effects in relation to the control samples. All these results, as well as important for understanding the molecular mechanism of *ThCel7B* and other endoglucanases of GH7 family, also disclose an enzyme of biotechnological interest because the acid behavior and thermal stability are promises of industrial applications under extremely acidic conditions

Keywords: Cellulases. Endoglucanase. Biomass hydrolysis. Lignocellulosic ethanol



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática dos ciclos de fontes de energia não renovável e renovável.....	32
Figura 2 - Matriz energética brasileira em 2014. As fontes renováveis de energia correspondem a 39,4%.....	33
Figura 3 - Representação da fibra de celulose, formada por macro fibrilas originadas de micro fibrilas a partir de monômeros de glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo $\beta$ -1,4. ....	35
Figura 4 - Representação de região cristalina intercalada por regiões amorfas da fibra de celulose.....	36
Figura 5 - Esquema da hidrólise completa da celulose. EGs agem em regiões amorfas da celulose, atuando nas ligações internas e liberando oligossacarídeos com extremidades redutoras e não-redutoras, para a atuação das CBHs, que agem produzindo celobiose, substrato para as BGs que disponibiliza a glicose como produto. Há também as enzimas acessórias que contribuem para o aumento da liberação de açúcares. ....	49
Figura 6 - Mapa do vetor para expressão em <i>A. niger</i> - ANIp7G . ....	66
Figura 7 - Esquema dos passos de clonagem pela plataforma <i>Gateway</i> ® a partir do vetor de entrada e do produto de amplificação do gene com caudas att seguido da inserção ao vetor de expressão.....	67
Figura 8 - Placa de Petri com transformantes obtidos com sucesso com crescimentos de diversas colônias. ....	70
Figura 9 - Princípio do método de <i>Thermofluor</i> . As proteínas corretamente enoveladas sofrem desenovelamento com o aumento da temperatura, resultando na exposição de regiões hidrofóbicas e no aumento da fluorescência emitida. A temperatura de <i>melting</i> ( $T_m$ ) representa a temperatura na qual 50 % das moléculas estão desenoveladas. ....	78
Figura 10 - Fatores limitantes da eficiência da hidrólise da celulose. 1) Inibição por produto; 2) Ligação improdutiva da celobiohidrolase à celulose; 3 e 4) Hemiceluloses e lignina associadas impedindo acesso das celulasas na superfície da celulose; 5) Enzimas adsorvidas na lignina; 6)Desnaturação da enzima. ....	84
Figura 11 - Ilustração de como o experimento de diluição com amostras de diferentes concentrações iniciais de enzima pode ser interpretado em relação à reversibilidade da adsorção.....	86

Figura 12 - Representação esquemática da metodologia utilizada para medição de (A)ARtol e (B)ARsol. ....	93
Figura 13 - Placas de 24 poços e frasco erlenmeyer com cultura de <i>A. niger</i> após 6 dias de cultivo, onde é possível observar o "tapete" formado acima do sobrenadante. ....	99
Figura 14 - SDS-PAGE 15% utilizado para confirmação da expressão das proteínas. 1A- Amostra do extrato bruto após precipitação por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ da <i>ThCel7B-CCD</i> . 2A- Marcador de massa molecular com destaque para a banda de 45kDa. 1B - Amostra de extrato bruto após precipitação por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ da <i>ThCel7B-full</i> . 2B- Marcador de massa molecular com destaque para a banda de 70kDa. ....	100
Figura 15 - Gel SDS-PAGE 15% mostrando a purificação das enzimas. 1A- Marcador de massa molecular com destaque para a banda de 45kDa. 2 e 3A- Amostras de <i>ThCel7B-CCD</i> concentradas após etapas de purificação .1B- Marcador de massa molecular com destaque para a banda de 70kDa. 2e 3B - Amostras de <i>ThCel7B-full</i> concentradas após etapas de purificação. ....	100
Figura 16 - Gel nativo das proteínas <i>ThCel7B-full</i> e <i>ThCel 7B-CCD</i> . 1A e 1B - Marcador de massa molecular. 2A- Amostra de <i>ThCel7B-full</i> em concentração de 2mg/mL e 2B - Amostra de <i>ThCel7B-CCD</i> em concentração de 2mg/mL. ....	102
Figura 17 - Efeito da temperatura na atividade enzimática de endoglucanase I de <i>T.harzianum</i> , usando CMC como substrato. ....	103
Figura 18 - Efeito do pH na atividade enzimática frente a CMC. Para testar pH menor que 2, foi utilizado tampão HCl/KCl e pH maiores que de 2, tampão ABF. A)CCD e B) <i>ThCel7B-full</i> . ....	103
Figura 19 - O gráfico mostra a influência de diferentes tampões ácidos na atividade de <i>ThCel7B-CCD</i> contra CMC como substrato. ....	104
Figura 20 - A especificidade de substratos mostrada através do gráfico da atividade específica de <i>ThCel7B-full</i> e <i>ThCel7B-CCD</i> contra o conjunto de polissacarídeos com tempo de incubação de 15 minutos. ....	105
Figura 21 - Especificidade de substratos mostrada através do gráfico da atividade específica de <i>ThCel7B-full</i> e <i>ThCel7B-CCD</i> contra celulose cristalina com tempo de incubação de 4 horas. ....	106
Figura 22 - Curvas de Thermofluor para a <i>Th</i>	



Cel7B-full e <i>ThCel7B</i> -CCD, obtidas por meio da análise da intensidade de fluorescência em função da temperatura.....	108
Figura 23 - Variação da temperatura de <i>melting</i> ( $T_m$ ) para todos os pH testados, sendo que o valor mais elevado de $T_m$ foi observado para pH 5. ....	108
Figura 24 - Atividade residual de <i>ThCel7B</i> com valores apresentados em termos de atividade relativa. A atividade residual foi medida a 55°C em pH 3 e 5 ao longo de 100 dias. ....	110
Figura 25 - Eletroforese capilar de oligossacarídeo marcado com APTS. Produtos liberados por <i>ThCel7B</i> -full e <i>ThCel7B</i> - CCD após a hidrólise do substrato C6. ....	112
Figura 26 - Espectro de massas do produto da hidrólise de <i>ThCel7B</i> -full e <i>ThCel7B</i> -CCD utilizando celohexaose como substrato.....	113
Figura 27 - Digitalização de imagens de microscopia eletrônica que exibem o efeito hidrolítico de <i>ThCel7B</i> -full em flocos de aveia. Imagens do controle da reação e dos efeitos da ação da enzima depois de 12 h a pH 3 e 5 analisada em diferentes ampliações: 10 $\mu\text{m}$ , e 3 $\mu\text{m}$ . As setas brancas indicam regiões planas no controle; as setas amarelas indicam a formação de partículas esféricas após a hidrólise e as setas vermelhas exemplificam os grãos degradados. ....	114
Figura 28 - Digitalização de imagens de microscopia eletrônica que exibem o efeito hidrolítico de <i>ThCel7B</i> -CCD em floco de aveia. Imagens do controle da reação e dos efeitos da ação da enzima depois de 12 h a pH 3 e 5 analisada em diferentes ampliações: 10 $\mu\text{m}$ , e 3 $\mu\text{m}$ . As setas indicam a formação de crateras (amarelas) e furos (vermelhas) como resultado da degradação enzimática. ....	114
Figura 29 - Espectro de dicroísmo circular obtido em diferentes pH a 25°C e varredura do comprimento de onda de 200 a 260 nm.A) <i>ThCel7B</i> -CCD e B) <i>ThCel7B</i> -full. ....	116
Figura 30 - Gráfico da influência da centrifugação no estudo de reversibilidade de adsorção para <i>ThCel7B</i> -full e <i>ThCel7B</i> -CCD, utilizando avicel como substrato. ....	117
Figura 31 - Gel SDS-PAGE 15% mostrando produção de celobiohidrolase I de <i>Trichoderma harzianum</i> . 1- <i>ThCel7A</i> após processo de purificação 2- Marcador de peso molecular. Destaque para a banda de 70kDa. ....	119
Figura 32 - Efeito do pH na atividade enzimática de <i>ThCel7A</i> utilizando pNPC como substrato e 50°C .....	119

Figura 33 - Gráfico mostrando a quantidade de glicose liberada após a hidrólise enzimática do papel filtro em até 48 horas de reação. <i>ThCel7B</i> (quadrado preto) e <i>ThCel7A</i> (círculo cinza). .....	120
Figura 34 - Gráfico da liberação de glicose após 24 horas de hidrólise do papel filtro por <i>ThCel7B</i> e <i>ThCel7A</i> agindo individualmente e em sinergia. Controle realizado na presença de BSA.....	121
Figura 35 - Gráfico mostrando a influência do pH na glicose liberada a partir da hidrólise do papel filtro por <i>ThCel7A</i> e <i>ThCel7B</i> individualmente e em sinergismo. ....	122
Figura 36 - Gráfico do grau de sinergismo (DS) entre <i>ThCel7B</i> e <i>ThCel7A</i> calculado para papel de filtro e celulose bacteriana em função do tempo . a hidrólise foi realizada em pH 5 e a concentração de açúcar foi quantificada por método de DNS.....	123
Figura 37 - Gráfico mostrando a absorvância medida durante a hidrólise dos monocomponentes. É possível visualizar que a absorvância é sempre maior em celulose bacteriana comparado com papel filtro.....	124
Figura 38 - Imagens de FESEM obtidas da celulose bacteriana. A) Controle antes da hidrólise. B) Após hidrólise com <i>ThCel7A</i> ; C) Após hidrólise com <i>ThCel7B</i> ; D) Após hidrólise com <i>ThCel7A</i> + <i>ThCel7B</i> . Os experimentos foram conduzidos por 48 horas, a 50°C e pH 5. Escala 3µm. ....	125
Figura 39 - Gráfico de glicose liberada pela <i>ThCel7B</i> em substratos de bagaço de cana de açúcar tratados sob diferentes condições. ....	127
Figura 40 - Estrutura de raios-X de <i>ThCel7B</i> -CCD. $\beta$ -jelly roll com o sítio catalítico. Os aminoácidos catalíticos importantes como Glu196 e Glu201 são mostrados na forma de stick, assim como assistente catalítico Asp198. ....	130

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos desenhados para a amplificação dos genes na clonagem. ....	66
Tabela 2 - Lista de tampões utilizados para testar preferência ácida de <i>ThCel7B</i> -CCD. ....	76
Tabela 3 - Composição química dos bagaços de cana de açúcar. ....	94
Tabela 4- Açúcares redutores solúveis e insolúveis gerados por <i>ThCel7B</i> (endoglucanase) e <i>ThCel7A</i> (exoglucanase), agindo individualmente ou em sinergismo. ....	126
Tabela 5- Parâmetros e estatísticas da coleta e processamento dos dados cristalográficos da enzima <i>ThCel7B</i> -CCD. ....	129
Tabela 6 - Parâmetros e estatísticas resultantes do processo de refinamento dos dados cristalográficos da enzima <i>ThCel7B</i> -CCD. ....	130
Tabela 7 - Composição do meio de cultura CM (Complete medium). ....	157
Tabela 8 - Composição do meio de cultura SRM (Selective Regeneration Medium) ....	158
Tabela 9 - Composição do meio MM J ....	158



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AR – Açúcar Redutor**

**ARInsol – Açúcar Redutor Insolúvel**

**ARSol – Açúcar Redutor Solúvel**

**ARTot – Açúcar Redutor Total**

**ARSTot – Atividade Capaz de Liberar Açúcar Redutor**

**ARSEnG – Atividade Capaz de Liberar Açúcar Redutor de Endoglucanase**

**ARSExG – Atividade Capaz de Liberar Açúcar Redutor de Exoglucanase**

**ATA – Ácido Aurintricarboxílico (do inglês *Aurintricarboxylic Acid*)**

**BC – celulose bacteriana (do inglês *Bacterial Cellulose*)**

**CBH – Celobiohidrolase**

**CBM – Módulo de ligação à carboidratos (do inglês *Carbohydrate Binding Module*)**

**CM – Meio completo para o cultivo de *Aspergillus niger* (do inglês *Complete Medium*)**

**CMC – Carboximetilcelulose**

**CZE – Eletroforese capilar de zona**

**DNS – Ácido dinitrosalicílico**

**DS – Grau de sinergismo**

**EG – Endoglucanase**

**FPU – Unidade de papel de filtro (do inglês *Filter Paper Unity*)**

**GH – Hidrolase de glicosídeo (do inglês *Glycosyl Hydrolases*)**

**GP – Grau de polimerização**

**JGI – *Joint Genome Institute***

**IC – Índice de cristalinidade**

**LPMO** – Monooxigenase lítica de polissacarídeo ( do inglês *Lytic polysaccharide mono-oxygenases*)

**LC/MS** – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (do inglês *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*)

**NSRM** – Meio de regeneração não seletivo (do inglês *Non-selective Regeneration Medium*)

**PASC** – Celulose amorfa (do inglês *Phosphoric Acid Swollen Cellulose*)

**PCR** – Reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)

**PEG** – Polietileno glicol

**pNPC** – 4-nitrofenil- $\beta$ -D-celobiosídeo (do inglês *4-nitrophenyl- $\beta$ -D-cellobioside*)

**pNPG** – 4-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo (do inglês *4-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside*)

**SDS-PAGE** - Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

**SH** – meio Hestrin–Schramm

**Solução S/C** – Solução de sorbitol e cloreto de cálcio

**SRM** – meio de regeneração seletivo,

**TA** – Temperatura ambiente

**ThCel7A** – Celobiohidrolase I de *Trichoderma harzianum*

**ThCel7B** – Endoglucanase I de *Trichoderma harzianum*

**ThCel7B-full** – Endoglucanase I de *Trichoderma harzianum* - proteína inteira

**ThCel7B-CCD** – Domínio catalítico da endoglucanase I de *Trichoderma harzianum*

## LISTA DE SÍMBOLOS

Å - Ângstrom

pH - potencial hidrogeniônico

°C - graus Celsius

L - litro

mL - mililitro

µg - micrograma

µL - microlitro

M - molar ( $\text{mol L}^{-1}$ )

mM - milimolar

ng - nanograma

µmol - micromol

µM - micromolar

nm - nanômetro

nM - nanomolar

µm - micrômetro

rpm - rotações por minuto

D<sub>max</sub> - dimensão máxima

R<sub>g</sub> - raio de giro

p(r) - função de distribuição de distâncias

I(q) - intensidade do vetor de espalhamento

λ - comprimento de onda

U - unidade de atividade enzimática

kDa - quilodalton ( $\text{g mol}^{-1}$ )

ε - coeficiente de extinção molar

T<sub>m</sub> - temperatura de melting

K<sub>m</sub> - constante de Michaelis-Menten

V<sub>max</sub> - velocidade inicial máxima

mA - miliampère

Θ - elipticidade

UV - ultravioleta





## SUMÁRIO

1	Introdução .....	29
1.1	Etanol de primeira geração.....	30
1.2	Etanol de segunda geração .....	31
1.3	Biomassa como fonte de energia.....	32
1.3.1	Composição da biomassa – bagaço de cana de açúcar .....	33
1.3.2	Pré - tratamento do bagaço de cana de açúcar .....	37
1.4	Sacarificação da biomassa.....	39
1.4.1	Hidrólise enzimática .....	40
1.4.2	Celulases .....	41
1.4.3	Hidrolases de glicosídeos (GHs).....	42
1.4.3.1	Endoglucanases .....	44
1.4.3.2	Exoglucanases .....	44
1.4.3.3	$\beta$ -glucosidases .....	45
1.4.3.4	Enzimas auxiliares.....	46
1.5	Sinergismo.....	48
1.6	A família GH7 .....	49
1.7	Fungos produtores de celulases.....	50
1.7.1	<i>Trichoderma harzianum</i> .....	51
1.8	Expressão heteróloga em diferentes sistemas de expressão.....	52
1.8.1	Expressão heteróloga em fungo filamentoso <i>Aspergillus niger</i> .....	52
2	Justificativa .....	57
3	Objetivos .....	61
3.1	Objetivo geral.....	61
3.2	Objetivos específicos .....	61
4	Materiais e Métodos .....	65
4.1	Produção das proteínas <i>ThCel7B</i> -full e <i>ThCel7B</i> -CCD em <i>Aspergillus niger</i> .....	65
4.1.1	Clonagem do gene <i>ThCel7B</i> .....	65
4.1.2	Manipulações com <i>A. niger</i> py11 .....	68
4.1.2.1	Obtenção dos protoplastos .....	68
4.1.2.2	Transformação do gene na cepa py11 .....	69

4.1.2.3	Teste de expressão dos transformantes e confirmação da identidade proteica .....	70
4.1.2.4	Produção das enzimas em larga escala.....	71
4.1.2.5	Purificação de <i>ThCel7B</i> -full e <i>ThCel7B</i> -CCD.....	72
4.2	Caracterização bioquímica e biofísica da proteína recombinante.....	73
4.2.1	Estimativa da massa molecular real e do estado oligomérico da proteína por cromatografia de exclusão molecular .....	73
4.2.2	Gel nativo.....	73
4.2.3	Ensaio enzimático e determinação das condições ótimas de atividade quanto pH e temperatura .....	74
4.2.4	Painel pH tampões ácidos .....	75
4.2.5	Especificidade por substratos.....	76
4.2.6	Análise de estabilidade térmica - <i>ThermoFluor</i> ®.....	77
4.2.7	Atividade enzimática residual.....	79
4.2.8	Determinação dos parâmetros cinéticos.....	79
4.2.9	Eletroforese capilar para análise de carboidratos.....	79
4.2.10	Espectroscopia de massas do produto de hidrólise .....	80
4.2.12	Dicroísmo circular (CD) .....	82
4.2.13	Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS).....	83
4.3.1	Adsorção: reversível ou irreversível? .....	85
4.3.2	Ensaio de diluição padrão – sem centrifugação .....	87
4.3.3	Ensaio de diluição – com centrifugação.....	87
4.4	Estudos de sinergismo.....	88
4.4.1	Produção de celobiohidrolase I de <i>Trichoderma harzianum</i> .....	88
4.4.2	Ensaio de atividade <i>ThCel7A</i> - determinação pH e temperatura ótima .....	88
4.4.3	Determinação FPU.....	89
4.4.4	Efeito do pH no ensaio de sinergismo .....	90
4.4.5	Efeito do substrato no ensaio de sinergismo analisado por microscopia eletrônica .....	90
4.4.6	Investigação de sinergia através da análise da liberação de açúcar redutor total, solúvel e insolúvel produzidos na hidrólise .....	92
4.5	Ensaio preliminares utilizando bagaço de cana como substrato.....	93
4.6	Cristalografia de proteínas .....	94
5	Resultados e Discussão .....	99

5.1	Produção em <i>Aspergillus niger</i> .....	99
5.2	Caracterização bioquímica e biofísica .....	101
5.2.1	Estimativa da massa molecular real e estado oligomérico por cromatografia de exclusão molecular .....	101
5.2.2	Estado oligomérico analisado por gel nativo .....	101
5.2.4	Investigação do pH com tampões ácidos .....	104
5.2.5	Clivagem de substratos .....	105
5.2.6	Estabilidade térmica avaliada por Thermofluor.....	107
5.2.7	Atividade residual .....	109
5.2.8	Cinética enzimática .....	110
5.2.9	Eletroforese Capilar de Zona (CZE).....	111
5.2.10	Produto de hidrólise analisado por espectroscopia de massas .....	112
5.2.11	Microscopia eletrônica de varredura com fonte de elétrons por emissão de campo (FESEM).....	113
5.2.12	Dicroísmo circular .....	115
5.2.13	Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS).....	116
5.3	Ligação enzimática improdutiva .....	117
5.4	Sinergismo.....	118
5.4.1	Determinação das condições para ensaios enzimáticos .....	120
5.4.2	Influência do pH no synergismo .....	121
5.4.3	Sinergismo entre <i>ThCel7A</i> e <i>ThCel7B</i> em diferentes substratos.....	122
5.4.4	Análise do synergismo em celulose bacteriana por microscopia eletrônica.....	124
5.4.5	Análise da liberação de açúcar redutor total, solúvel e insolúvel produzidos na hidrólise em synergismo.....	126
5.5	Hidrólise em bagaço de cana de açúcar .....	127
5.6	Cristalografia de proteínas .....	128
6	Conclusões e Perspectivas.....	135
	REFERÊNCIAS .....	139
	Anexos .....	155



# Introdução



*“Qual é a utilidade de um bebê recém-nascido? (Respondeu quando lhe perguntaram qual era a utilidade de uma nova invenção).”*

*— Benjamin Franklin*



## 1 Introdução

O suprimento de energia é o alicerce operacional da sociedade humana em diversos aspectos, passando pelo bem estar individual, até o desempenho econômico. Assim, a Revolução Industrial deu início a uma contínua e extensa exploração da reserva de combustível fóssil que atualmente ainda é crescente e com dimensões preocupantes.

Em um cenário onde houve o aumento da demanda industrial mundial por energia, o advento da tecnologia *flex fuel* para automóveis, a crise do petróleo dos anos 1970 gerando instabilidade nos preços dos barris e a perspectiva de encolhimento dos recursos energéticos em geral, fez com que a preocupação com a questão ambiental e socioeconômica se expandisse, emoldurando e impulsionando a ciência e a tecnologia a desenvolverem maneiras de solucionar os problemas relacionados com a necessidade do aumento de geração de energia, maior produção de alimentos e a redução da poluição do meio ambiente.<sup>1-2</sup>

A produção de etanol lignocelulósico emerge como uma alternativa promissora, utilizando a biomassa para geração de biocombustíveis. No entanto, para tornar possível esta tecnologia, é necessário a hidrólise dos polissacarídeos presentes no bagaço, gerando mono e dissacarídeos e posteriormente a fermentação destes açúcares em etanol.<sup>3</sup>

O mais antigo processo de hidrólise é o que utiliza um ácido concentrado, o qual foi muito estudado, mas que apresenta desvantagens limitantes para o uso desse processo em escala industrial, como a alta formação de inibidores da fermentação, enorme gasto energético e alto consumo de ácido e de hidróxido de cálcio para neutralização.<sup>4</sup> Assim, diante dessas desvantagens, a hidrólise enzimática é considerada o processo mais promissor e conta com ação de enzimas celulolíticas (celulases).<sup>5</sup> Um dos desafios relacionados com a hidrólise enzimática, é a produção de enzimas mais eficientes, com atividade elevada e que possuam estabilidade e especificidade, além de torná-las economicamente viáveis, diminuindo os custos de produção das mesmas, já que este é consideravelmente alto.<sup>6</sup>

No presente trabalho, nosso foco é voltado para o processo biotecnológico da produção de etanol de segunda geração, através da hidrólise enzimática da biomassa. Nossa contribuição se deu através do estudo de uma endoglucanase I (Cel7A) que compõe o complexo celulolítico do fungo *Trichoderma harzianum*, descrito como eficiente produtor de celulases e hemicelulases. Os dados aqui mostrados incluem a caracterização bioquímica, biofísica e estrutural dessa enzima, e

nos possibilita assim, obter uma melhor compreensão do mecanismo de ação dessa enzima bem como de outras celulasas relacionadas.

## 1.1 Etanol de primeira geração

O aumento da frota automotiva brasileira, alterou o quadro de demanda de combustíveis. Concomitantemente, a crise do petróleo na década de 70 elevou o preço do barril desta matéria prima, aquecendo a discussão sobre alternativas reais ao uso de petróleo. Assim, a preocupação com a diminuição e até mesmo com o esgotamento de reservas petrolíferas, aliada ao efeito inflacionário que a importação de combustíveis fósseis provocam na balança comercial e a crescente preocupação com a questão acerca da poluição ambiental, vislumbrou-se a utilização de um combustível alternativo.

Historicamente, desde 1931, o etanol fabricado a partir da cana de açúcar está inserido no cenário nacional como combustível. Através de jogadas políticas com o intuito de atender ao interesse dos produtores do setor sucroalcooleiro, tornou-se obrigatória a mistura de etanol à gasolina.<sup>7</sup> Um pouco mais tarde, em 1975, foi lançado então o Programa Nacional do Álcool (PRÓALCOOL) com a finalidade de expandir a produção e o uso do etanol, tanto na indústria química quanto como combustível. Em 2003, com o advento da tecnologia *flex-fuel*, a alta demanda por etanol hidratado se tornou uma realidade consolidada.

Como segundo maior produtor de etanol do mundo atualmente, atrás apenas dos EUA, o Brasil visa aumentar a produção deste biocombustível. No momento, a produção de etanol no país é feita em sua grande parte, por meio de tecnologias de primeira geração baseadas na utilização do conteúdo de sacarose presente no suco da cana.

A Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), promove desde 2005 estatísticas a respeito da safra brasileira de cana de açúcar. No último boletim gerado em dezembro de 2015 sobre as estatísticas da safra de 2016, estima-se que o Brasil produza 658,7 milhões de toneladas de cana de açúcar em cerca de 9 milhões de hectares. Essa produção representa um aumento de, aproximadamente 4% em relação à safra de 2015, sendo que esse incremento só não é maior devido a um decréscimo na área plantada de aproximadamente 0,1% o que corresponde a pouco mais de 85 mil hectares. Os quase 660 milhões de toneladas de cana originarão cerca de 35 bilhões de toneladas de açúcar e 29 bilhões de litros de etanol, sendo que o etanol hidratado,



utilizado nos veículos *flex fuel*, terá um aumento na produção, de quase 7,5%, quando comparado com a produção da safra anterior.<sup>8</sup>

Apesar do incremento na produção da safra atual, dados relacionados ao Plano Decenal de Expansão da Energia 2024 (PDE 2024) divulgados pela Empresa de Pesquisa energética (EPE), prevê um aumento de aproximadamente 4,5% ao ano na demanda brasileira por etanol até 2024, ou seja, a produção deste combustível teria que ser da ordem de 40 bilhões de litros.<sup>9</sup>

Tal cenário demonstra o descompasso entre o crescimento da demanda potencial e da oferta, aliado a temporadas de preços favoráveis ao açúcar onde observamos a queda da produção de etanol. Fica claro que a produção atual de etanol será insuficiente para atender à necessidade por combustível e, por consequência, o déficit de produção será inevitável.

## **1.2 Etanol de segunda geração**

Atualmente, os esforços para atender o aumento da demanda por álcool combustível tanto no Brasil quanto em outros países são baseados, principalmente, na construção de novas usinas e, conseqüentemente, no aumento da área plantada para o cultivo de cana de açúcar.<sup>10</sup> Porém, causas como a concorrência limitada com a produção de alimentos e o aumento do desmatamento dificultam a expansão do cultivo desta monocultura, e como já descrito pela Conab, o aumento da área plantada tem sido mínimo ou nulo, tornando necessário o desenvolvimento de novas tecnologias e melhorias em processos já em vigor para obtenção de mais etanol por tonelada de cana.

Neste cenário, aproveitar a área de plantio existente, bem como as plataformas de produção já estabelecidas, utilizando os resíduos de uma primeira geração de etanol (bagaço da cana), além de outras fontes da biomassa, para uma segunda geração de biocombustíveis é economicamente e potencialmente viável. Surge assim, o conceito de etanol lignocelulósico ou etanol de segunda geração (2G), que vem ganhando destaque nas pesquisas científicas atuais a nível de interesse mundial.

### 1.3 Biomassa como fonte de energia

As fontes de energia podem ser não renováveis ou renováveis (Figura 1). As fontes de energia fósseis ocorrem quando a sua formação se dá por meio de processos naturais, os quais ocorreram há milhares de anos atrás e são portanto, não renováveis. O principal recurso de energia fóssil utilizado no âmbito de combustível é o petróleo. As fontes de energia renováveis são aquelas em que os recursos naturais utilizados são capazes de se regenerar, ou seja, são consideradas inesgotáveis e limpas. Os exemplos de fontes de energias renováveis são o sol, vento, chuva, marés, calor e biomassa.



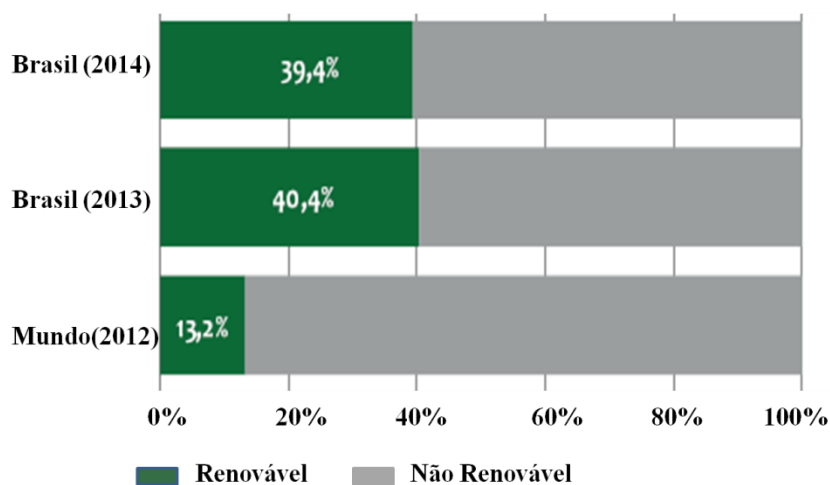
**Figura 1-** Representação esquemática dos ciclos de fontes de energia não renovável e renovável.  
**Fonte:** Adaptada de CLASH.<sup>11</sup>

A biomassa pode ser definida como todo recurso renovável, oriundo de matéria orgânica de origem animal ou vegetal, a qual pode ser transformada em energia. As tecnologias de conversão de biomassa para formas utilizáveis comercialmente variam em termos de escala, qualidade do combustível e custo. O uso da biomassa para a produção de energia diminuiu gradualmente ao longo da história da humanidade, devido à utilização maciça de combustíveis fósseis. Porém, atualmente é uma das fontes para produção de energia com maior potencial de crescimento e considerada o único recurso natural renovável à base de carbono, e com potencial para substituir os combustíveis fósseis.<sup>12</sup>

A biomassa vegetal é formada através de fotossíntese que produzem fibras vegetais, formando os polímeros naturais, incluindo hemicelulose, celulose e lignina. Também conhecida

como biomassa lignocelulósica, é fonte potencial de bioenergia e identificada como uma matéria prima importante para a produção de biocombustíveis.

Há um grande número de tecnologias de conversão energética da biomassa e que podem ser implementadas tanto em pequena, quanto em larga escala. Dentre essas tecnologias, podemos citar a geração de biocombustíveis. Nos últimos anos, a participação de energias renováveis na matriz energética brasileira manteve-se entre as mais elevadas do mundo, com 39,4%, conforme podemos observar na Figura 2.



**Figura 2** - Matriz energética brasileira em 2014. As fontes renováveis de energia correspondem a 39,4%.  
**Fonte:** Adaptada de BRASIL.<sup>9</sup>

Dos 39,4% de energia renovável referente à 2014, aproximadamente 16% advém da biomassa da cana de açúcar.<sup>9</sup> Entender a estrutura e a composição da biomassa lignocelulósica é fundamental para compreender a bioconversão da celulose, em açúcares fermentáveis para produção de biocombustível.

### 1.3.1 Composição da biomassa – bagaço de cana de açúcar

O bagaço de cana é o principal subproduto da indústria sucroalcooleira. Depois de moída a cana para extração do caldo, o bagaço é obtido como um resíduo que corresponde a cerca de 25% do peso total e contém de 60% a 80% de carboidratos. A fermentação desses hidratos de carbono podem aumentar significativamente a produtividade de bioetanol.<sup>13</sup>

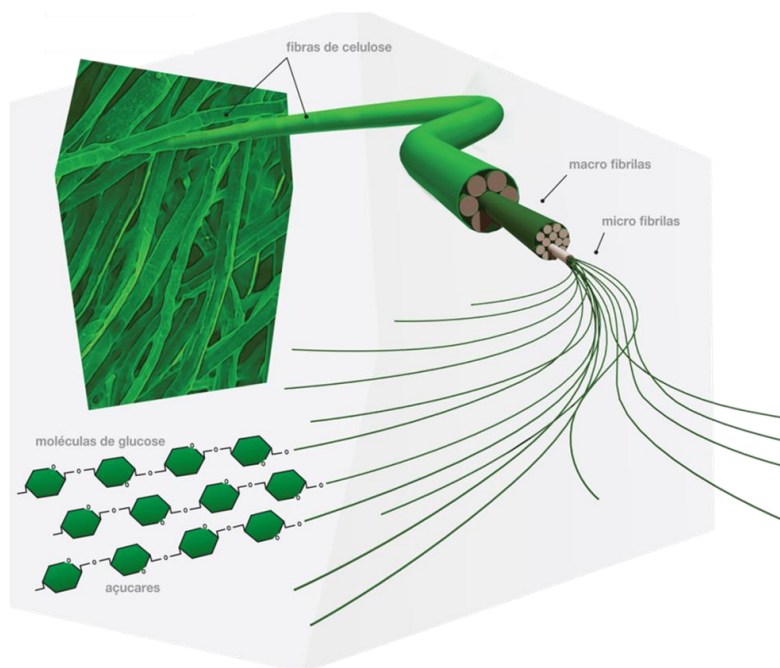
A cana de açúcar (*Saccharum* sp.) é uma angiosperma, pertencente à classe *Liliopsida* (monocotiledônea), subclasse *Commelinidae*, ordem *Poales* (*Cyperales*) e família *Poaceae*

(*Gramineae*). Dependendo das proporções de celulose, hemicelulose e pectina, as paredes celulares são classificadas em tipo I, II ou III. As monocotiledôneas comelinóides (cana de açúcar), possuem parede celular do tipo II, onde as hemiceluloses formam uma rede juntamente com a celulose e, desta forma, a lignina se mantém associada através de ligações cruzadas, tornando esta estrutura mais rígida e hidrofóbica.

A lignina corresponde de 10 a 25% da massa seca da biomassa,<sup>14</sup> é um polímero amorfo, formado por unidades de fenilpropano. Ela preenche os espaços na parede celular e encontra-se covalentemente ligada à celulose e hemicelulose, sendo sua função primária promover o suporte estrutural da planta. A lignina também promove à parede celular alta resistência à degradação enzimática e seu conteúdo, bem como sua distribuição são reconhecidos como fatores importantes que determinam a recalcitrância da parede celular para a hidrólise.<sup>15-16</sup>

As pectinas também fazem parte da composição da parede celular, são um grupo complexo, heterogêneo e bastante diverso de oligos e polissacarídeos formadas, primariamente, de ácido galacturônico unidos por ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,4. A pectina encontra-se associada a outros componentes na parede celular vegetal e sua principal função é efetuar a ligação das paredes celulares de células adjacentes.<sup>17</sup>

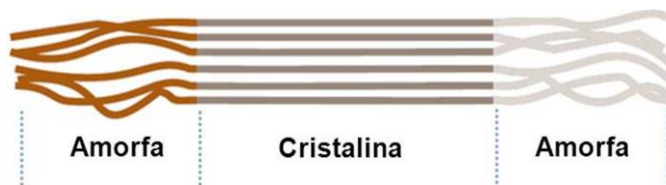
Os açúcares covalentemente ligados, constituintes da celulose e hemicelulose, representam uma vasta matéria-prima renovável para a produção de combustíveis. Devido a sua prevalência nas plantas, a celulose consiste no mais abundante e renovável polímero da Terra.<sup>18</sup> Ela possui função estrutural e é sintetizada por uma complexa maquinaria enzimática durante a síntese da parede celular.<sup>19</sup> A celulose é um polímero de moléculas de glicose unidas por forte ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4 (Figura 3) e seu comprimento pode variar de 10 a 15 mil resíduos, de acordo com a sua origem, grau de maturação da parede celular, o tempo de envelhecimento e o processamento no qual as fibras foram submetidas.<sup>20</sup>



**Figura 3** - Representação da fibra de celulose, formada por macro fibrilas originadas de micro fibrilas a partir de monômeros de glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4.  
**Fonte:** Adaptada de FLORESTA.<sup>21</sup>

Há duas propriedades importantes relacionadas com a celulose que influenciam na taxa de hidrólise enzimática, que são o grau de polimerização e o índice de cristalinidade. O grau de polimerização (GP), diz respeito ao comprimento médio das moléculas de celulose e determina o número médio de unidades de glicose para cada cadeia de celulose, ou seja, refere-se à frequência de ligações glicosídicas disponíveis para a ação das celulasas.<sup>22</sup> O índice de cristalinidade está relacionado com a reatividade do substrato e indica a quantidade de celulose que se encontra em estado cristalino, sendo um fator importante para determinar as propriedades mecânicas dos materiais lignocelulósicos.<sup>23</sup>

Dependendo das ligações de hidrogênio inter e intramoleculares, as fibrilas de celulose possuem algumas áreas ordenadas e outras desordenadas, denominadas cristalinas e amorfas, respectivamente (Figura 4). A região cristalina da celulose possui uma forte rede de interações de hidrogênio inter-cadeias e, devido à sua estrutura, é altamente resistente à hidrólise química e enzimática. Já a porção amorfa da celulose, possui regiões distorcidas ao longo das fibras cristalinas, o que contribui para tornar essa porção mais fácil de ser hidrolisada. A diferença entre as ligações de hidrogênio também influenciará no grau de polimerização da celulose, com diferentes estruturas cristalinas, micro cristalinas e amorfa.<sup>24</sup>



**Figura 4** - Representação de região cristalina intercalada por regiões amorfas da fibra de celulose.  
**Fonte:** Adaptado de COTTON...<sup>25</sup>.

Um segundo tipo de polissacarídeo importante e abundante da parede celular, com composição variando de 15 a 35%,<sup>26</sup> é a hemicelulose. No caso específico do bagaço de cana de açúcar, esta composição é de aproximadamente 24%.<sup>27</sup> Também conhecida como poliose, a hemicelulose é responsável pela flexibilidade nas plantas, é um polímero ramificado e de baixa massa molar. Pode se extraída com tratamento alcalino e é composta por unidades aleatórias de monossacarídeos contendo, principalmente, pentoses (D-xilose, L-arabinose e L-ramnose) mas também hexoses (D-glucose, D-manose e D-galactose) e ácidos urônicos (ácido 4-O-metilglucurônico e ácido galacturônico), dependendo do tipo da planta.<sup>28</sup> As pentoses, hexoses e ácidos urônicos são unidos por ligações  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4) e, conforme o estágio de desenvolvimento e tipo de tecidos, várias subclasses de hemiceluloses são encontradas. Xiloglucano, xilano, glucomanano e arabinoxilano são os principais componentes da hemicelulose presentes em plantas.<sup>29</sup>

O xiloglucano é um polissacarídeo de reserva, composto por uma cadeia principal de glicoses e ramificações de xiloses, as quais também podem estar associadas a resíduos de galactose e fucose. O xilano é abundante nas plantas com parede celular secundária e constitui o principal componente da hemicelulose<sup>30</sup>. Sua cadeia principal é formada por xilose, e as ramificações podem ser L-arabinose, D-galactose e ácido glucurônico. As cadeias laterais, além de determinar a solubilidade, conformação física e a reatividade da molécula de xilano com outros componentes hemicelulósicos, apresentam grande influência no modo e na extensão da clivagem enzimática.<sup>31</sup>

O manano é um importante componente da hemicelulose, podendo ser linear ou hétero-manano (glucomanano e galactomanano). O glucomanano é composto pela cadeia principal de manoses intercaladas com glicose, enquanto que no galactomanano, a manose é intercalada com a galactose. A relação entre os diferentes resíduos de açúcar, altera as propriedades do manano e é característica de cada espécie de planta.<sup>32</sup> O arabinoxilano é um polissacarídeo composto por

cadeia principal linear de xilose e ramificações de arabinoses, e que representa de 25 a 33% da parede celular da cana de açúcar.<sup>33</sup>

Em monocotiledôneas comelinóides, o xiloglucano não representa a hemicelulose mais abundante na parede celular,<sup>34</sup> sendo o arabinoxilano e o  $\beta$ -glucano os polissacarídeos encontrados em maiores proporções.<sup>35</sup> Outra característica da hemicelulose, é a de possuir um grau de polimerização menor em relação à celulose, além de não ser cristalina, o que facilita a digestão enzimática.<sup>20</sup>

### 1.3.2 Pré - tratamento do bagaço de cana de açúcar

Em uma biorrefinaria lignocelulósica, a matéria prima pode ser convertida em biomateriais ou energias úteis, maximizando o valor econômico da biomassa. No entanto, a composição química dos materiais lignocelulósicos é um fator crucial que afeta diretamente a produção de biocombustíveis durante o processo de conversão dos açúcares. Para obtenção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos são necessárias basicamente três etapas: pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação.

Como os materiais lignocelulósicos apresentam uma estrutura complexa e compacta, primeiramente, a biomassa deve ser submetida à pré-tratamentos para remoção de lignina, redução da cristalinidade da celulose e aumento da porosidade do material, expondo a celulose e a hemicelulose à hidrólise enzimática.<sup>36</sup>

Os métodos de pré-tratamento se referem à solubilização e a separação de um ou mais componentes da biomassa, e representa uma etapa imprescindível na rota de produção. O pré-tratamento pode ser químico, físico ou biológico.<sup>37</sup> Os tratamentos químicos são os mais utilizados, já que são os mais eficientes no aumento da degradação da biomassa.

O pré-tratamento químico pode utilizar bases ou solventes orgânicos, porém geralmente consiste na utilização de ácidos (sulfúrico, clorídrico e fosfórico) com o objetivo de romper a estrutura lignocelulósica por meio da solubilização da hemicelulose. O tratamento ácido pode ser conduzido com ácidos em diferentes concentrações, porém, devido à formação de compostos inibidores e de corrosão de equipamentos, ácidos concentrados têm sido evitados.<sup>38</sup> Além da concentração, no tratamento ácido a temperatura é um fator importante no controle da degradação de açúcares e na formação de produtos tóxicos. Em altas temperaturas, os açúcares da

hemicelulose são rapidamente degradados, produzindo ácido acético e furfurais, inibidores da fermentação.<sup>3</sup>

Já o tratamento químico alcalino, utiliza-se de bases (hidróxido de sódio e cálcio, amônia e ureia), é bastante popular, porém degradam menos a celulose.<sup>39</sup> Este tipo de pré-tratamento é baseado na quebra das ligações glicosídicas e dos ésteres da xilana, presentes na hemicelulose, o que resulta na alteração estrutural da lignina e inchaço da celulose, aumentando a porosidade e acarretando a descristalização do material lignocelulósico.<sup>40</sup> A utilização de bases tem menor impacto inibitório ao processo de fermentação em relação ao tratamento ácido, e também é menos corrosivo. No entanto, utiliza uma quantidade muito grande de água, além de ser difícil de recuperar o álcali.<sup>3</sup>

Um tipo de pré tratamento químico muito conhecido, é o organossolve, que utiliza solventes orgânicos, (etanol, metanol, propanol e acetona), e promove a deslignificação do material lignocelulósico, através do rompimento das ligações de hidrogênio entre as microfibrilas de celulose e solubilização da lignina e de parte da hemicelulose.<sup>41</sup> Uma grande desvantagem desse método, é que ele requer grandes quantidades do solvente, um reagente de custo elevado.<sup>42</sup>

Outros tipos de pré tratamento são o físico e o biológico. O físico utiliza o estresse mecânico para triturar a matéria prima em partículas menores, aumentando assim, a área superficial e diminuindo o grau de polimerização, contribuindo para melhorar a atividade enzimática.<sup>43</sup> Exemplos de pré tratamento físico são: moagem e trituração (bola, energia vibratória, rolo duplo, pressão, martelo); radiação (raios de elétrons, raios  $\gamma$ , micro-ondas); altas temperaturas (pirólise, explosão a vapor). Dentre esses, a explosão a vapor para o pré-tratamento da biomassa é o mais promissor para a viabilização de uma rota de produção de etanol de segunda geração. Este método separa a celulose, hemicelulose e lignina, e aumenta a susceptibilidade à bioconversão.<sup>44</sup> Porém, apesar de promissora, ajustes são necessários para aplicação desta técnica em escala industrial, principalmente relacionado à viabilidade econômica do processo

O pré tratamento biológico envolve a utilização de microrganismos, sendo que os degradadores de lignina mais eficientes estudados, são os conhecidos como fungos da podridão branca, como o *Phanerochaete chrysosporium*.<sup>45</sup> Estes microrganismos secretam enzimas capazes de remover a lignina enzimaticamente, além da redução do grau de polimerização da



celulose e hemicelulose. Embora a hidrólise enzimática desses carboidratos seja eficaz, estes organismos consomem também a celulose, reduzindo o rendimento da hidrólise.<sup>46</sup>

Um pré-tratamento eficiente deve diminuir o grau de polimerização das moléculas de celulose, disponibilizar açúcares fermentáveis em alta quantidade e tornar acessível a hidrólise enzimática. Além disso, o pré-tratamento deve evitar formação de subprodutos inibidores dos processos de hidrólise e ser economicamente viável. Apesar de amplo o estudo e experimentação ao longo dos últimos anos, ainda é necessário o desenvolvimento de alternativas tecnológicas eficientes em termos de custo global e competitividade econômica relacionado com os pré-tratamentos atuais.

#### **1.4 Sacarificação da biomassa**

Atualmente, grande parte do bagaço gerado na usina é consumido para produção de energia por meio da co geração, tornando a usina auto sustentável energeticamente. No entanto, iniciativas políticas e econômicas dedicadas ao etanol 2G têm aberto a possibilidade para a produção de biocombustíveis. Para a obtenção de açúcares fermentescíveis provenientes de materiais lignocelulósicos, existem basicamente duas técnicas: a hidrólise ácida, a qual utiliza de ácido concentrado e/ou diluído e a hidrólise enzimática.

Na hidrólise ácida, a hemicelulose e celulose presentes na biomassa são quebradas, utilizando-se de ácidos fortes como o ácido sulfúrico e o clorídrico, em concentrações variáveis de 30 a 70%. Na hidrólise com ácido concentrado, a recuperação de açúcar pode chegar em até 90%, e é realizada a baixas temperaturas, o que torna o processo mais vantajoso se comparado com o processo com ácido diluído. Um problema é o fato da fração de hemicelulose ser hidrolisada mais rapidamente que a fração de celulose, expondo os açúcares no meio reacional por um tempo grande, levando à degradação e perda desses monossacarídeos. Além disso, esse método requer equipamentos de alto custo, os quais devem ser capazes de resistir à corrosão; além de também grande gasto energético para recuperação dos ácidos, assim como necessidade de neutralização devido a problemas ambientais.<sup>47-48</sup>

A hidrólise com ácidos diluídos é mais comumente usada, uma vez que parte da hemicelulose e da celulose são hidrolisadas separadamente. Deste modo, a hemicelulose que é hidrolisada pode ser removida após o primeiro passo da hidrólise e as condições otimizadas. O

problema relacionado com esta técnica, é a utilização de temperaturas elevadas (cerca 200 °C), o que leva a uma quantidade considerável de açúcares e lignina solúvel degradados e, conseqüentemente, a formação de produtos inibidores da fermentação. Com isso, o rendimento de glicose cai para cerca de 50 a 70%.<sup>49</sup>

Frente às desvantagens apresentadas pela hidrólise ácida, as rotas enzimáticas aparecem como opções promissoras, em virtude da possibilidade de atingir altos rendimentos glicosídicos e das técnicas modernas de biotecnologia que visam a otimização desta etapa, crucial no desenvolvimento da tecnologia de etanol de segunda geração.

#### **1.4.1 Hidrólise enzimática**

O objetivo final do processo é a conversão de resíduos lignocelulósicos em combustíveis, na tentativa de aumentar a produção de etanol, tanto de forma isolada, ou combinada com pré-tratamentos da biomassa.<sup>50</sup> Assim, após o pré-tratamento nas condições adequadas, o material lignocelulósico pode ser submetido à hidrólise enzimática, a qual é realizada por enzimas produzidas por microrganismos. No entanto, devido à grande quantidade de enzimas necessárias e ao alto custo da produção dessas enzimas no mercado, a hidrólise enzimática da celulose apresenta-se ainda como um processo oneroso, sendo considerada o grande gargalo na produção de bioetanol e isso devido o elevado custo de produção das enzimas.<sup>51</sup>

Nesse sentido, significativos esforços têm sido despendidos por diversas universidades e empresas com o objetivo de reduzir custos. Tais esforços estão focados na engenharia genética de proteínas conhecidas, na identificação de novas enzimas e no sinergismo dessas enzimas selecionadas.

Há várias vantagens da hidrólise enzimática em relação à hidrólise ácida, como por exemplo, ser realizada em condições mais amenas, geralmente em pH igual a 4,8 e temperatura entre 45-50 °C. A hidrólise enzimática também é vantajosa pelo fato de não apresentar problemas relacionados com corrosão.<sup>52</sup> Outra grande vantagem é a especificidade das enzimas, o que evita a degradação do produto final de interesse, a glicose.<sup>53</sup>

Além da utilização para produção de biocombustível, o mercado de produção e utilização de enzimas é bastante diversificado e altamente rentável, sendo que os maiores consumidores são

as indústrias de detergentes, alimentos, rações, papel, química fina e fármacos, além da indústria têxtil e de manufatura de couros.<sup>54</sup>

Na natureza, muitos microrganismos evoluíram para uma maquinaria enzimática adequada para converter a celulose em fonte de alimento e energia. Dentre esses, os fungos filamentosos desempenham um papel essencial, uma vez que produzem uma vasta gama de enzimas celulolíticas e são responsáveis pela degradação da biomassa.<sup>55</sup> Considerando a complexidade da parede celular de plantas, observa-se nesses organismos, uma vasta maquinaria enzimática para sintetizar e modificar os carboidratos, ou seja, um complexo de enzimas com função sinérgica para quebrar os polissacarídeos.<sup>56</sup>

Em 1950, Reese e colaboradores relataram que, embora houvesse muitos fungos capazes de hidrolisar derivados de celuloses, apenas alguns tinham a capacidade de crescer em celulose cristalina, como algodão.<sup>57</sup> Desde então, *T. reesei* se tornou o microrganismo mais utilizado para estudar as enzimas capazes de hidrolisar celulose.

Dentre as diferentes classes de enzima, destacam-se: glicosiltransferases (GTs); carboidrato esterases (CEs); polissacarídeo-liases (PLs); proteínas com atividades auxiliares (AAs); módulos de ligação a carboidratos (CBMs) e hidrolases de glicosídeos (GHs).

## 1.4.2 Celulases

As enzimas do complexo celulolítico são hidrolases que clivam ligações glicosídicas e são classificadas pela *Enzyme Commission* (EC) de acordo com o seu local de atuação no substrato celulósico, com a codificação 3.2.1.x, onde x varia com o tipo de celulose avaliada.

As pesquisas envolvendo as celulases, tiveram início no começo dos anos 50, devido ao seu enorme potencial de converter a celulose, a mais abundante e renovável fonte de energia na Terra, em glicose e açúcares solúveis.<sup>58-59</sup>

O modo de ação mais conhecido das celulases é o modelo "C1-Cx", proposto por Mandels e Reese<sup>57</sup>, no qual descreveram o papel das enzimas C1 como as necessárias para o ataque sobre a celulose cristalina, e as enzimas Cx, necessárias para a hidrólise de derivados de celulose em açúcares solúveis. As enzimas Cx foram identificadas como: endo-(1-4)- $\beta$ -glucanases, exo-(1-4)- $\beta$ -glucanases, e  $\beta$ -glucosidases. Já durante os anos 60, foi considerado que C1 e Cx trabalhavam de maneira sinérgica para hidrolisar a celulose cristalina, embora não houvessem evidências

moleculares. Durante esse período, uma nova proposta sugeria que C1 seria uma proteína capaz de diminuir a cristalinidade da celulose, através do deslocamento de ligações de hidrogênio das microfibrilas, deixando a estrutura mais disponível para ação das Cx.

Outras propostas foram lançadas ao longo do tempo envolvendo C1 e Cx.<sup>60</sup> Em 1973, um trabalho mostrou que uma exoglucanase de *Trichoderma viride*, era altamente ativa em celulose cristalina e forte candidata de ser a C1.<sup>61</sup> Esta enzima foi então classificada como 1,4- $\beta$  celobiohidrolase ou CBHI. No final da década de 1990, um novo modelo, descrevia que as endoglucanases atacavam as regiões superficiais da celulose amorfa de microfibrilas, revelando novos locais de clivagem para as exoglucanases, as quais então, atacavam as extremidades livres de celulose disponíveis. Ao final do processo, as  $\beta$ -glicosidades convertiam a celobiose em glicose.

Atualmente, sabe-se que os mecanismos de ação das celulases ainda são relacionados com conceito original Cx/C1 de Reese, mas com algumas modificações da visão clássica, tais como a descoberta de novas enzimas, as quais serão abordadas a seguir.

### 1.4.3 Hidrolases de glicosídeos (GHs)

Desde a sua criação em 1998, o Banco de Dados que relaciona as Enzimas Ativas em Carboidratos ([www.CAZy.org](http://www.CAZy.org)) tornou-se um recurso inestimável em enzimologia, com uma lista de diferentes classes de enzimas conhecidas por atuarem em carboidratos.<sup>62</sup> Uma dessas classes de proteínas com mais de 100 famílias caracterizadas,<sup>28</sup> é a das hidrolases de glicosídeos (GHs – *Glycosyl Hydrolases*), enzimas responsáveis pela clivagem das ligações  $\beta$ -1,4 que unem monômeros de glicose na celulose.

Inicialmente componentes do sistema celulolítico foram classificados com base no modo de ação catalítica, mas atualmente são classificados considerando suas propriedades estruturais.<sup>63-</sup><sup>64</sup> As hidrolases de glicosídeos agrupam as chamadas celulases endoglucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanases (EC 3.2.1.74) e também as  $\beta$ -glucosidases (EC 3.2.1.21). As celulases são distinguidas de outras hidrolases de glicosídeos por sua habilidade em hidrolisar ligações  $\beta$ -1,4 entre os resíduos glicosil.<sup>65</sup>

Em geral, as hidrolases de glicosídeos possuem como resíduos catalíticos no sítio ativo dois principais aminoácidos: aspartato e glutamato, cujas cadeias laterais estão envolvidas na

assistência ácido/base, a qual é responsável pelo rompimento enzimático das ligações  $\beta$ -1,4 glicosídicas da celulose. Os produtos da hidrólise podem resultar da inversão ou retenção da configuração do carbono anomérico, dependendo da natureza do nucleófilo. Se o nucleófilo é um grupo carboxilato da enzima, então ocorre um mecanismo de duplo deslocamento e a reação é de retenção.<sup>66</sup> Na primeira reação, há a glicosilação, onde o grupo carboxila promove uma reação ácido catalisada, simultaneamente ao ataque nucleofílico do outro grupamento carboxila, formando então, o intermediário glicosil-enzima. Na segunda etapa, ocorre a deglicosilação e o primeiro resíduo funciona como uma base ativando o novo agente nucleofílico, hidrolisando o intermediário glicosil-enzima, liberando assim o produto.<sup>65-67</sup> O mecanismo de retenção também é conhecido como o mecanismo clássico e, até o momento, a maioria das enzimas caracterizadas tende a adotá-lo.

O outro mecanismo, de inversão, ocorre uma única reação, de substituição nucleofílica, o que ocasiona a mudança na configuração  $\beta$ -glicosídica para a forma  $\alpha$ -glicosídica. Neste mecanismo, ocorre a protonação do oxigênio glicosídico pelo ácido geral e a liberação do grupo de partida é concomitante com o ataque nucleofílico de uma molécula de água que foi desprotonada pela base geral.

Ambos os mecanismos, inversão ou retenção, ocorrem de forma concertada e sendo assim, a distância entre os resíduos catalíticos é o que define que tipo deve ocorrer. O mecanismo de inversão ocorre somente quando há espaço para uma molécula de água penetrar a região entre o resíduo básico e o sítio de ataque nucleofílico no substrato. Sabe-se que a distância média entre os dois resíduos é de aproximadamente 5,5 Å para as enzimas com o método de retenção e 10 Å para as enzimas de inversão.

Estruturalmente, a maioria das GHs têm uma organização estrutural bi-modular, sendo o C-terminal um módulo de ligação à celulose (CBM), e o N-terminal, um domínio catalítico (CCD), e estes domínios são ligados por um *linker* flexível e O-glicosilado, rico em prolínas, serinas e treoninas.<sup>68-69</sup> Há estudos que demonstram que o *linker* está relacionado com a atividade enzimática, uma vez que quando deletado e/ou reduzido há alteração da hidrólise, sugerindo que seu comprimento é importante para garantir a flexibilidade e ação independente desses dois domínios.<sup>70</sup> O CCD é responsável pela quebra enzimática dos substratos,<sup>71</sup> enquanto que a função do CBM seria a de aumentar a concentração de enzimas no substrato insolúvel, facilitando o processo de adsorção da enzima à fibra.<sup>72</sup>

### 1.4.3.1 Endoglucanases

As endoglucanases (EGs) também conhecidas como endo  $\beta$ -1,4-glucanases (EC 3.2.1.4), são as enzimas do complexo celulolítico responsáveis por iniciar a hidrólise e desempenham um papel importante na conversão de biomassa através da clivagem de ligações glicosídicas internas  $\beta$ -1,4 da celulose. Elas também são capazes de hidrolisar ligações  $\beta$ -1,4 em D-glucanas que contenham as ligações  $\beta$ -1,3.<sup>73</sup> As EGs atacam, aleatoriamente, os múltiplos sítios internos das regiões amorfas da fibra de celulose, liberando oligossacarídeos de diferentes graus de polimerização (GP) e, conseqüentemente, novos terminais, tanto redutor (quando a glicose possui uma hidroxila heterosídica livre) quanto não redutor (quando a hidroxila heterosídica da molécula da extremidade participa da ligação com a glicose adjacente). Deste modo, as EGs disponibilizam sítios para o ataque subsequente das celobiohidrolases.<sup>73</sup>

A ação da endoglucanase ao longo da cadeia de celulose reduzindo o grau de polimerização é possível devido ao fato do seu sítio ativo possuir a forma de fenda. Uma vez que, regiões de menor organização estrutural possuem cadeias que não estão envolvidas em interações de hidrogênio intermoleculares tão fortes quanto as que ocorrem nas regiões cristalinas, ocorre uma maior exposição das ligações glicosídicas mais internas dessas regiões, tornando-as mais facilmente atacadas.<sup>68</sup> O modo de ação das endoglucanases é responsável pela rápida solubilização do polímero celulósico por meio de sua fragmentação em oligossacarídeos. Isso faz com que as EGs sejam extremamente importantes no processo de hidrólise da biomassa.<sup>74</sup> Em fungos aeróbicos as principais famílias de endoglucanases encontradas são GH5, GH6, GH7, GH9, GH12 e GH45.<sup>75</sup>

### 1.4.3.2 Exoglucanases

O grupo das exoglucanases é constituído, majoritariamente, pelas enzimas celodextrinases (EC 3.2.1.74), e pelas celobiohidrolases (EC 3.2.1.91). As celodextrinases são pouco reportadas embora sejam de extrema importância uma vez que são capazes de liberar glicose diretamente do polímero. Já o grupo das celobiohidrolases (CBH) é bastante reportado na literatura, sendo a CBH, a enzima mais estudada na atualidade.<sup>73</sup>

As celobiohidrolases atuam processivamente nas extremidades redutoras e não redutoras da cadeia de celulose geradas pela ação das endoglucanases e, liberando, majoritariamente,

celobiose.<sup>76</sup> Essas enzimas também podem atuar descascando as cadeias de celulose da estrutura microcristalina.<sup>69</sup>

As enzimas do tipo I (CBH I) são responsáveis por atuar nas extremidades redutoras, e as do tipo II (CBH II) hidrolisam os terminais não redutores. As celobiohidrolases possuem uma alta especificidade para a celulose insolúvel, como a celulose microcristalina e atuam com menor eficiência sobre celulose solúvel devido impedimento estereoquímico causado pelos grupos substituintes, carboximetílico (CMC) ou hidroxietílico (HEC). Além disso, ordinariamente, as CBHs sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (celobiose).

Estruturalmente, as celobiohidrolases apresentam uma região na forma de “gancho”, com função de captar a fibra celulósica, facilitando o seu acesso ao sítio catalítico. O sítio ativo possui a forma de um túnel por onde a cadeia de celulose penetra e sofre a hidrólise de suas ligações glicosídicas.<sup>76-77</sup>

A CBHI é a proteína, predominantemente, secretada pela maioria dos microrganismos produtores de celulases. O gênero *Trichoderma sp.* é um exemplo, uma vez, que quando cultivados para a produção de celulases, secretam uma porcentagem de celobiohidrolase de até 60% do total de proteínas.<sup>78</sup> Deste modo, as CBHs são consideradas as enzimas chaves no processo de hidrólise enzimática e muito importante para as indústrias que atuam na conversão de celulose.<sup>79</sup>

### 1.4.3.3 $\beta$ -glicosidases

As  $\beta$ -glicosidases (EC 3.2.1.21), também conhecidas como celobiasas, são enzimas capazes de hidrolisar as moléculas de celobiose e pequenos oligossacarídeos, liberadas no meio reacional pela ação das celobiohidrolases, à moléculas de glicose.<sup>73</sup> Uma vez que as celobiohidrolases são inibidas pelo produto celobiose, e as  $\beta$ -glicosidases degradam esse produto, há uma diminuição do efeito de inibição das celobiohidrolases, garantindo um processo de degradação eficiente.<sup>80</sup> Deste modo, as  $\beta$ -glicosidases são enzimas essenciais na hidrólise da biomassa podendo ser consideradas como limitantes para o processo de hidrólise.<sup>81</sup> Estas enzimas apresentam uma ampla especificidade por  $\beta$ -D-glicosídeos e, assim como as celobiohidrolases, as  $\beta$ -glicosidases também sofrem inibição por seu produto de hidrólise.<sup>82</sup>

Poucos microrganismos produzem o conjunto completo de celulases necessárias para degradar eficientemente a celulose. Mesmo espécies amplamente utilizadas em processos industriais são deficientes em  $\beta$ -glicosidasases, fator que diminui a eficiência do processo, tornando-se necessária a suplementação com estas enzimas, com o intuito de aumentar a taxa de conversão de celulose em glicose.<sup>83</sup>

As  $\beta$ -glicosidasases, atualmente, são classificadas com base na similaridade de sequência de aminoácidos e semelhanças estruturais. Elas possuem membros nas famílias GH1, GH3, GH5, GH9, GH16 e GH30,<sup>63</sup> sendo que dentre estas, a GH1 é a que possui o maior número de componentes.

#### **1.4.3.4 Enzimas auxiliares**

Um grande obstáculo enfrentado pelas enzimas do complexo celulolítico é o acesso limitado à parte do substrato o qual se encontra no interior das microfibrilas de celulose, que são altamente ordenadas e empacotadas. Para ocorrer o rompimento e afrouxamento destas regiões inacessíveis, há a participação de proteínas não hidrolíticas, aumentando assim a área de superfície da celulose, tornando-a mais acessível para o complexo celulolítico.

Esta fase de afrouxamento, que ocorre no início da sacarificação enzimática da celulose, é chamada de amorfogênese e é realizada por enzimas sem atividades hidrolíticas. Fazem parte deste grupo de proteínas: CBMs, expansinas, swoleninas e as monooxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs).<sup>84-85</sup> Atualmente, sabe-se que o esquema clássico endo/exoglucanase é um modelo simplificado da degradação da celulose, sendo a participação das enzimas acessórias essencial nesse processo.

O domínio de ligação a carboidrato (CBM), é definido como uma sequência contínua de 30 a 200 aminoácidos, presente em proteínas que reconhecem polissacarídeos como celulose, quitina,  $\beta$ -glucanos, amido, glicogênio, xilano, e outros açúcares diferentes.<sup>86</sup> É o CBM que determina qual o componente da parede celular que será o alvo de uma determinada enzima e então, a hidrólise enzimática é iniciada somente após a interação do CBM com o substrato.<sup>56</sup> Os CBMs também são responsáveis pela variação da afinidade enzimática pelas diversas formas de celulose.<sup>87</sup> O impacto do CBM na adsorção e hidrólise da hemicelulose também tem sido reportado, uma vez que, enzimas que possuem o CBM exibem maior eficiência de hidrólise da hemicelulose.<sup>88</sup>



Outro grupo de enzimas acessórias é o das expansinas, as quais são secretadas por células vegetais durante o crescimento. Estas enzimas são capazes de desassociar a rede de polissacarídeos da parede celular permitindo a extensão da célula. Isto se dá através do deslocamento do local de adesão entre as microfibrilas de celulose e os demais polissacarídeos da parede, permitindo o relaxamento ou a tensão desses glicanos, o que aumenta as distâncias entre as microfibrilas. Este mecanismo é realizado pela dissociação das ligações de hidrogênio existentes entre a celulose ou entre a celulose e outros polissacarídeos da parede celular, porém sem hidrolisá-los.<sup>89</sup> Embora as expansinas não apresentem atividade hidrolítica, estudos sinalizam que estas enzimas aumentam a taxa de hidrólise enzimática da celulose cristalina por celulases. Baker *et al.*, demonstrou que a adição de uma pequena quantidade de expansinas às celulases de *Hypocrea jecorina* resultou em um aumento na conversão de celulose de até 13% quando comparado com o mesmo complexo celulásico sem este aditivo.<sup>90</sup>

Além das expansinas, novos tipos de proteínas têm sido descritos como auxiliares das celulases, uma das quais é a swolenina. Esta foi identificada pela primeira vez após ser isolada do fungo *T. reesei* em 1992. Elas possuem similaridade de aminoácidos com as expansinas vegetais, e sua atividade está relacionada com o fato de efetuar um dano parcial na fibra de celulose, fazendo com que ocorra perda de estrutura.<sup>91</sup> Acredita-se que essa proteína seja produzida, principalmente, por fungos e, do mesmo modo que as expansinas, as swoleninas não são capazes de liberar açúcar redutor, porém ao tornar as fibras de celulose mais acessíveis para a atuação de celulases, também aumentam a taxa de conversão da celulose.<sup>92</sup>

Recentemente, as enzimas oxidativas, monooxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs), acrescentam mais um elemento de ação na hidrólise da celulose. Originalmente, as LPMOs foram classificadas nas famílias GH61 e CBM33 e, atualmente, foram reclassificadas para famílias AA9 e AA10, com base na sequência e característica de enzimas com atividade auxiliar.<sup>93-94</sup> As LPMOs têm despendido esforço da comunidade científica e diversos trabalhos têm sido reportados, tal como as novas famílias de LPMO a AA11<sup>95</sup> e AA13.<sup>96</sup> As LPMOs possuem uma estrutura conservada, composta de uma face plana na qual se encontra um átomo de  $\text{Cu}^{+2}$ , coordenado por átomos de nitrogênio em dois resíduos de histidina.<sup>97</sup> As LPMOs são biocatalisadores dependentes de cobre, que utilizam o oxigênio molecular e um doador de elétrons para oxidar diretamente a celulose no C1 ou C4 e quebrar ligações glicosídicas. O mecanismo de reação das LPMOs é chamado de combustão enzimática e envolve a geração de

radicais reativos que clivam as ligações C-C, deixando o carbono oxidado. Este mecanismo torna a biomassa mais suscetível à quebra, impulsionando a hidrólise realizada pelas enzimas clássicas<sup>98</sup> e é devido ao potencial de uso em coquetéis enzimáticos comerciais e do sinergismo com preparados enzimáticos de GH tradicionais, que as LPMOs têm atraído tanta atenção.

## 1.5 Sinergismo

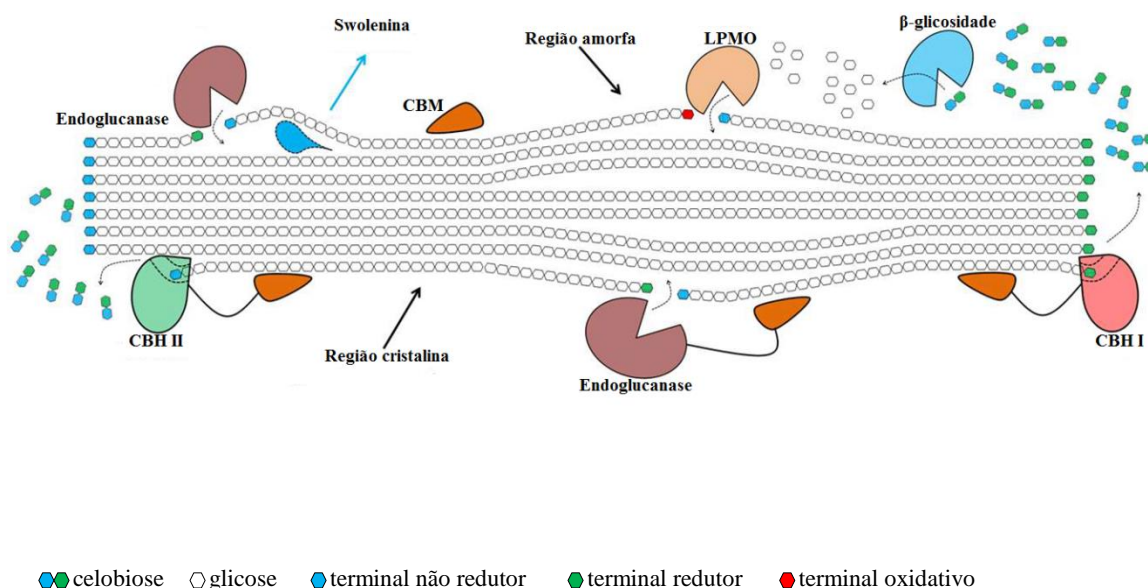
Os componentes do sistema celulolítico atuam de forma sinérgica para degradar a celulose e o sucesso da hidrólise enzimática se deve a esse sinergismo entre as enzimas. A definição mais simples de sinergismo é a combinação de dois ou mais componentes, criando um efeito maior do que a soma de ambos separadamente. Em termos enzimáticos, é definido como a cooperação entre diferentes tipos de celulases que atuam em conjunto, e a atividade da mistura é superior à atividade dos monocomponentes.<sup>99</sup>

Para uma descrição mais quantitativa, o grau de sinergismo (DS) é definido e calculado como a razão entre a atividade das enzimas combinadas, dividida pela soma das atividades dos componentes individuais. Por conseguinte, um grau de sinergismo igual a 1, é indicativo de ausência de sinergismo; quando o valor de DS é menor que 1, temos inibição de atividade; enquanto que valores de DS superiores a 1 indicam a ocorrência de uma ação sinérgica.<sup>100</sup>

Há várias teorias relatadas na literatura sobre o sinergismo. O modelo clássico refere-se ao sinergismo endo/exo, onde as endoglucanases atacam as frações amorfas de celulose, produzindo terminais redutores e não redutores para a atuação da CBH I e CBH II, respectivamente.<sup>101</sup> Além do sinergismo clássico, são conhecidos exo/exo sinergismo, onde CBH I e CBH II atuam simultaneamente na hidrólise dos terminais redutores e não redutores das cadeias de celulose; sinergismo exo ou endo com as  $\beta$ -glicosidases para a remoção de celobiose e oligossacarídeos produtos de hidrólise, e por último, o sinergismo intramolecular entre os domínios catalíticos e módulos de ligação aos carboidratos.<sup>36, 73, 102-103</sup>

Levando em consideração estudos recentes, o esquema clássico permanece o mais estudado e também o mais coerente porém se mostra simplificado demais. Detalhes dos mecanismos moleculares do sinergismo ainda não estão totalmente esclarecidos e, atualmente, as enzimas oxidativas representam um novo paradigma na degradação de polissacarídeos recalcitrantes. A Figura 5 representa um modelo de hidrólise enzimática, demonstrando o sinergismo entre os principais tipos de enzimas atuantes na degradação da celulose.

A interação entre as celulases e enzimas acessórias é investigada como uma tentativa de contribuir para o desenvolvimento de modelos mais completos de sinergismo nos diferentes substratos.



**Figura 5** - Esquema da hidrólise completa da celulose. EGs agem em regiões amorfas da celulose, atuando nas ligações internas e liberando oligossacarídeos com extremidades redutoras e não-redutoras, para a atuação das CBHs, que agem produzindo celobiose, substrato para as BGs que disponibiliza a glicose como produto. Há também as enzimas acessórias que contribuem para o aumento da liberação de açúcares.

**Fonte:** Adaptada de SILVEIRA.<sup>104</sup>

## 1.6 A família GH7

Dada a importância na conversão da biomassa industrial, as enzimas da família GH7 têm sido o foco de muitos estudos com a finalidade de caracterização bioquímica e elucidação do mecanismo catalítico. Esta foi uma das primeiras famílias de hidrolases de glicosídeo a ser classificada pela análise de agrupamento hidrofóbico, sendo que, anteriormente, era conhecida como a "celulase da família C".<sup>105</sup>

Atualmente, o banco de dados CAZy lista cerca de 5000 sequências de GH7<sup>62,75</sup> as quais agrupam a endoglucanase I e celobiohidrolase I. Estas, possuem estruturas muito semelhantes: são proteínas bimodulares, com um módulo de ligação ao carboidrato da família 1 (CBM), conectada ao domínio catalítico por um polipeptídeo glicosilado. A maioria das GH7 clivam as ligações  $\beta$  1,4-glicosídicas da celulose, embora vários membros também apresentam atividade em

xilana. São enzimas com o mecanismo hidrolítico de retenção e os resíduos catalíticos estão posicionados perto uns dos outros em sequência no *motif* X-Glu-Asp-Glu-XX, onde o primeiro Glu atua como nucleófilo catalítico e o outro Glu como ácido/base geral.<sup>77</sup> Grande parte das GH7 têm uma forma molecular de girino com o domínio catalítico na posição N-terminal ocupando a cabeça do girino e o CBM na posição C-terminal, posicionado na sua cauda.

Nosso foco de trabalho foi uma endoglucanase I, embora em diversos experimentos de sinergismo utilizamos também uma celobiohidrolase I. As endoglucanases da família GH7 são enzimas celulolíticas altamente prevalentes que degradam biomassa, em *T. reesei* por exemplo, correspondendo de 10 a 15% das proteínas secretadas.<sup>106</sup>

O substrato natural das endoglucanases é a celulose e xiloglucano, mas apresentam também especificidade sobre a carboximetilcelulose (CMC),  $\beta$ -glucano, liquenano, lamiranina e xilana. Essa ampla especificidade de substrato permite que endoglucanases GH7 tenham potencial em várias aplicações industriais.<sup>107</sup> Além do uso focado para a produção de biocombustíveis, as endoglucanases possuem uma ampla faixa de aplicações, tendo seu uso intensificado nos primeiros anos da década de 80, primeiramente, na indústria de ração animal e, posteriormente, na indústria alimentícia,<sup>108</sup> papel e celulose,<sup>109</sup> além de têxtil e lavanderia.

## 1.7 Fungos produtores de celulases

Os fungos são os mais importantes microrganismos utilizados pela indústria na produção de enzimas. Na natureza, os fungos filamentosos celulolíticos são capazes de penetrar nos substratos celulósicos por meio das extensões das hifas, expondo então seus sistemas celulolíticos em cavidades nas partículas de celulose, realizando a degradação da biomassa.

Entretanto, poucos são os microrganismos que produzem altos níveis de celulases extracelular capazes de solubilizar a celulose cristalina, extensivamente. Os fungos filamentosos são conhecidos por serem produtores de enzimas capazes de degradar celulose e hemicelulose e, seu uso biotecnológico é crescente e com promissoras aplicações no campo da bioenergia<sup>110</sup>. A habilidade de degradar a lignocelulose de maneira eficiente, está, aparentemente associada ao hábito de crescimento micelial do fungo, que permite o transporte de nutrientes essenciais como o nitrogênio e ferro no substrato lignocelulósico pobre em nutrientes, que é a sua fonte de carbono.<sup>111</sup>

Há por parte da comunidade científica e industrial, interesse por microrganismos que, além de apresentarem altos índices de produção de enzimas, apresentem também um equilíbrio entre os grupos de enzimas do complexo celulolítico.

### 1.7.1 *Trichoderma harzianum*

Dentre os fungos filamentosos, destaca-se o gênero *Trichoderma* (anamorfo *Hypocrea*)<sup>112</sup>, amplamente distribuído na natureza e encontrado em diferentes ecossistemas devido sua capacidade metabólica diversificada.<sup>113</sup> Na atualidade, o *Trichoderma reesei* (*T. reesei*) é o fungo celulolítico mais estudado, com estruturas cristalográficas resolvidas da maioria das enzimas lignocelulósicas, tornando essas enzimas largamente utilizadas na indústria. Além disso, este fungo possui grandes vantagens para produção de celulases e de proteínas em geral (homólogas e heterólogas).

Mais recentemente, as formas teleomórficas (forma capaz de se reproduzir sexuadamente do ciclo de vida de um fungo) *Hypocrea lixi* de *Trichoderma harzianum* foram identificadas através da análise do DNA.<sup>114-115</sup> Este fungo vem ganhando destaque e é largamente utilizado como um agente de biocontrole na agricultura.<sup>116</sup> O *T. harzianum* ainda é pouco estudado quando comparado ao *T. reesei*, porém é um fungo filamentoso celulolítico com grande potencial biotecnológico. Na área industrial, isolados de *T. harzianum* têm tido destaque na produção de celulases, sendo um produtor muito eficiente de enzimas para a hidrólise completa de substratos à açúcar fermentável.<sup>117</sup>

Neste sentido, após o Prof. Dr. Nei Pereira Jr. (EQ/UFRJ), com o qual temos colaboração ativa, ter estudado a cepa IOC 3844 do fungo filamentoso do gênero *T. harzianum* e identificado este organismo como um forte e rápido produtor de endoglucanases, atingindo 6358 U.I.L<sup>-1</sup> de atividade em apenas 72 horas, nosso grupo passou a desprender esforços no sentido de caracterizar as enzimas que fazem parte do complexo celulolítico deste fungo.

A abordagem de *T. harzianum* se mostra muito interessante uma vez que além deste fungo secretar um sistema enzimático eficiente e bem equilibrado de enzimas capazes de hidrolisar substratos celulósicos à glicose, também é capaz de produzir um complexo celulolítico com maior atividade de  $\beta$ -glicosidase quando comparado à *T. reesei*. Essa característica representa uma grande vantagem pois o extrato enzimático de *T. reesei* exibe um baixo nível de atividade de

$\beta$ -glicosidase, o que dificulta um processo de completa hidrólise e a fermentação da celulose em etanol. Somada à essas vantagens, destaca-se a produção de endoglucanases alcançados por *T. harzianum* IOC 3844, uma vez que, chega a ser cerca de 60 vezes maior em relação a cepas tradicionais de *T. reesei*.<sup>79</sup>

## 1.8 Expressão heteróloga em diferentes sistemas de expressão

Apesar de ser um sistema eficaz, fácil de manipular e relativamente rápido, a expressão de proteínas na maquinaria celular bacteriana encontra um ambiente mais simples, que pode refletir em enovelamento errado, degradação e baixa solubilidade, além das deficiências de etapas pós-traducionais e formação de corpos de inclusão.<sup>118</sup>

Na tentativa de driblar os resultados negativos, recorre-se à expressão em sistemas fúngicos. A levedura metilotrófica, *Pichia pastoris*, apresenta uma maquinaria mais robusta, com capacidade de fazer modificações pós traducionais tipicamente associadas a organismos eucariotos.<sup>119</sup> Contudo, muitas vezes observa-se a secreção ineficiente da proteína para o meio extracelular, bem como comprometimento da estabilidade das proteínas, podendo tornar esse mecanismo de expressão ineficaz.

Com recorrência é observado que uma gama de diferentes tipos de proteínas recombinantes têm sido expressa com sucesso em fungos filamentosos, os quais são capazes de converter uma variedade de fontes abundantes de carbono e nitrogênio em proteínas secretadas para o ambiente extracelular. Estes organismos possuem uma incomparável capacidade de secreção de metabólitos, ácidos orgânicos e enzimas em relação a outros sistemas de expressão eucarióticos como leveduras, algas ou células de insetos. Eles possuem toda a maquinaria celular para as modificações pós-traducionais como células de mamífero, ausente nas bactérias, enquanto dividem com os procariotos a qualidade de serem facilmente cultivados . Além disso, a expressão heteróloga de proteínas pode alcançar níveis de g/L.<sup>120</sup>

### 1.8.1 Expressão heteróloga em fungo filamentoso *Aspergillus niger*

Os gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* são as principais linhagens fúngicas utilizadas para a produção de proteínas em larga escala.<sup>121</sup>

O gênero *Aspergillus* caracteriza-se pela produção de esporos assexuais que se dá em uma estrutura chamada aspergillum a qual é especializada e característica do gênero. Eles também possuem uma estrutura denominada conidióforo que é constituído pelo aspergillum e pelo estipe. Os fungos do gênero *Aspergillus* são considerados ascomicetos degradantes primário da celulose e lignina,<sup>122</sup> possuem grande flexibilidade nutricional e metabólica e são capazes de habitar diferentes ambientes onde pH, temperatura e osmolaridade podem variar consideravelmente. São encontrados em solo, ambientes internos, material em decomposição ou, ainda podem viver como parasitos de outros organismos. Os *Aspergillus* são classificados como “Geralmente Reconhecido como Seguro” (GRAS), devido ao seu uso seguro a longo prazo na indústria alimentícia, mais uma característica que reforça sua vantagem e utilização na indústria biotecnológica.<sup>123</sup>

Outra vantagem apresentada por fungos do gênero *Aspergillus* na produção de proteínas recombinantes, consiste na sua capacidade de glicosilar proteínas de forma eficiente sem apresentar o problema da hiperglicosilação observado em outros sistemas fúngicos de expressão.<sup>123-124</sup>

Atualmente, as proteínas heterólogas são utilizadas em grande parte das aplicações industriais, e cepas de *Aspergillus* e alguns procariotos são os maiores organismos produtores. Deste modo, o estudo de celulasas expressas de maneira heteróloga em fungos filamentosos é interessante do ponto de vista do tratamento da biomassa para a obtenção de bioetanol.





# Justificativa



*Quando vejo uma criança, ela inspira-me dois sentimentos: ternura, pelo que é, e respeito pelo que pode vir a ser.*

*Louis Pasteur*



## 2 Justificativa

A qualidade de vida das gerações atuais e futuras, depende da nossa presente habilidade em nos desenvolvermos social e economicamente, além da nossa capacidade de suprir as crescentes necessidades humanas sem comprometer no entanto, o meio-ambiente. Em outras palavras, é preciso ampliar a distribuição de energia mundialmente e, ao mesmo tempo, diminuir a emissão de gases poluentes, além de não aumentar a área de plantio para não comprometer a produção de alimentos.

Assim, a crescente demanda de energia mundial, especialmente em relação aos combustíveis de transporte, aliado às preocupações com mudanças climáticas e uso contínuo dos recursos fósseis, têm incentivado a busca por matrizes energéticas renováveis, sustentáveis e economicamente competitivas, a chamada energia verde. Um dos grandes pontos positivos da energia limpa é o fato de não atingir áreas agriculturáveis, não comprometendo assim o plantio de culturas que servem de alimento.

Nesse sentido, destaca-se o uso do etanol como combustível eficaz, economicamente viável e renovável. Porém, a quantidade de álcool necessária para suprir a demanda atual é cada vez maior, fato que desperta a necessidade de buscar novas matérias-primas alternativas às fontes sacaríneas e amiláceas. A biomassa lignocelulósica surge então com grande potencial para suprir a demanda energética de forma sustentável, uma vez que é, atualmente, a fonte mais abundante de energia renovável.<sup>125-126</sup>

O Brasil é juntamente com os Estados Unidos, líder mundial na produção de etanol, e apresenta grande potencial na obtenção desse combustível a partir do bagaço de cana-de-açúcar, resíduo abundante gerado pela indústria canavieira. Os açúcares presentes na celulose e hemicelulose da biomassa representam uma vasta e renovável matéria-prima para produção de combustíveis após a sua hidrólise e fermentação. A implantação da tecnologia de etanol lignocelulósico é favorável, uma vez que, o processo de produção pode ser feito anexo às unidades produtoras existentes, diminuindo o investimento.

Apesar do país ter avançado consideravelmente junto ao desenvolvimento de tecnologias para a produção de etanol de segunda geração, a sustentabilidade deste processo é dependente da redução dos custos de produção. Há portanto, a necessidade de transpor o principal gargalo tecnológico identificado que é a hidrólise enzimática.<sup>127</sup>

O entendimento e melhoramento das celulasas, enzimas com o potencial de degradar as moléculas constituintes da parede celular vegetal como a lignina, a celulose e a hemicelulose, tem assumido um papel essencial nas pesquisas relacionadas aos biocombustíveis.

O fungo *T. harzianum* faz parte de um grupo de fungos capazes de degradar a celulose e a hemicelulose da parede vegetal de maneira eficiente. Fazem parte do complexo celulolítico desse fungo, inúmeras enzimas celulolíticas, com diferentes atividades. A identificação, a produção e a caracterização estrutural dessas enzimas é de extrema importância, para compreendermos os mecanismos moleculares da atuação enzimática frente à biomassa.

# Objetivos



*"Mas na profissão, além de amar tem de saber. E o saber leva tempo pra crescer."*

*Rubem Alves*



### 3 Objetivos

#### 3.1 Objetivo geral

O objetivo geral do trabalho consiste no estudo bioquímico e molecular da endoglucanase I do fungo *Trichoderma harzianum* (*ThCel7B*), cepa IOC 3844, a fim de melhor compreender os processos envolvidos na hidrólise enzimática do bagaço da cana de açúcar, substrato promissor para produção de etanol 2G. Para isso, seguem os objetivos específicos.

#### 3.2 Objetivos específicos

- ∴ Clonagem do gene *Cel7B* de *T. harzianum*, a partir do DNA complementar (cDNA) do fungo;
- ∴ Produção heteróloga da enzima na linhagem py11 de *A. niger*;
- ∴ Purificação da enzima à partir do extrato enzimático;
- ∴ Caracterização bioquímica, incluindo a determinação da massa molecular, a especificidade por substratos, e as condições ótimas de atividade;
- ∴ Investigar a estabilidade da proteína por *ThermoFluor* e ensaios de atividade residual;
- ∴ Determinação dos parâmetros cinéticos;
- ∴ Análise por microscopia eletrônica de varredura do efeito da hidrólise de substratos naturais pela enzima, como papel de filtro, flocos de aveia e celulose bacteriana;
- ∴ Testes de hidrólise em bagaço pré tratado;
- ∴ Estudos de sinergismo entre endoglucanase (*ThCel7B*) e celobiohidrolase (*ThCel7A*) sobre substratos com diferentes cristalinidades;
- ∴ Estudos de reversibilidade e efeitos da centrifugação sobre a ligação improdutiva da enzima;
- ∴ Estudar o produto hidrolisado por espectrometria de massas MALDITOF MS e eletroforese capilar;
- ∴ Caracterização biofísica por meio de técnicas como dicroísmo circular (CD), espalhamento de luz dinâmico (DLS);
- ∴ Cristalização e estudos de difração de raios-X;

∴ Determinação da estrutura cristalográfica da enzima e estudo da relação estrutura e função da mesma.



# *Materiais e métodos*



*“Nada em Biologia faz sentido, senão à luz da evolução.”*

*Theodosius Dobzhansky*



## 4 Materiais e Métodos

### 4.1 Produção das proteínas *ThCel7B-full* e *ThCel7B-CCD* em *Aspergillus niger*

#### 4.1.1 Clonagem do gene *ThCel7B*

Para expressão no sistema de expressão escolhido foi necessário efetuar a clonagem do gene. Esta etapa foi realizada pela então aluna de doutorado do mesmo grupo de pesquisa, Viviane Isabel Serpa, durante seu estágio sanduíche em colaboração com o Prof. Dr. Adrian Tsang, do Centro para Genômica Estrutural e Funcional (CSFG) da Universidade de Concórdia, em Montreal, Canadá.

Para a amplificação do gene, foram desenhados oligonucleotídeos específicos de acordo com a sequência gênica da proteína de interesse, previamente estabelecida e obtida a partir do banco de dados JGI<sup>128</sup> do genoma de *T. harzianum* identificado como ID 20062. As duas construções feitas para a proteína foram: o gene inteiro (*ThCel7B-full*), que codifica a sequência de nucleotídeos 1-1416, e o domínio catalítico separado (*ThCel7B-CCD*), nucleotídeos 1-1185. O intuito de realizar a clonagem das duas construções era de comparar em termos de atividade o comportamento da enzima com e sem CBM e deste modo, conseguir relacionar a importância do CBM junto à *ThCel7B*.

Na tentativa de facilitar o processo posterior de purificação das proteínas, foi adicionada uma sequência extra de bases que codificavam 6 histidinas, na porção 3' de cada gene. Para remoção dessa cauda fez-se a inserção de uma sequência de bases sítio específica para o reconhecimento e clivagem pela proteína trombina. Mais uma sequência gênica, codificadora de uma sequência sinal, foi inserida na porção 5' do gene para assegurar as modificações pós traducionais e a secreção da proteína expressa.<sup>129</sup>

Como o comprimento do *primer* desenhado após adição das caudas tornou-se muito longo, optou-se por realizar a reação de amplificação no termociclador em duas etapas, com dois pares de oligonucleotídeos diferentes. O método de clonagem utilizado foi a plataforma *Gateway*®, e para as duas etapas de amplificação, fez-se o uso de dois oligonucleotídeos reversos diferentes e um anverso.<sup>130</sup> O fragmento de gene foi amplificado a partir de uma biblioteca de DNA complementar (cDNA) de *T. harzianum* IOC-3844, obtido a partir da coleção de culturas de fungos filamentosos (CCFF) do Instituto Osvaldo Cruz (CCFF; <http://ccff.fiocruz.br/>) em

colaboração com o professor Dr. Flávio Henrique Silva, do departamento de genética da Universidade Federal de São Carlos.

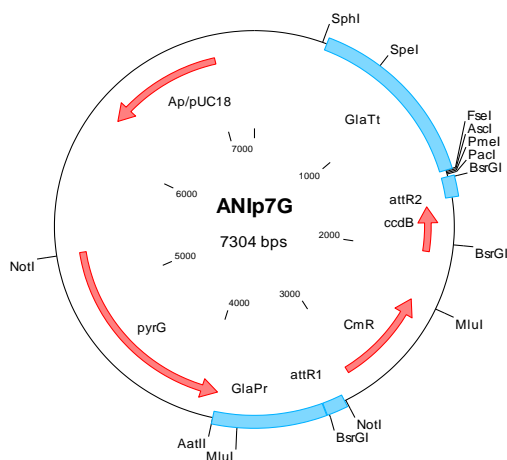
Os parâmetros utilizados para a amplificação dos genes são descritos por Serpa, 2008<sup>129</sup> e as duas reações de amplificação foram feitas utilizando a enzima Phusion® DNA polimerase. Como já citado acima, foram realizadas duas etapas reacionais, com a primeira servindo de DNA molde para a segunda. A Tabela 1 apresenta os oligonucleotídeos das duas reações de amplificação desenhados para cada construção. Os genes amplificados após as duas reações foram confirmados em gel de agarose 1%, e então preparados para ligação ao vetor de expressão de acordo com a técnica Gateway®.

**Tabela 1** - Oligonucleotídeos desenhados para a amplificação dos genes na clonagem.

<i>ThCel7B</i> -full_ Fw1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGGCTCTCTCTGGTCC
<i>ThCel7B</i> -full Rv1	ATGATGATGATGATGATGGGATCCACGCGGAACCAGCTATAGGCATTGCGAGTAGTAATC
<i>ThCel7B</i> -full Rv2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCAATGATGATGATGATGGGATCCACGC
<i>ThCel7B</i> -CCD_ Fw1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGGCTCTCTCTGGTCC
<i>ThCel7B</i> -CCD_ Rv1	ATGATGATGATGATGATGGGATCCACGCGGAACCAGAGTGGTTGAACCAATATCTCCCC
<i>ThCel7B</i> -CCD_ Rv2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCAATGATGATGATGATGGGATCCACGC

Fonte: Elaborada pela autora.

O vetor utilizado para expressão em *A. niger* foi o ANIp7G, um vetor não comercial construído a partir do vetor ANIp7<sup>131</sup> e compatível com o sistema de expressão em *A. niger* py11 (Figura 6).

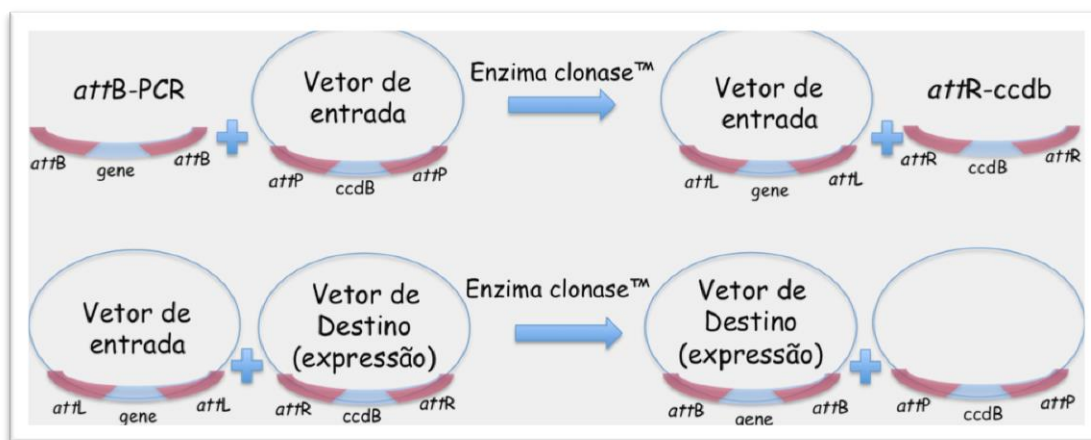


**Figura 6** - Mapa do vetor para expressão em *A. niger* - ANIp7G .

Fonte: Adaptada de SERPA<sup>129</sup>

As principais características de ANIp7G são: sítios inicial e terminal do promotor da glucoamilase de *A. niger* (*glaA*), o qual é induzido por maltose; o marcador auxotrófico *pyrG*, que codifica uma proteína necessária para a síntese da uridina promovendo prototrofia à cepa mutante auxotrófica para uracila e sítios de recombinação *attP*, necessários para a clonagem por Gateway®.

A tecnologia Gateway® utiliza métodos baseados na recombinação sítio específica existente nos bacteriófagos lambda.<sup>132</sup> Essa técnica têm sido muito utilizada em plataforma *high throughput*, uma vez que permite integrar sequências de DNA em diferentes vetores de modo rápido e eficiente. A recombinação ocorre entre sítios específicos de ligação *attB* (*attachment* – “*att*”- bactéria) presente no gene de interesse e *attP* (*attachment* – “*att*”phago) no vetor de entrada. Após ocorrer a recombinação, os sítios *attB* e *attP* originam sítios *attL* e *attR* respectivamente. O vetor de entrada clonado terá então os sítios *attL* e poderá ser recombinado com qualquer vetor de expressão que possua os sítios *attR*. Essa recombinação irá reconfigurar os sítios *attB* e *attP*. A Figura 7 ilustra os passos de clonagem realizados. na plataforma Gateway®.



**Figura 7** - Esquema dos passos de clonagem pela plataforma Gateway® a partir do vetor de entrada e do produto de amplificação do gene com caudas att seguido da inserção ao vetor de expressão.

**Fonte:** Adaptada de SERPA.<sup>129</sup>

A recombinação ocorre entre uma região homóloga de cerca de 15 pb, no entanto mesmo assim se faz necessária a adição de uma sequência extra em torno dessa região requerida pelas proteínas de recombinação.<sup>132</sup> As caudas adicionadas aos oligonucleotídeos foram as seguintes:

Oligo Fw\_ 5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT...(gene de interesse) 3'

Oligo Rv\_ 5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT...(gene de interesse) 3'

Para a clonagem, foi utilizado o kit da Invitrogen®, contendo o vetor intermediário pDONR201 para a ligação *attB\_attP*, além das enzimas necessárias para a recombinação. O protocolo detalhado seguido para clonagem do gene de interesse está descrito por Serpa, 2008.<sup>129</sup>

Após a análise do plasmídeo quanto à inserção correta do gene no vetor ANip7G, seguiu-se a transformação em células competentes da linhagem DH5  $\alpha$  através de choque térmico.<sup>133</sup> Depois da confirmação das colônias positivas, foi realizado uma minipreparação, com o intuito de extrair o DNA plasmidial das bactérias. Para isso, foi inoculada uma colônia em 1 mL de meio 2YT, contendo ampicilina (100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), a qual foi incubada com agitação a 37°C, 200 rpm *overnight*. Decorrido esse período, a cultura foi centrifugada e a minipreparação se deu utilizando o “kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. Após a extração do DNA, o mesmo foi manipulado para obter uma concentração final de 10  $\mu\text{g}$  e posterior transformação em *A.niger*.

#### **4.1.2 Manipulações com *A. niger* py11**

Para a produção heteróloga de proteínas em *A. niger* são requeridas algumas etapas, nesta ordem: cultivo do fungo em meio líquido a partir dos esporos, obtenção dos protoplastos, transformação dos genes, plaqueamento em meio seletivo e coleta dos esporos para os ensaios de expressão.

##### **4.1.2.1 Obtenção dos protoplastos**

Os protoplastos são preparados a partir da digestão enzimática da parede celular do micélio jovem. Para isso, um inóculo de 200 mL contendo  $2 \times 10^6$  esporos  $\text{mL}^{-1}$  de *A. niger* py11 foi realizado em meio líquido completo (CM) em *erlenmeyers* de 1000 mL e incubado em um *shaker* a 30°C, 150 rpm, de 16 a 22h. Após o tempo de incubação, sob condições estéreis a cultura foi filtrada a vácuo utilizando a membrana de filtração *miracloth*® (Merck) e obtendo assim o micélio fúngico, o qual foi lavado com 500 mL de solução de  $\text{MgSO}_4$  0,6 M. Após a pesagem da quantidade de micélio, este foi digerido com o coquetel enzimático comercial *VinoTaste*® Pro (Novozymes), em uma proporção de 0,25g por grama de micélio obtido, diluído em uma solução osmótica ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ /  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  32 mM e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,2 M). A enzima e o

protoplasto foram incubados em shaker sob agitação de 100 rpm, até a completa digestão da parede celular das hifas para que a quantidade de protoplasto fosse satisfatória. Este tempo de incubação é variável (em torno de 3 a 6 h), e deve ser monitorado através da verificação do grau de digestão por observação ao microscópio ótico.

A coleta dos protoplastos foi realizada acrescentando em tubo falcon de 50 mL, igual volume do filtrado de protoplasto e solução TB (Sorbitol 0,6 M e Tris-HCl 100 Mm, pH 7,5). Essa amostra foi centrifugada a 3750 rpm, 4 °C, por 20 minutos para formação de uma camada intermediária (protoplastos), a qual foi então coletada com uma pipeta *Pasteur* e transferida para outro tubo falcon. Os protoplastos foram então lavados com solução SC (Sorbitol 1M e CaCl<sub>2</sub> 66,2 mM) gelada, e posteriormente, centrifugados a 4°C e 3750 rpm por 5 minutos, repetidamente por três vezes, para garantir a eliminação de quaisquer resquícios de micélio.

Ao final, o *pellet*, foi ressuscitado em 2 mL de solução SC, para a realização da contagem em Câmara de *Neubauer* e os protoplastos foram diluídos em solução SC para uma concentração final de cerca de  $5 \times 10^7$  protoplastos/mL para o uso na etapa posterior de transformação.

#### 4.1.2.2 Transformação do gene na cepa py11

O método de transformação adotado como já citado, foi baseado na utilização de protoplastos por meio da digestão enzimática da parede celular de micélio jovem.

Todos os procedimentos aqui detalhados a partir de agora, foram realizados para as duas construções, ou seja, para a proteína inteira *ThCel7B-full* e para o domínio catalítico *ThCel7B-CCD*. Para a transformação, foi feita a incubação de 200 µL de protoplasto na concentração de  $1 \times 10^7$  esporos/mL, juntamente com 10 µg de DNA e 100 µl de PEG 4000 20% (diluído em 1 M de Tris-HCl, pH 7,5 com 1M de NaCl<sub>2</sub>). Além disso, para prevenir a degradação do DNA, também foi adicionado 20 µL de 0,4 M de ATA (*aurintricarboxylic acid*) e a reação incubada à temperatura ambiente (TA) por 10 minutos. Decorrido este tempo, adicionamos à mistura 1,5 mL de PEG 4000 60% (também diluído em 1 M de Tris-HCl, pH 7,5 com 1M de NaCl<sub>2</sub>), homogeneizamos por inversão suavemente para preservar integridade do protoplasto e, incubamos em TA por 20 minutos. Em seguida, foi adicionado 5 mL de sorbitol 1,2 M e a amostra centrifugada por 10 minutos a 3750 rpm em TA. O *pellet* obtido foi ressuscitado em 0,5 mL de sorbitol 1,2 M e a mistura resultante plaqueada em 3 diferentes placas de Petri

contendo meio de regeneração seletivo (SRM), as quais foram incubadas em estufa úmida a 30°C por cerca de 4-6 dias, até o aparecimento de colônias (Figura 8). Uma vez que a cepa *A. niger* py11 possui marcador de seleção pyrG, (auxotrófico para uracila), o meio seletivo (SRM) permite o crescimento somente das células que tiveram o DNA do vetor integrado ao seu genoma e com isso adquiriram a capacidade de produzir uracila.



**Figura 8** - Placa de Petri com transformantes obtidos com sucesso com crescimentos de diversas colônias.  
**Fonte:** Elaborada pela autora.

Realizamos também um controle negativo sob as mesmas condições descritas acima, porém, utilizando-se o vetor ANIp7G vazio, sem o inserto para que fosse monitorado a ausência de colônias após o período de incubação. Concomitantemente, realizamos um controle dos protoplastos em placas com meio de regeneração não seletivo (NSRM), onde devemos observar o crescimento do fungo. Este controle é realizado a fim de verificar as condições e viabilidade dos protoplastos utilizados.

#### **4.1.2.3 Teste de expressão dos transformantes e confirmação da identidade proteica**

Para a triagem inicial quanto a capacidade de expressão do gene específico, inoculamos os esporos de algumas colônias selecionadas aleatoriamente e crescidas após 4-6 dias em 1 mL de MMJ (meio mínimo acrescido de 4% de maltose), em placas de acrílico de 24 poços, as quais permaneceram em cultura estacionária por 7 dias a 30°C. Do quinto ao sexto dia, foram coletadas diariamente alíquotas de sobrenadante para o monitoramento do secretado pelas culturas e do nível de expressão. As amostras foram centrifugadas a 4°C e 13000 rpm por 5 minutos para a eliminação de restos de esporos e micélio e, então analisadas por SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) 15% sob condições desnaturantes<sup>134</sup>. Como



marcador, utilizou-se o de baixo peso molecular, e os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue R-250* e descorados com ácido acético 10%.

Após a confirmação da expressão, foi realizada a identificação da proteína obtida através do método da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS). Para isso, foi cortada do gel de poliacrilamida a banda referente à *ThCel7B*, seguida de digestão com 0,5 µg de tripsina modificada (Promega) por 16 horas. A extração dos peptídeos submetidos à análise por LC/MS foi realizada com uma solução de ácido fórmico 5% e acetonitrila 50%. O equipamento utilizado foi o MicroTOF-QII (Bruker Daltonics) e o espectro de massa dos peptídeos obtido por meio das massas mono-isotópicas dos mesmos, interpretado por meio da ferramenta computacional Mascot<sup>135</sup>. A sequência peptídica obtida foi comparada com uma base de dados de fungos filamentosos disponível no *Joint Genome Institute (JGI)* do *U.S Department of Energy*.

#### **4.1.2.4 Produção das enzimas em larga escala**

Para a produção das proteínas em quantidade suficiente para a caracterização enzimática e ensaios de cristalização, foram necessários ajustes para seu escalonamento. Desta forma, as colônias identificadas como positivas nos testes de expressão foram repicadas para novas placas SRM, mantidas em estufa a 30 °C por 6 dias para a produção de esporos, os quais são raspados da placa, coletados e mantidos em solução salina (0,5% NaCl). Também foi realizado o estoque destes transformantes positivos em *freezer* -80 °C usando glicerol 20%.

Após a contagem em câmara de *Neubauer*,  $2 \times 10^6$  esporos mL<sup>-1</sup> foram inoculados em meio MMJ em frascos *erlenmeyers* de 2 litros e mantidos em cultura estacionária em estufa a 30 °C por 6 dias. Decorrido este tempo, observa-se a formação de um "tapete" acima da cultura, o qual é então retirado e a cultura filtrada em membrana *Mira cloth*, para a remoção de esporos e extrato bruto remanescente. Com o sistema Hollow Fiber Cartridge (GE Healthcare), o meio bruto foi concentrado através de uma coluna de filtração tangencial de corte 5 kDa. O conteúdo proteico foi precipitado com sulfato de amônio a 80% (m v<sup>-1</sup>) de saturação *overnight* em câmara fria. No dia seguinte, o extrato foi centrifugado a 9000 rpm por 40 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado de proteína ressuspenso em tampão citrato de sódio 50 mM (pH 5,0). A proteína foi então encaminhada para os ensaios de purificação descritos a seguir.

#### 4.1.2.5 Purificação de *ThCel7B*-full e *ThCel7B*-CCD

Tanto o domínio catalítico quanto a proteína inteira produzidas, foram encaminhadas para os ensaios de purificação por cromatografia de afinidade em metal imobilizado (IMAC), em coluna de cobalto (TALON - Clontech), uma vez que possuem cauda de histidina fusionada na porção carboxi-terminal. Foram colhidas alíquotas em todos os passos da purificação, as quais foram analisadas em Géis de SDS-PAGE 15% de acrilamida, corados com *Coomassie Blue* e descorados com ácido acético 10%. Após a análise do gel, foi possível observar que não houve interação com a coluna, sendo *ThCel7B*-full e *ThCel7B*-CCD eluídas juntamente com outras proteínas sempre na fração *flow through*.

Uma segunda tentativa de purificação, se deu através da cromatografia em coluna hidrofóbica *Phenyl Sepharose 6 Fast Flow* (GE Healthcare), que apresenta a vantagem de dispensar a etapa de diálise após a precipitação com sal, representando uma economia de tempo e aumento das chances de manutenção da atividade enzimática. A coluna foi previamente equilibrada com tampão citrato de sódio 50 mM (pH 5,0) suplementado com 1 M de sulfato de amônio, em sistema *Äkta Purifier* (GE Healthcare®). A injeção da amostra consistiu de 10 mL do extrato enzimático e a eluição das proteínas foi alcançada por um gradiente salino decrescente em etapas de 100% a 0 de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em tampão citrato de sódio.

Com o intuito de garantir a ausência de qualquer contaminante nas etapas seguinte, as frações correspondentes ao pico da enzima foram concentradas utilizando-se concentrador do tipo *Vivaspin* (Amersham Bioscience) com corte de 10 kDa até o volume de 1 mL para a aplicação na coluna de exclusão de massa molecular *HiLoad Superdex 75 16/60* (GE Healthcare), também acoplada ao sistema *Äkta Purifier*. Foi utilizado um fluxo de  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  e pressão máxima de 0,5 MPa. O tampão de eluição utilizado foi o citrato de sódio 50 mM, NaCl 200 mM, pH 5,0 e o pico correspondente à proteína foi devidamente coletado.

A proteína purificada foi submetida SDS-PAGE 15% para confirmação da pureza e inexistência de quaisquer contaminantes. Além da coloração por *Coomassie Brilliant Blue*, coramos também o gel SDS-PAGE com nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) devido a sua maior sensibilidade de visualização de bandas proteicas.<sup>136</sup>

## 4.2 Caracterização bioquímica e biofísica da proteína recombinante

### 4.2.1 Estimativa da massa molecular real e do estado oligomérico da proteína por cromatografia de exclusão molecular

A caracterização inicial das proteínas se deu através da estimativa da massa molecular de *ThCel7B-full* e *ThCel7B-CCD*, juntamente com a determinação dos estados oligoméricos em solução. Para isso, uma curva de calibração foi obtida aplicando-se na coluna de exclusão molecular Superdex 200 10/30, proteínas padrão com massas conhecidas do *Gel Filtration Calibration Kit* (GE Healthcare), de baixa e alta massa molecular: conalbumina (75,0 kDa), ovoalbumina (44,0 kDa), anidrase carbônica (29,0 kDa), ribonuclease A (13,7 kDa) e aprotinina (6,5 kDa). Para a determinação do volume morto ( $V_o$ ) da coluna, utilizamos o corante Blue Dextran (2000 kDa). Posteriormente, sob as mesmas condições desses padrões, injetamos as proteínas de interesse.

Com base nos volumes de eluição das proteínas, foi possível calcular o  $K_{av}$  através da fórmula abaixo:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

Sendo  $V_e$  o volume de eluição da proteína;  $V_o$  o volume morto da coluna;  $V_t$  o volume total da coluna. O  $K_{av}$ , é um parâmetro que está relacionado com o perfil de migração de cada molécula.

Após a corrida dos padrões e da proteína, construímos uma curva de calibração, plotando os valores obtidos para os  $K_{avs}$  em função dos logaritmos das massas das proteínas padrão. Finalmente, para o cálculo da massa molecular da proteína utilizamos a equação da reta obtida por regressão linear.

### 4.2.2 Gel nativo

O gel nativo (realizado em condições não-desnaturantes) é uma técnica que permite determinar a homogeneidade da amostra proteica além do seu estado oligomérico em solução, uma vez que mediante as características de carga, massa molecular e conformação, a proteína tem um padrão de migração no gel que está submetido a um campo elétrico. Por se tratar de uma

técnica não desnaturante, a proteína mantém sua integridade conformacional e sua atividade biológica.

Assim, para a verificação de possíveis monômeros, dímeros, etc., as enzimas em questão foram submetidas em uma concentração de 2 mg/mL, à eletroforese em gel não desnaturante com gradiente de 8-25% de acrilamida, através do sistema *Phast* (Amersham Biosciences). O marcador de alta massa molecular contém as seguintes proteínas conhecidas: tiroglobulina bovina (669 kDa), ferritina de cavalo (445 kDa), catalase (232 kDa), aldolase (140 kDa) e soroalbumina bovina (66 kDa). Após o término da corrida, 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%.

#### **4.2.3 Ensaio enzimático e determinação das condições ótimas de atividade quanto pH e temperatura**

Para iniciar os ensaios enzimáticos e confirmar se a proteína encontrava-se ativa, foi determinada a atividade de CMCase, através da quantificação dos açúcares redutores liberados, os quais são medidos pelo método colorimétrico usando 3,5 ácido dinitrosalicílico (DNS)<sup>137</sup>, tendo glicose como padrão. O ensaio foi realizado em triplicata e utilizando como substrato CMC 1%, de viscosidade média. A reação consistiu de 10 µl da enzima em uma concentração de 80 µg/mL, 50 µl de CMC 1% (m/v) e 40 µL de tampão de citrato de sódio 50 mM pH 5,0. Como controle, o volume de enzima foi substituído por tampão. A mistura foi incubada a 50 °C por 15 minutos e após este tempo, adicionamos 100 µL de DNS. Esta reação foi então novamente incubada por 5 minutos a 100 °C, e a sua absorvância medida no espectrofotômetro Multiskan® Spectrum (Thermo Scientific) sob o comprimento de onda de 540 nm.

A atividade catalítica é sensível à mudanças no pH e na temperatura em que se encontram, sendo que, as enzimas exibem uma faixa de pH e temperatura em que sua performance catalítica é máxima, chamada de pH e temperatura ótimos. Assim, as condições ótimas para a hidrólise enzimática foram traçadas, através de seu perfil em função do pH e da temperatura, utilizando como substrato, o CMC 1%, de viscosidade média.

A temperatura ótima foi avaliada através da incubação da reação, anteriormente descrita, variando a temperatura em equipamento de termociclador, da Bio-Rad, com controle de

temperatura das canaletas individuais, de 25 a 85 °C em tampão de citrato de sódio 50 mM, pH 5,0. Para a determinação do pH ótimo, a enzima e o substrato foram diluídos em tampão 40 mM acetato/borato/fosfato (ABF), com diferentes pHs, abrangendo a faixa de 2,0 até 10,0 (para o pH menor que 2, utilizamos o tampão HCl/KCl) e incubados na temperatura ótima obtida anteriormente, 55 °C, por 15 minutos. A quantificação da concentração de açúcar redutor total liberado nos experimentos de hidrólise enzimática foi realizada utilizando DNS, seguido da leitura em placa no espectrofotômetro a 540 nm.

#### 4.2.4 Paineis pH tampões ácidos

Após a determinação do pH ótimo para a *ThCel7B*-full e *ThCel7B*-CCD, verificamos que se tratava de enzimas com preferência acidofílica. Para confirmar se a enzima mantinha o comportamento ácido em diferentes tampões, realizamos um *screening* com diferentes sais. A

Tabela 2 ilustra os tampões utilizados neste ensaio, sendo que todos foram diluídos para 50 mM, e a reação se deu com 50 µl de CMC 1%, 40µl do tampão e 10µl de *ThCel7B*-CCD a 80 µg/mL. As triplicatas foram incubadas como descrito anteriormente, na temperatura ótima pré-determinada e ao final para medição de açúcares redutores utilizamos, o DNS.

**Tabela 2 - Lista de tampões utilizados para testar preferência ácida de *ThCel7B-CCD*.**

<b>Tampão</b>	<b>pH</b>	<b>Tampão</b>	<b>pH</b>
Glicina/HCl	2,2	Tris/HCl	5,8
Glicina/HCl	3,0	Tris/HCl	6,5
Glicina/HCl	3,6	Tris/HCl	7,2
Acetato/Ácido acético	3,7	HCl/KCl	1,0
Acetato/Ácido acético	4,5	HCl/KCl	1,5
Acetato/Ácido acético	5,6	HCl/KCl	2,0
Citrato/Ácido Cítrico	3,0	Fosfato/Ácido cítrico	2,6
Citrato/Ácido Cítrico	4,0	Fosfato/Ácido cítrico	3,5
Citrato/Ácido Cítrico	5,0	Fosfato/Ácido cítrico	4,5
Citrato/Ácido Cítrico	6,0	Fosfato/Ácido cítrico	5,0
Ácido cítrico	2,0	Fosfato/Ácido cítrico	6,0
Ácido acético	2,0		

**Fonte:** Elaborada pela autora.

#### **4.2.5 Especificidade por substratos**

As enzimas *ThCel7B-full* e *ThCel7B-CCD* foram submetidas a um ensaio de atividade com diferentes substratos, com o intuito de determinar sua especificidade. Os substratos testados

foram: arabinano de centeio e de trigo, arabinano não ramificado, arabinogalactano, xiloglucano de tamarindo,  $\beta'$ -glucano de cevada,  $\beta'$ -manano, galactomanano, liquenano, xilano de madeira de faia e xilano de madeira de aveia. Além desses, utilizamos o 4-nitrophenyl- $\beta$ -D-cellobioside (pNPC), 4-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (pNPG), carboximetil celulose (CMC), celulose tratada com ácido fosfórico (PASC)<sup>138</sup> e papel filtro Whatman No. 1 (FP). Também testamos 3 diferentes tipos de celulose microcristalina: Avicel PH-101, sigmacel 20 e celulose. Os substratos foram diluídos em água, segundo determinações dos fabricantes, para uma concentração final de 1% (m v<sup>-1</sup>).

Cada ensaio foi realizado em triplicata, em um volume final de 100  $\mu$ L, dos quais 50  $\mu$ L consistia do substrato a 1%, 10  $\mu$ L de enzima em concentração de 80  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> e 40  $\mu$ L de tampão citrato de sódio a 50 mM, pH 3,0. No controle da reação, o volume de enzima foi substituído por 10  $\mu$ L do mesmo tampão e as reações foram incubadas a 55 °C por 15 minutos.

Para os ensaios com papel filtro, foi utilizado um disco de 0,7 cm de diâmetro do papel, 90  $\mu$ L de citrato de sódio a 50 mM, pH 3,0 e o tempo de incubação foi de 60 minutos. Posteriormente, adicionamos 100  $\mu$ L de DNS e novamente a mistura foi incubada, porém a 95 °C por 5 minutos, seguido da leitura das absorbâncias registradas a 540 nm. Para os testes com pNPC e pNPG, após o tempo de incubação de 15 minutos, adicionamos 100  $\mu$ L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M e realizamos a leitura das absorbâncias a 400 nm.

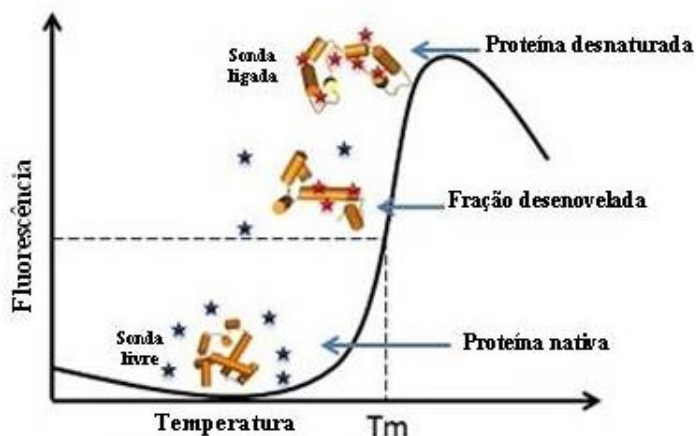
Depois dos testes descritos acima, com os substratos contra o qual a enzima não mostrou atividade, novos ensaios foram realizadas aumentando o tempo de incubação para 4 h.

#### 4.2.6 Análise de estabilidade térmica - *ThermoFluor*®

O ensaio de estabilidade térmica foi realizado utilizando método baseado no processo de desnaturação induzida por temperatura. O método de fluorimetria diferencial de varredura, também conhecido como *ThermoFluor*, tem como objetivo determinar as condições ideais para a estabilidade das proteínas, por meio da triagem de diferentes tampões, ligantes, cofatores, etc. Esses dados além de nos auxiliar na manutenção da atividade ótima enzimática, pode contribuir com o aumento nas chances de sucesso da purificação e cristalização das proteínas.

Experimentalmente, utiliza-se a sonda *SYPRO*® *Orange* (Invitrogen), um fluoróforo hidrossolúvel que interage com regiões hidrofóbicas, como o interior das proteínas.<sup>139</sup> Em suma, a desnaturação térmica expõe as regiões hidrofóbicas da proteína, resultando em um aumento da

fluorescência uma vez que o marcador se ligou a essas regiões. Quando a mesma encontra-se perfeitamente enovelada, ou seja, sem regiões hidrofóbicas expostas, não há emissão do sinal de fluorescência. Portanto, com o aumento de temperatura, pH ou outro fator desfavorável à estabilidade da proteína, ocorre o desenovelamento e conseqüentemente, a emissão de sinal fluorescente o qual é detectado pelo aparelho de Real-Time PCR, e pode ser tratado como uma função da temperatura. Dessa forma, a Temperatura de *melting* ( $T_m$ ) é definida como o ponto médio da temperatura de transição entre o estado enovelado e desenovelado. Todo esse processo é ilustrado na Figura 9.



**Figura 9** - Princípio do método de Thermofluor. As proteínas corretamente enoveladas sofrem desenovelamento com o aumento da temperatura, resultando na exposição de regiões hidrofóbicas e no aumento da fluorescência emitida. A temperatura de melting ( $T_m$ ) representa a temperatura na qual 50 % das moléculas estão desenoveladas.

**Fonte:** Adaptada de JENA...<sup>140</sup>

O experimento de *Thermofluor* foi realizado em colaboração com a Dra. Amanda Bernardes Muniz, do mesmo grupo de pesquisa, em equipamento CFX96 Real Time (Bio Rad) com um sistema de detecção C1000 Thermal cycler (Bio-Rad), originalmente projetado para os ensaios de PCR. O sistema possui um dispositivo de aquecimento/resfriamento para controle de temperatura e um dispositivo de carga acoplada (CCD) que mostra as mudanças na fluorescência nos poços das microplacas.

Foi avaliada a estabilidade da proteína inteira e do domínio catalítico, que foram incubadas por 12 horas em diferentes pH de 1 a 10 e em triplicata. O tampão utilizado foi o ABF



e a concentração final das proteínas de 7 $\mu$ M. O volume de reação foi de 20  $\mu$ L, e a sonda fluorescente SYPRO foi diluída 2000 vezes em água. As reações foram realizadas em placa de 96 poços, seladas com o adesivo transparente Optical-Quality Sealing (Bio Rad) e os dados foram coletados com uma variação de temperatura de 25 até 90 °C com um aumento gradual de 1 °C a cada 30 segundos. O comprimento de onda de excitação foi de 490 nm e emissão de 530 nm. As análises dos dados e o valor do  $T_m$  para cada amostra foram obtidos por meio do programa GraphPad Prism versão 5.0.

#### **4.2.7 Atividade enzimática residual**

Outro experimento que nos orienta a respeito da estabilidade proteica é aquele que estabelece a atividade enzimática residual. Esta, foi então obtida sob condições ótimas e de maior liberação de açúcar da enzima, as quais foram observadas em experimentos anteriores. A *ThCel7B*-full e *ThCel7B*-CCD, foram diluídas e incubadas em 50 mM de tampão de citrato de sódio, pH 3,0 e 5,0 à 55° C. Alíquotas de 10  $\mu$ l foram removidas e testadas em relação à atividade em CMC a 1% ao longo do tempo.

#### **4.2.8 Determinação dos parâmetros cinéticos**

Os parâmetros cinéticos foram determinados para ambas construções, utilizando concentrações crescentes de CMC (substrato padrão) e xiloglucano (elevada atividade enzimática), nestas diferentes diluições: 0,010, 0,030, 0,0625, 0,125, 0,250, 0,500, 1,000, 1,250, 1,500 e 2,000% (m/V). As reações foram realizadas em triplicata, em um volume final de 100  $\mu$ L, sendo 50  $\mu$ L do substrato, 40  $\mu$ L de tampão citrato de sódio pH 3,0 e 10  $\mu$ L de enzima à 0,50 mM (*ThCel7B*-full) e 0,25 mM (*ThCel7B*-CCD). A leitura dos dados, para cada substrato, foi realizada após 1, 2, 3, 4, e 5 minutos de reação e imediatamente, testadas para a determinação da quantidade de açúcares redutores pelo método do DNS. Os parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{max}$  foram determinados por meio do ajuste de Michaelis-Menten, disponível no software Origin v 8.6.

#### 4.2.9 Eletroforese capilar para análise de carboidratos

A eletroforese capilar é uma ferramenta amplamente utilizada no estudo de carboidratos e polissacarídeos para a caracterização enzimática. Nessa técnica analítica, os açúcares, provenientes da hidrólise enzimática, são submetidos a um campo elétrico e sua separação se dá de acordo com os diferentes graus de mobilidade. As moléculas a serem analisadas são pré marcadas com uma sonda fluorescente chamada APTS (*8-aminopyreno-1,3,6-trisulfonic acid*) permitindo assim a sua detecção.<sup>141</sup> Ao final, o detector de fluorescência transmite o sinal para um *software* gerando um eletroferograma, e uma análise comparativa com os padrões conhecidos permite caracterizar alguns parâmetros do mecanismo de ação da enzima sobre o substrato.<sup>142</sup>

Deste modo, os experimentos de eletroforese capilar de zona (CZE) foram utilizados a fim de traçar o perfil de degradação dos substratos e conhecer os produtos liberados pelas enzimas. As análises foram conduzidas no equipamento P/ACE MQD (Beckman Coulter Indianapolis, IN, USA) no Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), em colaboração com o Prof. Dr. Fábio Squina e seu aluno de doutorado João Paulo Cairo.

Para os experimentos, utilizamos como substrato a celulose com pequeno grau de polimerização (C6), marcada com o APTS. A hidrólise enzimática se deu com a incubação do substrato marcado e da mistura de proteína em tampão citrato a pH 3,0, equilibrados a 50 °C por 5 minutos. Um capilar de sílica fundida, de diâmetro interno de 50 µm e comprimento total de 31 cm, foi utilizado como coluna de separação de oligossacarídeos. Os oligossacarídeos marcados com APTS foram excitados a 488 nm, sendo o sinal coletado com um filtro de 520 nm. A combinação de perfis de eletroferogramas dos substratos padrões com os perfis de eletroferogramas depois da reação enzimática foram usados para a identificação dos produtos formados.

#### 4.2.10 Espectroscopia de massas do produto de hidrólise

Para corroborar com o resultado obtido com a eletroforese capilar e elucidar o mecanismo de clivagem da endoglucanase em estudo, foi conduzido o experimento de espectroscopia de massas do produto de hidrólise. O ensaio foi realizado em triplicata e a reação com volume total de 100 µL, continha 2,0 µL da enzima na concentração de 80 µg/mL, 50 µL de substrato celohexaose a 1 mM (Megazymes) e 48 µL de tampão de bicarbonato de amônio 20 mM pH 4,0.

A reação foi incubada a 55 °C e as alíquotas foram tiradas nos tempos 0, 5 e 15 minutos, fervidas a 100 °C durante 5 minutos, para certificar que a reação havia parado e então colocadas em gelo. O preparo das amostras para aplicação na placa MTP 384 se deu após a centrifugação a 16.000 g durante 10 minutos e suplementação com 5 mM de NaCl. Então, 1 µL da amostra foi misturada com 1 µL da matriz, composta por uma solução de ácido 2,5-di-hidroxibenzóico (10 mg/mL) em acetonitrila 30%.

Os produtos de oligossacarídeos foram analisados em equipamento Microflex LT MALDI-TOF system (Bruker Daltonics), operando em modo de íon positivo. Um único espectro foi obtido calculando a média de cinco espectros independentes gerados por 300 disparos de laser a 60% de potência.

#### 4.2.11 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica bem estabelecida e amplamente utilizada em áreas relacionadas com biologia, geologia e ciência dos materiais. Através dela é possível a obtenção de imagens superficiais de alta resolução. A obtenção das imagens se dá partir da interação de um feixe de elétrons focalizado sobre a amostra, o qual varre a sua superfície ponto a ponto, revelando características relevantes da amostra como composição elementar, topografia, cristalinidade, potencial elétrico, campo magnético local, etc.<sup>143</sup> Também é capaz de proporcionar imagens com alta resolução, alcançando 5 nm nos microscópios de emissão de campo (FESEM), ou seja, resolução muito superior quando comparada com a de microscópios ópticos que é de 0,5 µm. Devido a alta profundidade de campo obtida e dos efeitos de contraste produzidos pelos elétrons secundários e retroespalhados, as imagens possuem uma aparência tridimensional, o que facilita a interpretação das imagens capturadas.<sup>143</sup>

Com o objetivo de visualizar as alterações nas superfícies das fibras provocadas pelo processo enzimático, optamos por realizar a microscopia eletrônica de varredura (MEV). No cenário das celulasas, a maioria dos trabalhos utilizam-se da MEV para evidenciar, principalmente, a fibrilação externa provocada pela ação enzimática.<sup>144-145</sup> O experimento foi realizado no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), Campinas, SP em colaboração com a Prof. Dra. Camila Rezende.

Amostras de flocos de aveia, que são ricos em β-glucano, foram submetidos a hidrólise por *ThCel7B*-full e *ThCel7B*-CCD durante 12 horas a 50 °C em dois diferentes pHs (3 e 5). Os

ensaios foram realizados em triplicata e a mistura reacional, composta de 5  $\mu\text{L}$  de enzima a uma concentração de 1 mg/mL, 95  $\mu\text{L}$  de tampão citrato de sódio 50 mM, e 6 mg de flocos de aveia. No controle, o volume de enzima foi substituído por 5  $\mu\text{L}$  de tampão. O substrato sólido, remanescente após ação enzimática, foi seco a 30 °C por 12h em estufa e após esse passo, fixadas em suportes de amostras de MEV, usando um pequeno pedaço de fita de carbono, seguidas de revestimento com ouro em um metalizador SCD Balzers 050 por pulverização catódica (corrente 40 mA, tempo de 60 s).

Um grande número das imagens foi obtida para diferentes áreas das amostras (cerca de 20 imagens por amostra), para garantir a reprodutibilidade dos os resultados.

#### 4.2.12 Dicroísmo circular (CD)

A luz linearmente polarizada possui duas componentes circularmente polarizadas de igual magnitude, uma que gira no sentido anti-horário (L) e outra que gira no sentido horário (R). O fenômeno de dicroísmo circular é a propriedade observada em uma molécula que possui centros assimétricos (centro quiral) quando ela absorve de maneira diferenciada, essas duas componentes da luz.<sup>146</sup>

Uma vez que grande parte macromoléculas biológicas são opticamente ativa, possuem os principais centros quirais ( $C\alpha$ ) ao longo da cadeia principal e a atividade óptica está relacionada à sua conformação, o CD é uma ferramenta biofísica rápida e eficaz, extremamente utilizada para avaliação de estruturas secundárias.<sup>147</sup> As proteínas possuem alguns componentes comuns, os quais emitem sinal em regiões típicas, por exemplo, a ligação peptídica apresenta absorção abaixo de 240 nm, cadeias laterais de aminoácidos aromáticos apresentam absorção no intervalo de 260 a 320 nm e as ligações dissulfeto exibem sinal na região de 260 nm.<sup>148</sup>

Deste modo, a partir do espectro de CD da proteína, com o auxílio de programas computacionais que utilizam diferentes métodos de desconvolução, é possível estimarmos a porcentagem de cada estrutura secundária presente (hélices  $\alpha$ , folhas  $\beta$ ), visto que estas possuem um espectro de CD característico.<sup>149</sup> O dicroísmo circular é utilizado, portanto, na avaliação do comportamento estrutural das moléculas frente a diferentes condições como temperatura, pH, tampões, etc.<sup>148</sup>

Para avaliar então o comportamento da proteína em estudo frente a mudanças de pH, as enzimas foram incubadas a uma concentração de 5  $\mu$ M em tampão acetato /borato/fosfato 40 mM nos pHs 3, 4, 5, 7, 8 e 9. As amostras foram centrifugadas a fim de evitar possíveis interferências de partículas em suspensão e o espectro de dicroísmo circular 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 195 a 260 nm, a uma velocidade de 100 nm/min e resolução de 1 nm, utilizando uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 0,1 cm.

Como resultado, obtivemos um espectro de CD expresso em miligraus (mdeg, milidegrees) pelo sinal médio de 8 espectros, sendo que os tampões utilizados como branco nos experimentos também foram medidos e deduzidos do espectro da amostra para resultar no espectro da proteína. O programa Spectra Manager (JASCO) foi utilizado para o registro dos dados. Através da monitoração da mudança de elipticidade utilizando um comprimento de onda de 215 nm e um gradiente de temperatura de 10 a 90°C, com incremento de 5°C, também foi possível realizar experimentos de desnaturação térmica

#### **4.2.13 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)**

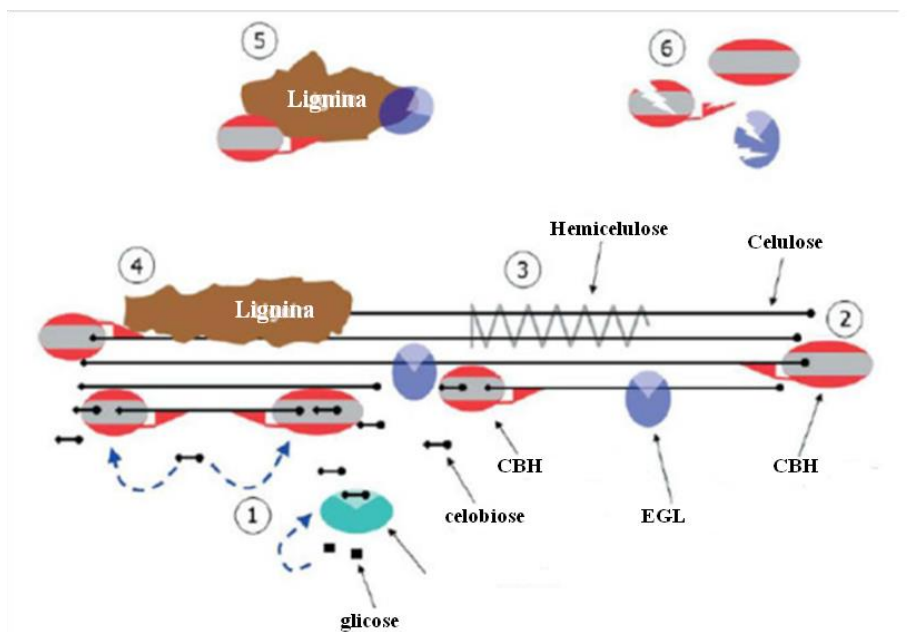
O espalhamento de luz dinâmico, é um método eficaz para a caracterização estrutural de proteínas uma vez que a intensidade e a distribuição angular da luz espalhada depende do tamanho e da forma das partículas que provocam o espalhamento em solução.

O DLS é uma técnica empregada para determinação de tamanho de partículas, massa molecular e o raio de giro de macromoléculas em solução a partir das flutuações de luz espalhada pelas amostras as quais estão diretamente relacionadas com o movimento Browniano. Uma radiação monocromática (laser) incide sobre partículas dispersas que se encontram em movimento Browniano em um meio líquido, onde partículas com tamanhos diferentes movem-se também com velocidades diferentes, de forma que as partículas menores irão se mover com velocidade maior do que as partículas grandes. A luz espalhada sofre variações na intensidade com o passar do tempo e ao analisar esta variação em um determinado intervalo de tempo, é possível verificar uma relação com o tamanho das partículas.

Essa técnica foi empregada para avaliarmos o estado de oligomerização em solução da proteína *ThCel7B-CCD*. Para isso, realizamos o ensaio utilizando 1 mg/mL da proteína incubada em tampão ABF nos pHs de 2 a 10, as quais foram centrifugadas a 4.000 g durante 15 minutos à temperatura ambiente, imediatamente antes das medições. As medidas de DLS foram realizadas no equipamento Zetasizer Nanoseries (Malvern), no Laboratório de Biofísica Molecular (IFSC-USP), em uma cubeta de quartzo (caminho ótico de 1 cm), com temperatura de 28°C, tempo de aquisição de 120 segundos e 15 aquisições por medida. O efeito do tampão foi subtraído de cada medida para eliminar o ruído produzido por ele e o cálculo da massa molecular feito com base no raio hidrodinâmico da proteína calculado usando a Zetasizer Software IV.

### **4.3 Estudo sobre ligação enzimática improdutiva em celulose**

A hidrólise enzimática compreende uma etapa de adsorção das celulasas sob sítios da superfície da celulose, sendo esta interação, um pré-requisito para a hidrólise da biomassa<sup>150</sup>. Uma abordagem atual que envolve a degradação da celulose, é o decaimento acentuado da taxa de hidrólise, fator que diminui o rendimento e exige grandes quantidades de enzimas para converter a biomassa de maneira eficaz. Embora o mecanismo específico responsável pela redução da eficiência da hidrólise ainda não tenha sido elucidado, a diminuição da atividade catalítica com o aumento do tempo de hidrólise, levou alguns autores a considerar se o decaimento atividade está associada com os estados não produtivos da enzima adsorvida<sup>151</sup>. A Figura 10 ilustra alguns dos fatores limitantes envolvidos no decaimento da hidrólise enzimática, dentre eles, a ligação improdutiva de celulasas.



**Figura 10** - Fatores limitantes da eficiência da hidrólise da celulose. 1) Inibição por produto; 2) Ligação improdutiva da celobiohidrolase à celulose; 3 e 4) Hemiceluloses e lignina associadas impedindo acesso das celulases na superfície da celulose; 5) Enzimas adsorvidas na lignina; 6) Desnaturação da enzima.

**Fonte:** Adaptada de CANNELLA et al.<sup>152</sup>

O equilíbrio entre enzima livre e adsorvida pode ser expresso como "livre +  $N_{\text{sites}} \leftrightarrow$  ligada" para as enzimas celulolíticas, onde se referem livre e ligada à enzima livre e adsorvida, respectivamente, enquanto  $N_{\text{sites}}$  é o número de locais de adsorção disponíveis sobre o substrato.<sup>153</sup> Uma abordagem amplamente utilizada para investigação do mecanismo de adsorção é o estudo de isotermas de adsorção, definida como a relação de equilíbrio entre a concentração na fase fluida e a concentração nas partículas adsorventes a uma dada temperatura.

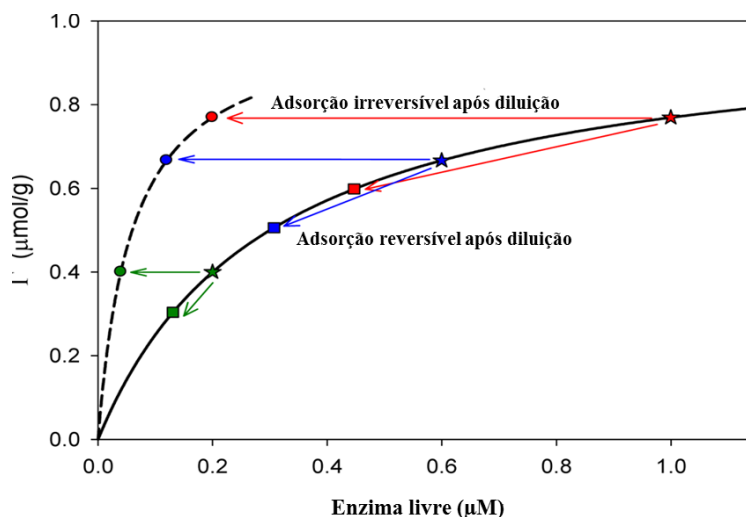
Através dessas isotermas, é possível quantificar a celulase adsorvida sobre as superfícies de materiais lignocelulósicos pré-tratados e/ou Avicel.<sup>81;154</sup> São curvas extremamente úteis, que nos indicam, por exemplo, a forma como o soluto adsorverá efetivamente no adsorvente (reversível ou irreversível). Para o estudo de adsorção de enzimas do sistema celulolítico, a isoterma de Langmuir é a mais utilizada, onde a adsorção é dada por uma constante de equilíbrio e por uma constante que representa a máxima capacidade de adsorção da enzima no substrato.<sup>155</sup> A isoterma de Langmuir é dada pela equação:  $E_{\text{ads}} = E_{\text{max}} K_p E_{\text{free}} / (1 + K_p E_f)$ , onde,  $E_{\text{ads}}$  é a enzima adsorvida;  $E_{\text{max}}$  é a adsorção máxima de enzima por grama de substrato;  $E_{\text{free}}$  é a concentração de enzima livre e  $K_p$  é a constante de equilíbrio da adsorção.

O estudo acerca de adsorção e ligação improdutiva de celulasas aqui descrito, foi baseado no conhecimento adquirido durante o doutorado sanduíche realizado sob a supervisão do Prof. Dr. Peter Westh, da Universidade de Roskilde, na Dinamarca. Durante os 6 meses de estágio, foi realizado um estudo constante da área, e fixação da metodologia aplicada, realizada para diferentes enzimas e diversos substratos. Os resultados positivos e surpreendentes, aliado ao desejo de aplicar o conhecimento obtido durante essa experiência internacional, impulsionou a caracterização da endoglucanase I de *T. harzianum* nesse contexto experimental.

### 4.3.1 Adsorção: reversível ou irreversível?

Uma questão intrigante a respeito da adsorção, que ainda não está esclarecida, é se a adsorção é reversível ou não. Alguns trabalhos citam essa interação como sendo irreversível,<sup>156</sup> parcialmente irreversível.<sup>157</sup> Em oposição há autores que concluem que a adsorção é parcialmente reversível,<sup>158</sup> e ainda, totalmente reversível.<sup>159</sup> Esta abordagem tem uma série de implicações importantes, tais como a viabilidade de reciclagem de enzima em aplicações industriais.

Por isso, esforços experimentais têm se concentrado em como a enzima adsorvida pode ser facilmente solubilizada, por exemplo, após a diluição com tampão. Neste sentido, a reversibilidade completa é conseguida quando a isotérmica de adsorção medida em função do aumento gradual da concentração de enzima (chamada de isotérmica ascendente) sobrepõe a isotérmica obtida por diluição (isotérmica descendente), como ilustrado na Figura 11.



**Figura 11** - Ilustração de como o experimento de diluição com amostras de diferentes concentrações iniciais de enzima pode ser interpretado em relação à reversibilidade da adsorção.



**Fonte:** Adaptada de PELLEGRINI et al.<sup>160</sup>

Para os ensaios iniciais de adsorção, utilizamos *ThCel7B-full* e *ThCel7B-CCD*, com concentrações da enzima em solução determinada a partir de nanodrop, utilizando o coeficiente de extinção molar. Como substrato utilizamos o Avicel PH-101 (Sigma) lavado aproximadamente 20 vezes com água Milli-Q, antes de ressuspensão em tampão citrato pH 3 para obtenção de um estoque de 10 g/L. As determinações de massa seca foram realizadas em triplicata, a fim de estimar a concentração exata de substrato no experimento e para quantificar a perda de substrato durante a hidrólise. Para isso, 1 mL de substrato foi adicionado à tubos *ependorf* previamente pesados e as amostras foram secas e estufa a 80 °C durante 24 horas. Passado esse tempo, os tubos incluindo os resíduos sólidos secos, foram pesados novamente e calculada a massa real.

Para a quantificação da enzima livre eluída, utilizamos a fluorescência intrínseca, com excitação a 280 nm e 345 nm de emissão. As amostras foram medidas, imediatamente, após a preparação, a fim de evitar que o sinal de fluorescência diminuísse ao longo do tempo.

#### **4.3.2 Ensaios de diluição padrão – sem centrifugação**

A reversibilidade das interações enzima-substrato foi testada num ensaio de diluição padrão. Realizamos as suspensões de substrato em oito tubos falcon de 15 mL, onde foi adicionado o estoque de enzima, suficiente para produzir concentrações totais de enzima (E0) de 0; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,50; 2,00 e 3,00  $\mu\text{M}$ . A carga de substrato, (6 g/L) foi a mesma nas oito amostras e o volume reacional de 1 mL.

Após a adição da enzima, as amostras foram incubadas em um homogeneizador a 30 rpm, colocado dentro do *shaker* para manter a temperatura de 25 °C, durante 30 minutos. Decorrido este tempo, foram retiradas de cada um dos falcon uma alíquota de 250  $\mu\text{L}$ , as quais foram centrifugadas durante 3 minutos a 14.000 g e a concentração de enzima no sobrenadante foi medida e utilizada como a concentração de enzima livre antes da diluição. O restante de cada amostra (850  $\mu\text{L}$ ) foi diluído com o tampão citrato em 5 mL e colocado de volta no homogeneizador por 1 hora. Então, as reações foram centrifugadas, o sobrenadante coletado para

a leitura, sendo que a concentração de enzima no sobrenadante da amostra diluída foi utilizada como enzima livre, após a diluição.

#### **4.3.3 Ensaios de diluição – com centrifugação**

No ensaio de diluição padrão descrito acima, a centrifugação é usada apenas para isolar o sobrenadante para medições de concentrações de enzima livres, sendo que o complexo enzima-substrato não é exposto à centrifugação antes da diluição. Este fator contrasta com trabalhos anteriores, os quais têm a reversibilidade avaliada por ressuspensão complexo enzima-celulose após sedimentação por centrifugação.

Para avaliar os possíveis efeitos causados pela centrifugação, realizamos o mesmo experimento porém testamos a reversibilidade da adsorção após a sedimentação. Deste modo, o procedimento seguiu o ensaio padrão até a etapa onde as amostras com 1,0 mL foram colocadas no homogeneizador durante 30 minutos. Após este passo, as amostras totais (não mais alíquotas de 250 µL) foram centrifugadas durante 3 minutos a 4.000 g, e o sobrenadante cuidadosamente removido. Este, foi utilizado após a medida de fluorescência, como a concentração de enzima livre antes da diluição. O *pellet* foi ressuspensão em 5 mL de tampão, incubado novamente no homogeneizador durante 60 minutos, e do mesmo modo do ensaio padrão, ao término, as reações foram centrifugadas, o sobrenadante coletado para leitura e quantificados para a enzima livre após a diluição.

A metodologia utilizada nesse experimento bem como são realizados os cálculos para obtenção das ascendentes e descendentes, estão minuciosamente descritas em Pellegrini, *et.al.*<sup>160</sup>

#### **4.4 Estudos de sinergismo**

##### **4.4.1 Produção de celobiohidrolase I de *Trichoderma harzianum***

Com o intuito de realizar testes de sinergismo, foi necessário uma exocelulase, e por isso expressamos e purificamos uma celobiohidrolase I de *Trichoderma harzianum* (CBHI - ThCel7A), que também havia sido clonada pela aluna Viviane Isabel Serpa.

Em resumo, *ThCel7A* foi produzida da mesma maneira que *ThCel7B* já descrita aqui na seção 4.2. Após amplificação do gene, o mesmo foi clonado no vetor ANip7G através da tecnologia Gateway e transformados em *Aspergillus niger* cepa PY11. Transformantes positivos quanto à expressão da proteína foram escalonados para expressão em larga escala, sendo que a cultura foi incubada a 30° C ao longo de 6 dias, sob condições estáticas. Após o cultivo, a proteína foi precipitada *overnight* com sulfato de amônio a uma saturação de 80%, seguida por injeção em cromatografia hidrófoba. O passo de purificação final foi uma cromatografia de exclusão molecular e as amostras purificadas analisadas por 15% SDS-PAGE.

#### **4.4.2 Ensaios de atividade *ThCel7A* - determinação pH e temperatura ótima**

Os ensaios de atividade de *ThCel7A*, foram realizados contra pNPC a fim de determinar a temperatura e o pH ótimo da enzima. A concentração de *ThCel7A* utilizada foi de 0,5mg/mL e todos experimentos foram realizados em triplicata. A reação se deu através da mistura de 40 µL de tampão, 50 µL de substrato e 10 µL de enzima. As reações foram aquecidas a 50 °C por 30 min e então 100 µL de uma solução de carbonato de sódio 1 M foi adicionado para paralisar e conferir cor à reação. Após a clivagem do substrato, há a liberação de celobiose e de p-nitrofenil (pNP). Quando adicionamos carbonato de sódio na reação, o pNP reage conferindo a cor amarela ao experimento. Assim, quanto mais pNPC clivado, mais forte a cor revelada. A medida da absorbância foi feita em  $\lambda = 410$  nm.

Inicialmente, variando o pH de 2,0 a 10,0 com tampão ABF, calculamos a atividade relativa para cada um dos pHs analisados para no ensaio contra o pNPC. Com esses dados, plotamos uma curva a fim de demonstrar de forma mais clara a influência do pH na reação. Frente ao pH ótimo, determinamos a temperatura ótima através da incubação da enzima também em pNPC, variando a temperatura em equipamento de termociclador, da Bio-Rad, com controle de temperatura das canaletas individuais, de 25 a 85 °C. O experimento de determinação de temperatura ótima foi realizado em tampão de citrato de sódio 50 mM, pH 5,0.

#### **4.4.3 Determinação das condições ótimas de hidrólise**

Os estudos de sinergismo foram realizados utilizando apenas a proteína inteira (*ThCel7B-full*). Para chegar em um consenso da dosagem de cada enzima a ser utilizada nos experimentos de sinergismo, foi determinado o FPU (*Filter Paper Unity*). Esse método é baseado na dosagem dos açúcares redutores liberados pela atividade das celulasas sobre o substrato celulósico de papel filtro.

Para isso, diferentes concentrações de *ThCel7B-full* e *ThCel7A* foram incubadas em tampão de citrato de sódio 50 mM (pH 5,0), com um disco de 5,0 mm Whatman N ° 1 de papel de filtro (2,5 mg), durante 1 hora.<sup>161</sup> A reação foi cessada pela adição de 100 µL de DNS e mantida a 100 °C durante 5 minutos. A absorbância do sobrenadante foi medida a 540 nm e todos os ensaios foram realizados em triplicata. Uma unidade internacional (UI) de FPU corresponde à quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de açúcar redutor por minuto nas condições do experimento. Foi determinado frente a essas condições, o FPU que nos permitisse sinal de leitura ao mesmo tempo que a carga enzimática utilizada não fosse extremamente elevada.

Os períodos de reação de 0,25, 1,0, 2,0, 3,0, 6,0, 24 e 48 horas foram testados para avaliar o tempo de reação mais adequado para experimentos de sinergismo. Embora a atividade residual de *ThCel7B-full* já estivesse determinada, para certificar que as enzimas mantiveram a sua atividade durante os períodos de incubação, a atividade enzimática foi seguida pelo ensaio de atividade residual durante todo o experimento.

#### **4.4.4 Efeito do pH no ensaio de sinergismo**

O efeito do pH sobre a atividade enzimática foi avaliado separadamente para cada enzima e, em seguida, o sinergismo foi investigado em pHs 3, 4 e 5. No conjunto experimental usando as enzimas separadas, o meio reacional foi composta por 10 µL de enzima diluída em 50 mM de tampão de citrato de sódio para atingir uma carga final de enzima 0,15 FPU, 90 µL do tampão com o pH correspondente e 1 disco de papel filtro como substrato (2,5 mg). Na reação sinérgica, as condições experimentais foram mantidas as mesmas, mas as duas enzimas foram adicionadas em conjunto, mantendo uma carga enzimática de 0,15 FPU para cada uma. Na amostra controle, o volume de enzima foi substituído por tampão. A reação foi incubada a 50 °C durante 4 horas, seguido pela adição de 100 µL de DNS, e fervura a 100 °C durante 5 minutos. A absorbância da solução foi medida a 540 nm.

Uma reação controle, onde a carga enzimática foi substituída por albumina de soro bovino (BSA), também foi realizada para verificar se os efeitos observados sobre a atividade medida era devido o exo/endo sinergismo ou por influência de carga proteica.

#### 4.4.5 Efeito do substrato no ensaio de sinergismo analisado por microscopia eletrônica

Os efeitos sinérgicos de celulasas em geral são investigados em diferentes substratos, uma vez que propriedades intrínsecas dos substratos tem consequências distintas sobre os rendimentos da hidrólise tanto pela celulasas individuais quanto nos coquetéis.<sup>99</sup> Os estudos anteriores mostraram que o grau de sinergismo é influenciado pela área total da superfície disponível para as celulasas, pela cristalinidade do substrato, pelo grau de polimerização, além de outros fatores como a distribuição de lignina residual e hemicelulose.<sup>99; 162</sup> Dentre os substratos conhecidos como modelo, optamos por testar o papel filtro Whatman No. 1 feito a partir de algodão<sup>28</sup> e a celulose bacteriana (BC).

A celulose bacteriana foi produzida por *Gluconacetobacter hansenii* linhagem ATCC 23769, (GenBank número: CM000920), utilizando-se de protocolo anteriormente descrito na literatura.<sup>163</sup> Resumidamente, a bactéria foi crescida em meio SH (Hestrin–Schramm)<sup>164</sup> modificado, contendo 25 g.L<sup>-1</sup> de D-manitol, 5 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e 3 g.L<sup>-1</sup> de peptona, com pH 6,0. A cultura foi mantida estaticamente incubada em estufa a 30°C por 45 dias, monitorada quanto à possíveis contaminações diariamente e, após esse período, a membrana de celulose produzida foi recuperada, lavada com água deionizada para remoção do meio de cultura residual e tratada com NaOH 0,1 M a 80 °C durante 20 minutos. Para a neutralização, usamos uma solução de ácido acético a 5% na BC, seguida por lavagem com água destilada e então os filmes de celulose bacteriana foram secos em temperatura ambiente. Para utilização nos experimentos, a BC foi cortada esfericamente ( $\varnothing = 5$  mm), do mesmo modo e no mesmo cortador de papel utilizado para o papel filtro e ambos usados a 2,5mg.

Além dos testes enzimáticos para o cálculo do grau de sinergismo, foi utilizada a técnica de microscopia para fornecer informação visual sobre as mudanças morfológicas que ocorrem nos substratos, comparativamente, com ação das enzimas separadamente e em cooperação. Os ensaios foram conduzidos em triplicata, e a celulose tratada com *ThCel7A* e *ThCel7B* individualmente e em sinergismo, como se segue: 1) 10  $\mu$ L de *ThCel7A* diluída em 90  $\mu$ L de

tampão de citrato de sódio 50 mM; pH 5; 2) 10  $\mu$ L de *ThCel7B* diluído em 90  $\mu$ L do mesmo tampão e; 3) 10  $\mu$ L de *ThCel7A* mais 10  $\mu$ L de *ThCel7B* diluídas em 80  $\mu$ L de tampão. Na amostra de controle, apenas o substrato e tampão citrato foram encubados, na ausência das enzimas.

Os substratos foram submetidos à hidrólise durante 12, 24 e 48 horas, a 50°C, e após esses tempos, o substrato sólido restante (papel de filtro ou de celulose bacteriana) foi removido do hidrolisado e a quantidade de açúcares redutores foi quantificada no sobrenadante pelo método de DNS, para cálculo do grau de sinergismo. Então, volumes iguais (100  $\mu$ L) de sobrenadante e reagente DNS foram fervidos durante 5 minutos a 100°C e a absorbância medida a 540 nm.

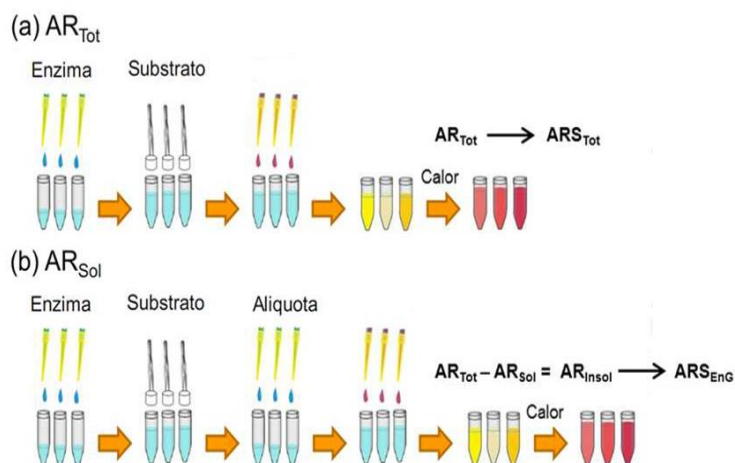
Os substratos sólidos recuperados do meio reacional nos três tempos acima citados foram enviados para o Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), Campinas, SP para análise por microscopia eletrônica em colaboração com a Prof. Dra. Camila Rezende. Para tanto, os substratos foram secos a 30 °C durante 12 horas em estufa, fixado em suporte adequado com fita de carbono e, em seguida, revestido com ouro por pulverização catódica. SCD 050 (Oerlikon-Balzers).

A análise das amostras foram realizadas sob vácuo, utilizando uma voltagem de aceleração de 5 kV e um grande número de imagens de diferentes áreas de cada amostra foram obtidas (20-25 imagens por amostra) para garantir a reprodutibilidade dos resultados.

#### **4.4.6 Investigação de sinergia através da análise da liberação de açúcar redutor total, solúvel e insolúvel produzidos na hidrólise**

Diferentes tentativas de melhorar as metodologias para a determinação de atividades celulolíticas têm sido propostas, dentre elas decidimos abordar a proposta baseada na determinação de açúcares redutores insolúveis ( $AR_{Insol}$ ) produzidos ao longo da hidrólise. Os açúcares redutores insolúveis ( $AR_{Insol}$ ) consistem em extremidades reduzidas da cadeia de celulose, que permaneceram ligadas à mesma. Por outro lado, os açúcares redutores solúveis ( $AR_{Sol}$ ) são as extremidades reductoras dos oligossacarídeos solúveis liberados durante a hidrólise. Já os açúcares redutores total ( $AR_{Tot}$ ) se trata da soma dos  $AR_{Sol}$  e  $AR_{Insol}$ .<sup>165</sup> Deste modo, experimentalmente, foram determinados  $AR_{Tot}$  e  $AR_{Sol}$ , sendo que o  $AR_{Insol}$  foi calculado através da subtração de  $AR_{Sol}$  do  $AR_{Tot}$ .

A produção de  $AR_{Insol}$  é atribuída às endoglucanases, uma vez que estas enzimas atuam, majoritariamente, na celulose não cristalina, sem a liberação de quantidades consideráveis de açúcares redutores solúveis ( $AR_{Sol}$ ).<sup>166</sup> Para essas análises, nos baseamos na metodologia descrita por Silveira, *et.al*,<sup>165</sup> com pequenos ajustes relacionados com o volume de reação. Com o intuito de investigar o comportamento sinérgico, o ensaio foi composto de 360 nM *ThCel7B* e 780 nM *ThCel7A*, diluídas em 200  $\mu$ L de tampão citrato de sódio 50 mM (pH 5,0), dois discos de papel filtro Whatman No. 1, totalizando 5 mg de substrato. Após 24 horas, a quantidade de extremidades reductoras total foi determinada usando o sistema de reação total (sobrenadante e FP), ou seja, a adição de DNS se deu no próprio tubo de ensaio, enquanto que a quantidade de açúcares solúveis foi determinada apenas no sobrenadante, o qual foi transferido para outros tubos. A Figura 12 ilustra como foi realizado a preparação das amostras para a leitura. Todas as reações contendo DNS foram fervidas e as absorbâncias medida espectroscopicamente a 540 nm, como já descrito.



**Figura 12** - Representação esquemática da metodologia utilizada para medição de (A)  $AR_{Tot}$  e (B)  $AR_{Sol}$ .  
**Fonte:** Adaptado de SILVEIRA.<sup>167</sup>

#### 4.5 Ensaios preliminares utilizando bagaço de cana como substrato

Com o intuito de avançarmos na caracterização bioquímica de *ThCel7B*, avaliamos o seu potencial de hidrólise diretamente no bagaço da cana de açúcar, que é um substrato complexo e fundamental para a produção de etanol segunda geração

Para tanto, utilizamos o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* obtidos do Grupo Cosan (Ibaté, São Paulo, Brasil) e bagaço pré-tratados, a partir da combinação de dois processos:

hidrotérmico e organossolve. Estes substratos pré tratados, foram gentilmente cedidos pela aluna de mestrado Melissa Espírito Santo que atua em um projeto baseado na caracterização da biomassa, desenvolvido no Grupo de Biotecnologia Molecular do IFSC-USP

O bagaço *in natura* de cana de açúcar foi seco em forno de convecção a 60 °C durante 24h antes de receber os pré-tratamentos. Resumidamente, o pré-tratamento hidrotérmico ocorreu através do aquecimento das amostras de bagaço em autoclave a 160 °C e uma pressão de 7 bar durante 30 minutos (amostra designada como H 30). O pré-tratamento organossolve se deu por

Amostra	Composição química (%)		
	Celulose	Hemicelulose	Lignina
<i>In natura</i>	38.3 ± 0.1	20.1 ± 0.07	29.1 ± 1.0
H 30	46.5 ± 0.3	19.30 ± 0.14	27.8 ± 3.0
Org 50	55.3 ± 8.0	14.9 ± 3,10	21.8 ± 2.0
Org 150	69.3 ± 4.3	9.10 ± 0.01	14.6 ± 0.1
H30+Org150	79.2 ± 0.5	5.3 ± 0.01	10.8 ± 0.2

aquecimento das amostras em etanol diluído em água (50% v/v) a 190 °C, usando um banho de glicerina (Marconi), para dois tempos diferentes de reação, 50 e 150 minutos

(amostras denominadas como Org 50 e Org 150). Finalmente, o pré-tratamento hidrotérmico e organossolve também foram combinados em uma sequência, primeiramente aplicando o tratamento hidrotérmico, durante 30 minutos, seguido pelo tratamento organossolve durante 150 minutos (amostras chamadas de comb30/150).

Depois dos pré-tratamentos, as frações sólido e o de licor foram separados por filtração. Os sólidos foram lavados com água até neutralização do pH e em seguida levado para secar em estufa durante 24 horas a 60 °C. A composição química do bagaço foi determinada por cromatografia de troca iônica de alta resolução com detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD) e está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 - Composição química dos bagaços de cana de açúcar.



**Fonte:** Elaborada pela autora.

Para a avaliação hidrolítica da *ThCel7B* em bagaço de cana, as amostras foram hidratadas em tampão, por imersão de 10 mg de cada bagaço em 100  $\mu\text{L}$  de tampão citrato de sódio 50 mM (pH = 5), com agitação constante a 150 rpm e 50 °C durante 24 horas. Após a hidratação, 100  $\mu\text{L}$  da enzima diluída foi adicionado ao meio de reação e o volume completado com tampão para 300  $\mu\text{L}$ . Na reação controle, o volume da solução enzimática foi substituído por tampão.

A carga enzimática utilizada foi 0,15 FPU e todas as reações foram incubadas durante 48 horas de hidrólise. Subsequentemente, a amostra foi centrifugada para separar o sobrenadante do bagaço, e em seguida, 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi pipetado para um novo tubo de *ependorf* para que o açúcar redutor liberado na hidrólise fosse quantificado pelo método de DNS.

#### **4.6 Cristalografia de proteínas**

O trabalho descrito nessa seção foi realizado em colaboração com o aluno de doutorado do mesmo grupo de pesquisa, André Godoy.

Os ensaios de cristalização foram realizados com ambas proteínas ao longo de todo o período de doutoramento e, durante mais de três anos, todas as tentativas foram frustradas.

A cristalografia de proteínas é uma importante ferramenta para os estudos estruturais e envolve uma sequência de eventos complexos e intimamente relacionados com a obtenção dos cristais. A formação de cristais ocorre quando são atingidas condições de supersaturação da solução proteica, onde a concentração de proteína ultrapassa o equilíbrio termodinâmico da solubilidade, tornando-a insolúvel. Para que não haja a formação de precipitados amorfos, é fundamental que a perda de solubilidade da proteína ocorra vagarosamente. Os cristais de qualidade são altamente ordenados, com tamanho adequado e capacidade de difratarem em altas

resoluções. Há inúmeras variáveis capazes de afetar a cristalização, tais como, a concentração da proteína, nível de pureza temperatura, pH, força iônica, aditivos específicos e precipitantes.

Dentre as inúmeras estratégias abordadas na tentativa de cristalização, uma delas consistiu em reduzir a repulsão molecular que ocorre devido ao baixo valor de pI de *ThCel7B-CCD*. Para isso, após concentrar a proteína em Vivaspin™ (GE Healthcare) corte de 10 kDa até 40 mg/mL, adicionamos à enzima purificada, 10 mM de espermidina tricloridrato. As triagens iniciais foram realizadas através da técnica de difusão de vapor “Gota Sentada”, utilizando o robô de cristalização *Honeybee 931* (Genomic solutions) e *kits* de soluções de cristalização comerciais PEG I e PEG II (Qiagen), SaltRx e *Index* (Hampton). As gotas eram compostas por 1 µL de proteína em tampão citrato de sódio 50 mM pH 3,0, e 1 µL de cada solução de cristalização.

Os testes anteriores mostraram que o único agente precipitante que induziu a formação de algum tipo de precipitação da *ThCel7B-CCD* foi sulfato de amônio. Assim, variando a concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em diferentes tampões, foram obtidos cristais na forma de aglomerados de agulhas (“*spherulite*”) em 0,1 M de sulfato de amônio e 0,05 M de Tris-HCl a pH 7,5. Estes cristais foram então utilizados como núcleo de cristalização em um processo conhecido como semeadura (“*seeding*”) na mesma condição proteína precipitado. Após três meses, houve o aparecimento de um pequeno cristal, o qual levou cerca de oito meses seguintes para atingir o tamanho para difração. Todos os experimentos de cristalização foram realizados a temperatura controlada de 18 °C.

Para a coleta de dados de difração de raios-X, o cristal crioprotetido com etileno-glicol 20% (v/v) foram montados em alças e coletados a temperaturas criogênicas (100 K) em fluxo de vapor de nitrogênio. Os dados de difração foram obtidos no difratometro de raios-X Bruker APEX DUO (Bruker), equipado com um detector do tipo APEX II CCD. O tempo de exposição foi de 20 segundos por imagem e a estratégia de coleta de dados e determinação do grupo espacial e foram realizadas com *software* PROTEUS. A integração do conjunto de imagens de difração e o refinamento dos parâmetros cristalinos foram realizados com o programa XDS<sup>168</sup> e o escalonamento, utilizando o programa Aimless.<sup>169</sup> O conteúdo de solvente foi estimado através do Matthews\_coeff.<sup>170</sup>

A estrutura de *ThCel7B CCD* foi resolvida por substituição molecular com o programa Phaser<sup>171</sup> a partir do modelo da endoglucanase I de *Trichoderma reesei* (PDB 1EG1, 87% de

identidade sequencial). O modelo foi refinado com phenix.refine<sup>172</sup> e Coot<sup>173</sup>, e validado com o MolProbity.<sup>174</sup>

## *Resultados e Discussão*



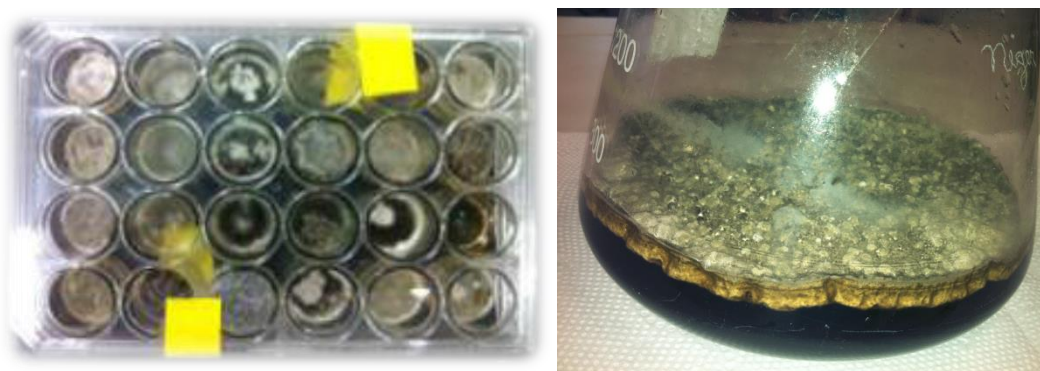
*Aquele que tem uma profissão tem um bem; aquele que tem uma vocação tem um cargo de proveito e honra.*

*Benjamin Franklin*

## 5 Resultados e Discussão

### 5.1 Produção em *Aspergillus niger*

Após a confirmação da amplificação e da clonagem com sucesso do gene *ThCel7B*-full e *ThCel7B*-CCD de *Trichoderma harzianum* no vetor ANIp7G pela técnica de *Gateway*, os mesmos foram transformados em *Aspergillus niger* e testados quanto à expressão da proteína em volume pequeno e em placas de acrílico de 24 poços, incubadas estaticamente em estufa. Os esporos das colônias dadas como positivas foram então coletados em solução salina e congelados em glicerol para uso posterior. O escalonamento para larga escala foi realizado inoculando os esporos em 5 litros de cultura, divididos em 5 frascos *erlenmeyers* de 2 litros cada. O cultivo se deu durante 6 dias, sendo que após esse período era possível observar a cultura esporulando e a formação de um "tapete" acima do sobrenadante (Figura 13). O pH do meio de cultivo nessas condições é de 5.5, e, nessas condições, temos a superexpressão da proteína.

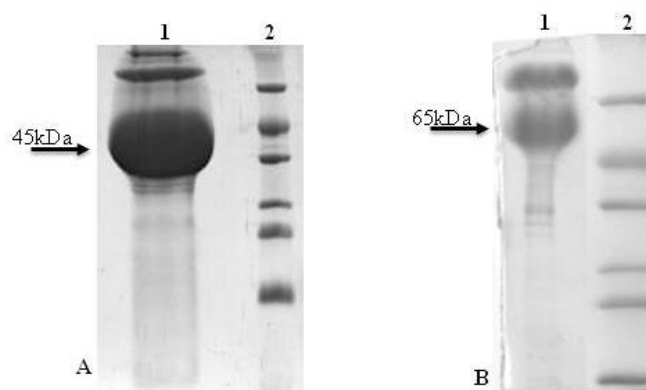


**Figura 13** - Placas de 24 poços e frasco *erlenmeyer* com cultura de *A. niger* após 6 dias de cultivo, onde é possível observar o "tapete" formado acima do sobrenadante.

**Fonte:** Elaborada pela autora.

As bandas correspondente às enzimas *ThCel7B*-full e *ThCel7B*-CCD foram identificadas no extrato proteico, por meio de SDS-PAGE, confirmando o sucesso da expressão. Os sobrenadantes das culturas foram concentrados para redução de volume (cerca de 100 mL) em *Hollow Fiber* e, em seguida, precipitados com 80% de sulfato de amônio. A precipitação de proteínas pelo gradativo aumento da concentração de sais é um processo bastante utilizado para a separação de misturas complexas de proteínas, uma vez que a concentração de sal necessária para

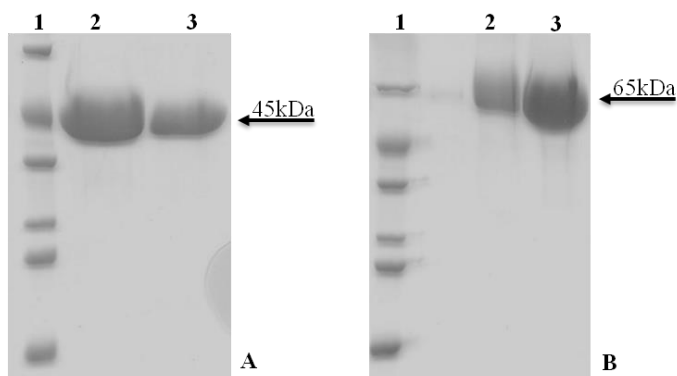
precipitação é diferente para cada proteína. O extrato extracelular do fungo *A. niger*, após os 6 dias de cultivo, já apresenta-se com um baixo conteúdo de contaminantes e, após a precipitação com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  foi possível observar a proteína de interesse concentrada 10x, majoritariamente expressa, como pode ser visualizado na Figura 14.



**Figura 14** - SDS-PAGE 15% utilizado para confirmação da expressão das proteínas. 1A- Amostra do extrato bruto após precipitação por  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  da *ThCel7B-CCD*. 2A- Marcador de massa molecular com destaque para a banda de 45kDa. 1B - Amostra de extrato bruto após precipitação por  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  da *ThCel7B-full*. 2B- Marcador de massa molecular com destaque para a banda de 70kDa.

**Fonte:** Elaborada pela autora.

Os passos seguintes de purificação foram realizados utilizando uma coluna de Phenyl Sepharose 6 Fast Flow, seguido de cromatografia de exclusão de tamanho em uma coluna Superdex 75 16/60, e ao final desse processo, a pureza das amostras foram novamente confirmadas por SDS-PAGE. Conforme mostrado na Figura 15, as duas construções foram obtidas com elevado grau de pureza.



**Figura 15** - Gel SDS-PAGE 15% mostrando a purificação das enzimas. 1A- Marcador de massa molecular com destaque para a banda de 45kDa. 2 e 3A- Amostras de *ThCel7B-CCD* concentradas após etapas de purificação. 1B- Marcador de massa molecular com destaque para a banda de 70kDa. 2e 3B - Amostras de *ThCel7B-full* concentradas após etapas de purificação

**Fonte:** Elaborada pela autora.

A análise do peso molecular das proteínas através da observação do gel SDS-PAGE, mostrou um aumento no peso molecular referente à *ThCel7B*-full (PM ~ 65 kDa), quando comparado a previsão teórica com base na sua sequência de aminoácidos (49,1 kDa) obtida por meio da ferramenta ProtParam do portal Expasy.<sup>175</sup> Este fato provavelmente resulta da glicosilação da proteína, o que é geralmente observado em celulases expressas por fungos filamentosos.<sup>124</sup> Por outro lado, o domínio catalítico foi expresso com o peso molecular próximo do valor previsto (42,8 kDa), indicando que a glicosilação está principalmente restrita a região do *linker* e/ou ao CBM.<sup>176</sup>

A sequência da proteína em estudo foi digerida com tripsina *in situ* e as massas dos peptídeos encontradas foram comparadas às massas dos peptídeos medidos por espectrometria de massa, com cobertura sequencial obtida acima de 35%, confirmando a identidade da proteína de interesse.

## **5.2 Caracterização bioquímica e biofísica**

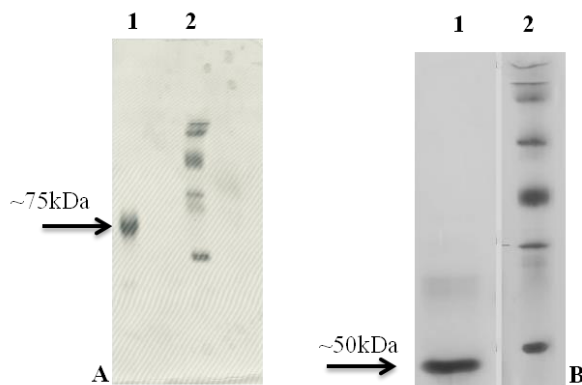
### **5.2.1 Estimativa da massa molecular real e estado oligomérico por cromatografia de exclusão molecular**

A proteína *ThCel7B*-full, na coluna de exclusão molecular, apresentou uma migração característica de proteína monomérica e sua massa molecular calculada ficou em  $59,2 \pm 5$  kDa, perto do valor experimentalmente observado em gel SDS-PAGE e, acima da massa teórica estimada a partir da sequência primária da proteína, conforme discutido no item 5.1. Em relação à *ThCel7B*-CCD, observou-se também um comportamento monomérico e a massa calculada ficou em  $48,1 \pm 3$  kDa, exatamente o valor esperado na estimativa da massa teórica e o observado em condição experimental.

### **5.2.2 Estado oligomérico analisado por gel nativo**

A proteína endoglucanase inteira e seu domínio catalítico isolado foram caracterizados quanto ao seu estado nativo pela aplicação de um gel não desnaturante com gradiente de 8-25% de concentração de acrilamida (Figura 16). No gel nativo, a migração das bandas não é tão

precisa para quantificar a massa molecular proteica, no entanto é possível sugerir que o estado oligomérico da proteína é monomérico, uma vez que ambas as construções apresentaram uma única banda para a concentração analisada. Tal resultado reflete o fato de termos a proteína em fração pura e monodispersa em solução.



**Figura 16** - Gel nativo das proteínas *ThCel7B-full* e *ThCel 7B-CCD*. 1A e 1B - Marcador de massa molecular. 2A - Amostra de *ThCel7B-full* em concentração de 2mg/mL e 2B - Amostra de *ThCel7B-CCD* em concentração de 2mg/mL.

**Fonte:** Elaborada pela autora.

### 5.2.3 Determinação de pH e temperatura ótima

Os ensaios de condições ótimas de atividade enzimática apresentaram resultados surpreendentes quando comparado com o esperado para essa família de proteínas.

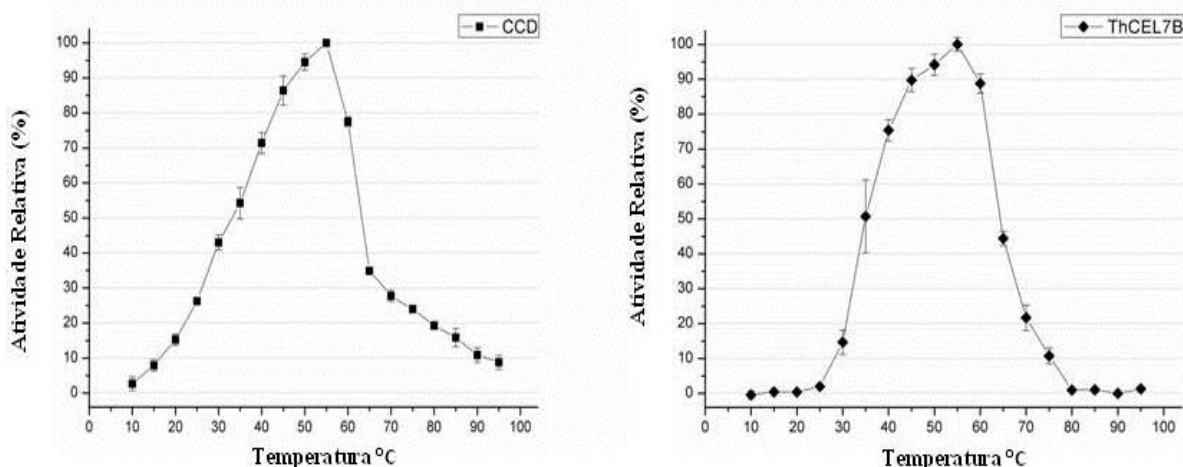
Para a determinação da temperatura ótima, a *ThCel7B-full* e *ThCel7B-CCD* tiveram seu perfil analisado através da medida da atividade enzimática em CMC, com o controle de temperatura das canetas individuais, de 25 a 85 °C, usando o tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5,0 (o pH ótimo de celulasas em geral). A temperatura de maior atividade enzimática foi de 55 °C, como pode ser visualizado na

Figura 17 - Efeito da temperatura na atividade enzimática de endoglucanase I de *T.harzianum*, usando CMC como substrato.

**Fonte:** Elaborada pela autora.

, e ficou dentro do valor esperado para uma endoglucanase fúngica, que apresentam temperaturas ótimas na faixa de 50 a 55 °C.<sup>177-178</sup>

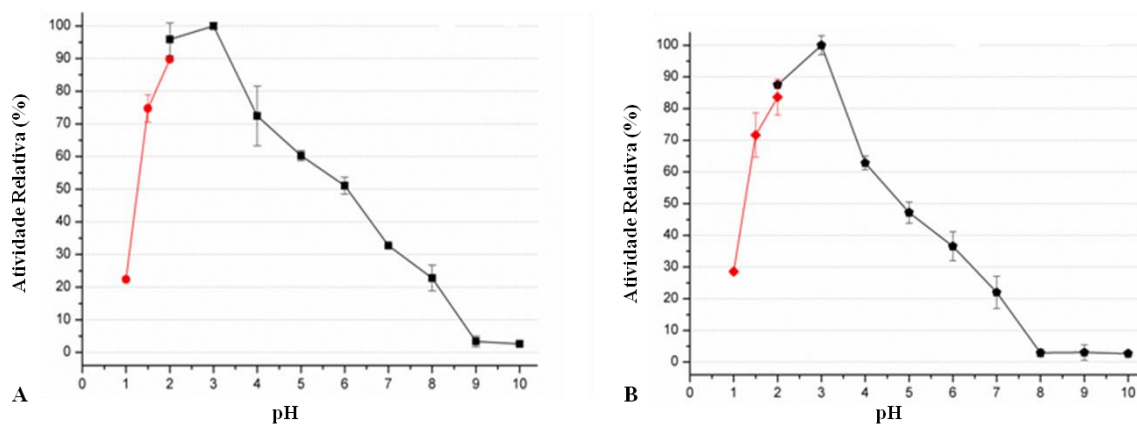




**Figura 17** - Efeito da temperatura na atividade enzimática de endoglucanase I de *T. harzianum*, usando CMC como substrato.

**Fonte:** Elaborada pela autora.

O perfil de pH foi traçado encubando as enzimas em CMC, diluídas em tampão ABF com valores de pH variando de 2,0 a 10,0. Surpreendentemente, tanto a *ThCel7B*-full quanto a *ThCel7B*-CCD mostraram atividade ótima em pH 3,0 e, nessas condições, não foi possível obter um perfil hiperbólico. Por isso, foi testado também, pH menor que 2,0 utilizando tampão HCl/KCl, vide Figura 18.



**Figura 18** - Efeito do pH na atividade enzimática frente a CMC. Para testar pH menor que 2, foi utilizado tampão HCl/KCl e pH maiores que de 2, tampão ABF. A) *ThCel7B* -CCD e B) *ThCel7B*-full.

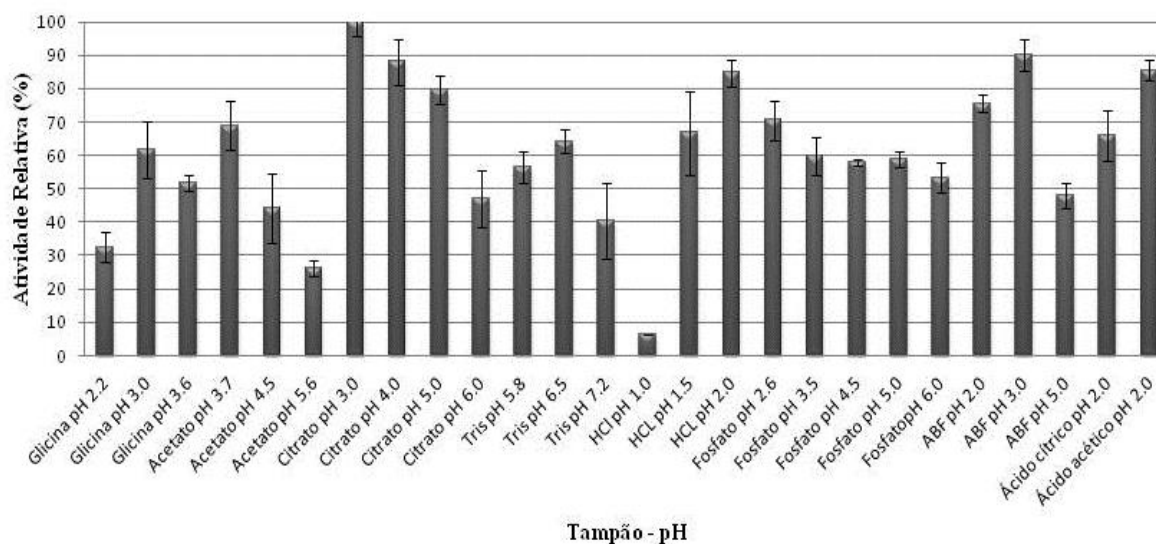
**Fonte:** Elaborada pela autora.

Analisando a Figura 18, é possível observar que mesmo quando o pH diminui para valores extremos de 2 e 1,5, a enzima mantém, respectivamente, 90 e 80% da sua atividade

máxima, mostrando que a endoglucanase I de *Trichoderma harzianum* possui uma forte preferência por pHs extremamente baixos.

#### 5.2.4 Investigação do pH com tampões ácidos

Para investigar a influência da composição do tampão sobre a atividade enzimática e também se o comportamento ácido da enzima se mantinha frente outros sais, a *ThCel7B-CCD* teve sua atividade avaliada na presença de diferentes tampões ácidos. A Figura 19 demonstra o comportamento da enzima frente a essas condições.



**Figura 19** - O gráfico mostra a influência de diferentes tampões ácidos na atividade de *ThCel7B-CCD* contra CMC como substrato.

**Fonte:** Elaborada pela autora.

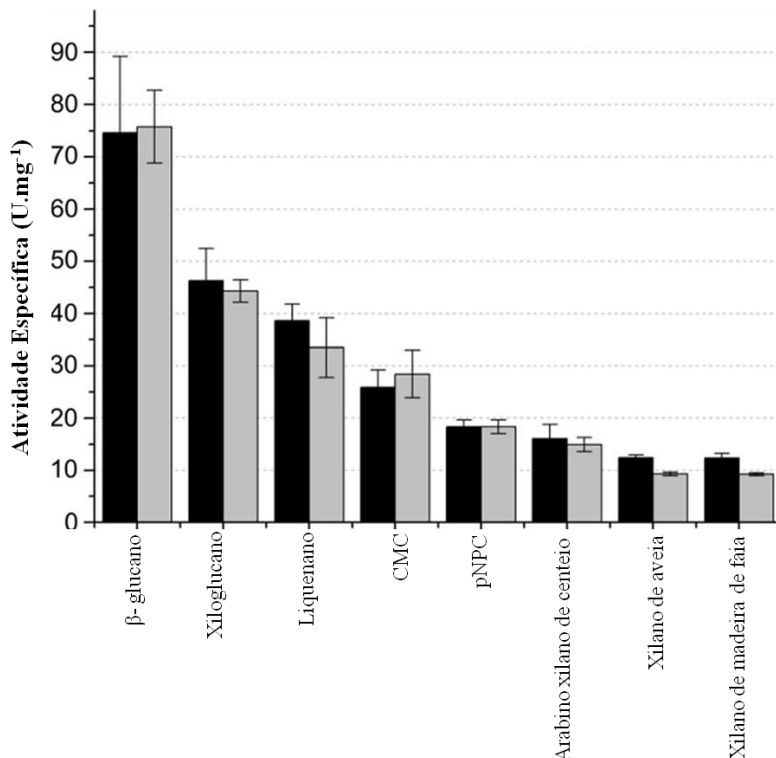
A enzima mostrou uma ligeira preferência por tampão citrato, quando em comparação com outros tampões no mesmo pH, e a atividade ao redor do pH 3 foi a melhor observada em todos os tampões testados. Tal comportamento fortemente ácido é incomum para as endoglucanases, que normalmente apresentam atividade ótima em condições ácidas moderadas, perto do pH 5.<sup>179-180</sup>

Na literatura embora raro, há relatos de outras endoglucanases altamente ácidas, como é o caso de uma GH5 do fungo filamentoso *Gloeophyllum trabeum* (*GtCel5B*), que possui um pH ótimo de 3,5.<sup>181</sup> No entanto, quando o pH é reduzido para 2,0, a atividade de *GtCel5B* diminui mais do que 80%<sup>181</sup> enquanto a *ThCel7B* aqui descrita retém mais do que 70% da sua atividade

em pH 1,5 (Figura 19). Outra endoglucanase também de *Gloeophyllum trabeum* com caráter acidofílico é uma *GtCel12A* com pH ótimo de 4,5. Esta enzima, foi capaz de reter cerca de 40% da sua atividade a pH 1,0.<sup>182</sup> As razões pelas quais *Cel7B* de *T. harzianum* possui um pH ótimo tão baixo não estão quimicamente e estruturalmente evidenciadas.

### 5.2.5 Clivagem de substratos

A especificidade de substrato foi determinada através da medida de açúcares redutores liberados a partir de vários substratos de polissacarídeos. Tanto o domínio catalítico quanto a enzima inteira, exibiu atividade mais elevada em  $\beta$ -glucano, com atividade específica de aproximadamente 75 U.mg<sup>-1</sup>. Em seguida, observamos a preferência da enzima por xiloglucano (60% de atividade relativa à máxima observada em  $\beta$ -glucano); liquenano (53%), CMC (33%), e as menores atividades foram observadas em pNPC (22%), arabino xilano (20%) e xilano (16%), conforme mostrado na Figura 20.

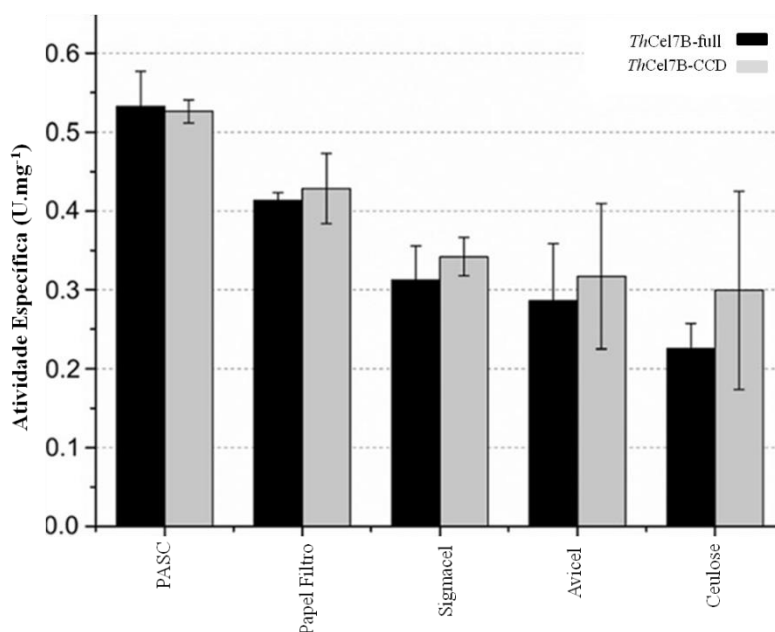


**Figura 20** - A especificidade de substratos mostrada através do gráfico da atividade específica de *ThCel7B*-full e *ThCel7B*-CCD contra o conjunto de polissacarídeos com tempo de incubação de 15 minutos.

**Fonte:** Elaborada pela autora.

Para fins de comparação em relação à atividade específica, Hasper, *et.al* descreve três endoglucanases de *Aspergillus niger*, as quais ele chamou de EglA, EglB e EglC. Para as três enzimas, a especificidade de substrato foi determinada contra  $\beta$ -glucano e xiloglucano, sendo que a EglC foi a única que apresentou uma atividade para xiloglucano ( $19 \text{ U.mg}^{-1}$ ) e não teve atividade para  $\beta$ -glucano, ao passo que a EglA e EglB apresentaram uma atividade específica de  $59 \text{ U.mg}^{-1}$  e  $22 \text{ U.mg}^{-1}$ , respectivamente, contra o  $\beta$ -glucano.<sup>183</sup>

Contra substratos cristalinos, a *ThCel7B*-full e *ThCel7B*-CCD tiveram suas atividades determinadas após 4 h de incubação, e também mostraram, embora em proporção bem menor, atividade contra o papel de filtro, PASC, Sigmacel 20, Avicel, celulose (Figura 21).



**Figura 21** - Especificidade de substratos mostrada através do gráfico da atividade específica de *ThCel7B*-full e *ThCel7B*-CCD contra celulose cristalina com tempo de incubação de 4 horas.

**Fonte:** Elaborada pela autora.

As endoglucanases no geral, apresentam baixa atividade em celulose cristalina, uma vez que a habilidade para hidrolisar esses substratos depende da ação de enzimas processivas como as celobiohidrolases.

Há pouco estudo sobre as hidrolases de glicosídeos da família 7 que reportaram a especificidade por substratos investigada em uma gama de substratos tão vasta, uma vez que as investigações geralmente são limitadas aos substratos mais comuns, como CMC e PASC. Vlasenko, *et.al* publicaram em 2010 um trabalho sobre a clivagem de substratos para mais de 30 endoglucanases investigadas das famílias GHs 5, 6, 7, 9, 12, e 45 e relatam que, aparentemente,

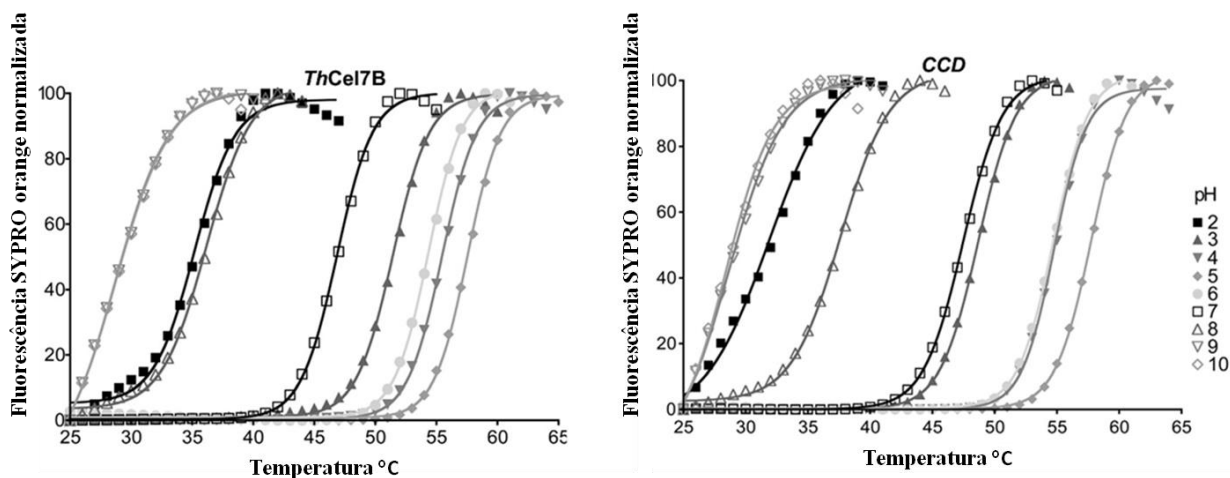
há uma dependência entre a família e a especificidade, ou seja correlacionam estrutura e função.<sup>184</sup> Especificamente em relação aos resultados para a GH 7, os mesmos corroboram com os nossos aqui obtidos, principalmente o fato de terem encontrado nessa família, a atividade em substratos pequenos, como pNPC. Para substratos hemicelulósicos, foi observada a atividade em xiloglucano, xilano, e arabinoxilano, do mesmo modo para *ThCel7B* aqui apresentado.

A vasta gama de substratos que *ThCel7B* podem hidrolisar é uma característica tecnológica muito importante. Analisando os resultados aqui obtidos, podemos afirmar que há uma preferência da enzima para os substratos com ligações beta-1,4 e também beta-1,3. Além disso, a *ThCel7B* retém a atividade dentro de uma grande variedade de derivados de celulose e hemicelulose amorfos e solúveis, revelando um amplo leque das atividades hidrolíticas da endoglucanase de *Trichoderma harzianum*, contra os principais componentes da parede celular vegetal. Esse amplo espectro de atividades contra diferentes polissacarídeos é altamente atraente para a hidrólise enzimática, uma vez que esta se dá em substratos heterogêneos e complexos.

### 5.2.6 Estabilidade térmica avaliada por Thermofluor

Os experimentos de fluorimetria diferencial de varredura foram realizados a fim de monitorar a estabilidade térmica da proteína, nos permitindo a identificação dos melhores pHs para a manutenção da estabilidade da estrutura terciária de *ThCel7B*, em função da temperatura.

Corroborando com os resultados anteriores, foi possível verificar a baixa estabilidade da proteína em meios básicos, com alto valor de pHs. As curvas para todos os pHs são mostradas na Figura 22, onde podemos observar os picos do sinal de fluorescência em diferentes temperaturas para cada pH testado. Em pHs mais elevados, mesmo a baixas temperaturas, detectamos um alto sinal de fluorescência, sugerindo que grande parte das moléculas da enzima já estava desenovelada. Este fato pode ser confirmado pelo baixo valor de  $T_m$  observado na figura para o pH 10 (~29°C) em relação aos demais pHs.

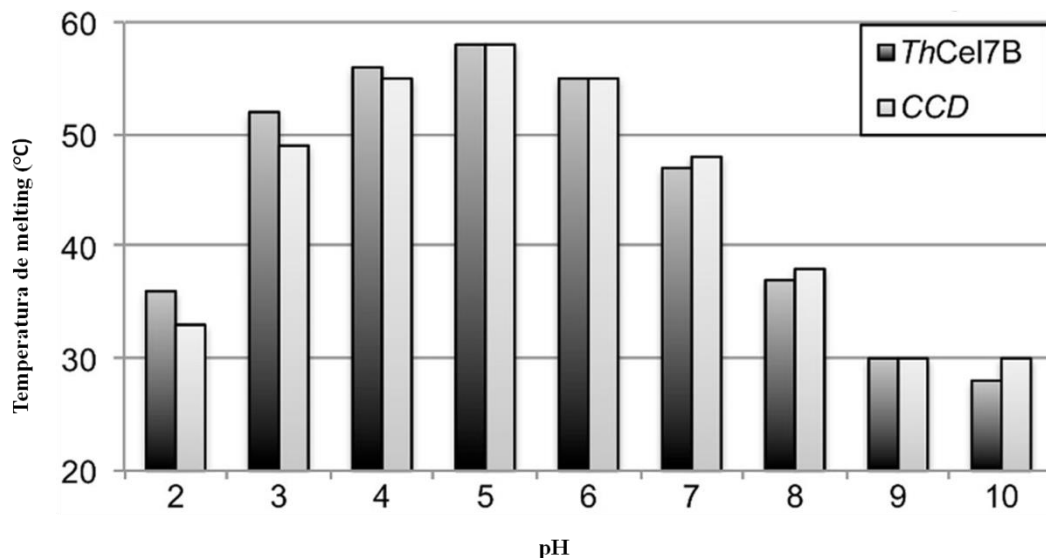


**Figura 22** - Curvas de Thermofluor para a *ThCel7B*-full e *ThCel7B* -CCD, obtidas por meio da análise da intensidade de fluorescência em função da temperatura.

**Fonte:** Elaborada pela autora.

Ainda analisando o gráfico da figura 22, podemos observar que, embora a *ThCel7B*-full e *ThCel7B*-CCD tivessem mostrado atividade ótima a pH 3, o ensaio de *Thermofluor* revelou que a termoestabilidade das enzimas foi mais elevada a pH 5. Isto sugere que a enzima requer uma certa flexibilidade conformacional para atingir a sua atividade ótima mas que esta flexibilidade não é assegurada pela conformação estrutural mais estável da proteína.

A variação da temperatura de *melting* ( $T_m$ ) para todos os pH testados (Figura 23) confirma o comportamento acidófilo da enzima.



**Figura 23** - Variação da temperatura de *melting* ( $T_m$ ) para todos os pH testados, sendo que o valor mais elevado de  $T_m$  foi observado para pH 5.

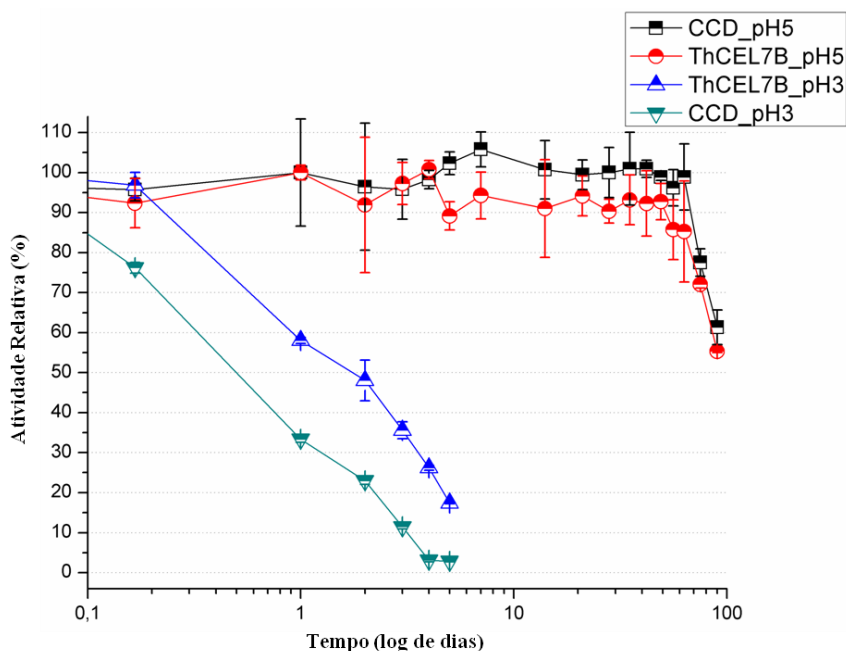
**Fonte:** Elaborada pela autora.

No pH ótimo (pH 3), a  $T_m$  é de aproximadamente, 50 °C, enquanto que no pH mais estável (pH 5), a  $T_m$  está ao redor de 55°C, demonstrando um aumento significativo da estabilidade térmica da enzima em pH 5. A partir do pH 7 observa-se a diminuição progressiva dos valores de  $T_m$  e a estabilidade da proteína diminui drasticamente.

### 5.2.7 Atividade residual

As atividades residuais de *ThCel7B*-full e *ThCel7B*-CCD foram determinadas para os pHs onde houve maior atividade (pH 3) e aquele que garantiu a maior estabilidade térmica nos experimentos de *ThermoFluor* (pH 5). Para isso, as enzimas foram incubadas em tampão citrato de sódio nesses dois pHs citados, e a atividade contra o CMC foi acompanhada ao longo do tempo.

Este ensaio revelou que a endoglucanase I de *Trichoderma harzianum* é uma enzima com alta estabilidade, uma vez que no pH 3, a *ThCel7B*-full manteve 80% da sua atividade inicial até, aproximadamente, 10 horas de incubação a 55 °C, enquanto que a *ThCel7B*-CCD manteve os mesmos 80% da sua atividade máxima durante cerca de 6 horas. Mesmo após 48 h de incubação, o CCD ainda mantinha cerca de 20% de sua atividade original, enquanto que a proteína inteira atingiu 20% do nível de atividade somente após 5 dias de incubação contínua. Quando a mesma atividade residual foi determinada incubando as enzimas em tampão citrato pH 5,0 o resultado foi surpreendente, uma vez que após 2 meses de incubação, a enzima ainda apresentava, praticamente, a mesma atividade inicial (Figura 24).



**Figura 24** - Atividade residual de *ThCel7B* com valores apresentados em termos de atividade relativa. A atividade residual foi medida a 55°C em pH 3 e 5 ao longo de 100 dias.

**Fonte:** Elaborada pela autora.

Este resultado corrobora os dados de *ThermoFluor*, que revelaram claramente que a maior termoestabilidade da enzima ocorre a pH 5,0.

Quando comparamos os resultados aqui obtidos, com outras endoglucanases relatadas na literatura, não encontramos nenhuma enzima com estabilidade tão significativa. *ThCel7B* é muito mais estável que uma *Cel5A* de *G. trabeum*, por exemplo, que perde totalmente sua atividade em condições ácidas com menos de 2 horas de incubação.<sup>181</sup>

### 5.2.8 Cinética enzimática

Utilizando o xiloglucano como substrato, obtivemos os seguintes parâmetros cinéticos para a *ThCel7B*-full:  $K_M$   $1,98 \pm 0,47 \text{ g.L}^{-1}$ ;  $V_{max}$   $0,22 \pm 0,095 \text{ } \mu\text{M.s}^{-1}$  e  $K_{cat}$   $0,45 \text{ s}^{-1}$ . Para *ThCel7B*-CCD, o  $K_M$  foi de  $2,9 \pm 0,6 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $V_{max}$   $0,012 \pm 0,009 \text{ } \mu\text{M.s}^{-1}$  e  $K_{cat}$   $0,0545 \text{ s}^{-1}$ . Dividindo  $K_{cat}/K_M$ , temos a eficiência catalítica 4 vezes maior para enzima inteira do que para o domínio catalítico, indicando que a deleção do CBM afeta de maneira direta esse parâmetro, conduzindo a uma perda significativa da eficiência.



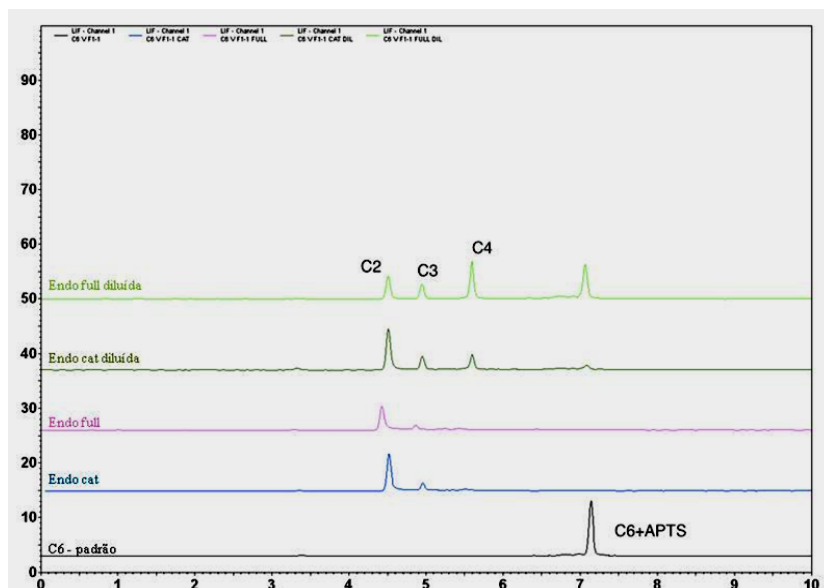
Já quando o substrato utilizado foi o CMC, temos um  $K_M$   $4,71 \pm 0,27 \text{ g.L}^{-1}$  e  $3,14 \pm 0,95 \text{ g.L}^{-1}$  para a enzima inteira e para o domínio catalítico, respectivamente, ou seja, temos uma diminuição pela aparente afinidade pelo substrato. Isso era esperado, uma vez que, a atividade contra o xiloglucano é, proporcionalmente, maior do que quando comparamos com o CMC.

Na literatura não há dados cinéticos publicados da atividade de uma endoglucanase utilizando o xiloglucano como substrato, o que torna os resultados aqui apresentados, inéditos. Também é sabido que, realizar comparações de dados de cinética enzimática é, geralmente difícil devido ao fato de que as propriedades cinéticas são, comumente, reportadas em função de  $K_m$  e  $V_{max}$ , os quais apresentam uma grande variação na ordem de grandeza devido as diferentes metodologias utilizadas para quantificação, forma de representação dos valores obtidos, diferenças quanto ao substratos e condições experimentais, além é claro, da origem do extrato enzimático.<sup>185</sup>

### **5.2.9 Eletroforese Capilar de Zona (CZE)**

O perfil de hidrólise da enzima foi traçado a partir de experimentos de eletroforese capilar de zona, utilizando a celohexaose marcada com APTS como substrato.

Foi observado, conforme a Figura 25, um perfil hidrolítico semelhante para a *ThCel7B*-full e *ThCel7B*-CCD, o qual é caracterizado pela a liberação de celobiose (C2), seguido de celotriose (C3) e celotetraose (C4).



**Figura 25** - Eletroforese capilar de oligossacarídeo marcado com APTS. Produtos liberados por *ThCel7B*-full e *ThCel7B*- CCD após a hidrólise do substrato C6.

**Fonte:** Elaborada pela autora.

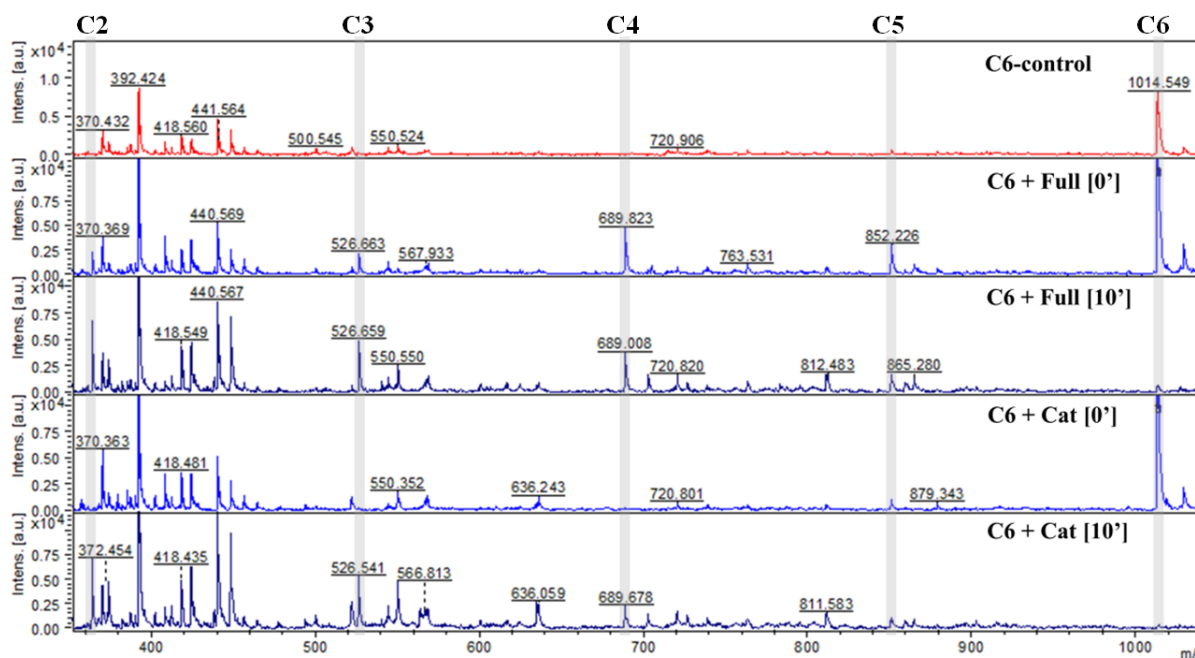
Com substratos simples, ou seja, aqueles que são pequenos fragmentos de fibra de celulose (baixos graus de polimerização) como C6, foi possível apontar que a enzima não é capaz de liberar monômeros de glicose, uma vez que houve ausência de celopentaose (C5) e glicose (G1). Estes resultados mostram um perfil típico de endoglucanase, com um padrão de clivagem de oligossacarídeos aleatório.

Embora ao observar a figura, visualizamos para a enzima inteira, maior pico de C4 e também a presença de C6 residual após a hidrólise, isso não necessariamente indica diferença de eficiência se comparada ao domínio catalítico. A eletroforese capilar é utilizada para reunir informações qualitativas sobre o perfil de clivagem da enzima, ou seja, estes resultados não devem ser considerados uma análise quantitativa de produtos de hidrólise, não sendo possível afirmar se há mais liberação de C2, C3 ou C5.

### 5.2.10 Produto de hidrólise analisado por espectroscopia de massas

A fim de complementar os resultados obtidos pela eletroforese capilar, foi realizado o experimento de MALDI-TOF MS. Os ensaios de espectroscopia de massas do produto de hidrólise revelaram os oligossacarídeos liberados durante a atividade da endoglucanase, que corroboram com os dados de capilar. Através desses resultados foi possível observar a total

clivagem da celohexaose após os 10 minutos de reação e a formação de, principalmente, celobiose (C2), celotriose (C3) e celotetraose (C4) como produtos (Figura 26).



**Figura 26** - Espectro de massas do produto da hidrólise de *ThCel7B*-full e *ThCel7B*-CCD utilizando celohexaose como substrato.

**Fonte:** Elaborada pela autora.

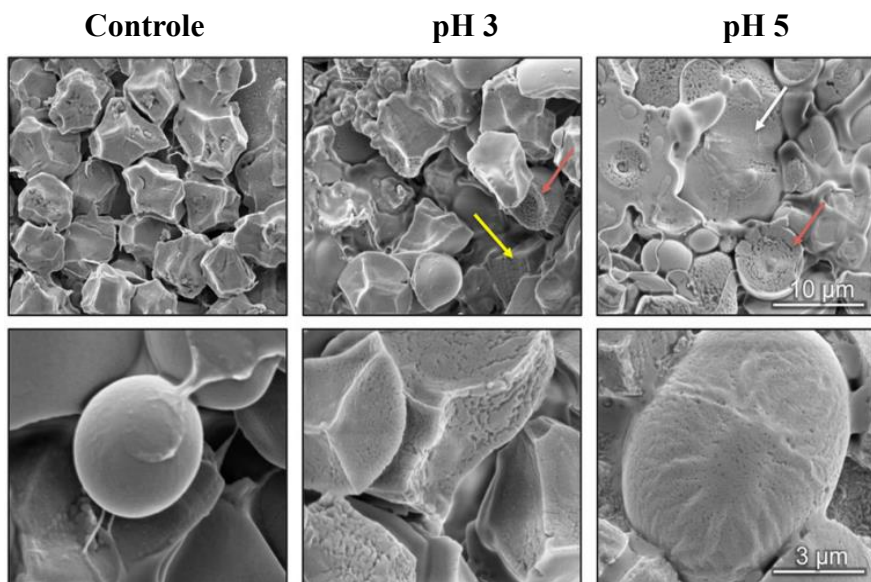
Do mesmo modo que a eletroforese capilar, o experimento de espectrometria de massas é um ensaio qualitativo e não quantitativo, sendo assim impossível estimarmos as quantidades reais de cada produto. Muitas vezes o fato de não aparecer algum pico que correspondam à determinados produtos, na realidade pode ser que os níveis estivessem abaixo do limite de detecção.

Os produtos da clivagem do C6 foram, principalmente, C4, C3 e C2. Para a construção da proteína inteira, foi detectado ainda, um pico de C5.

### 5.2.11 Microscopia eletrônica de varredura com fonte de elétrons por emissão de campo (FESEM)

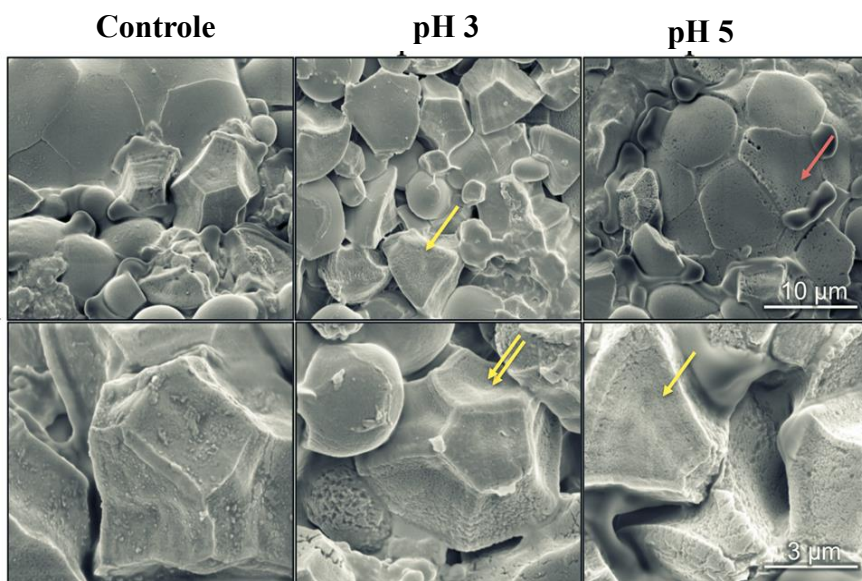
Dada a elevada atividade enzimática da endoglucanase I de *Trichoderma harzianum* contra  $\beta$ -glucanos, flocos de aveia (rico nesse polissacarídeo) foram submetidos à hidrólise enzimática e posteriormente, analisado por microscopia.

São apresentadas as imagens de microscopia eletrônica de flocos de aveia antes e depois da hidrólise por *ThCel7B*-full (Figura 27) e *ThCel7B*-CCD (Figura 28) nos pH 3 e no pH 5.



**Figura 27** - Digitalização de imagens de microscopia eletrônica que exibem o efeito hidrolítico de *ThCel7B*-full em flocos de aveia. Imagens do controle da reação e dos efeitos da ação da enzima depois de 12 h a pH 3 e 5 analisada em diferentes ampliações: 10 µm, e 3 µm. As setas brancas indicam regiões planas no controle; as setas amarelas indicam a formação de partículas esféricas após a hidrólise e as setas vermelhas exemplificam os grãos degradados.

**Fonte:** Elaborada pela autora.



**Figura 28** - Digitalização de imagens de microscopia eletrônica que exibem o efeito hidrolítico de *ThCel7B*-CCD em floco de aveia. Imagens do controle da reação e dos efeitos da ação da enzima depois de 12 h a pH 3 e 5 analisada em diferentes ampliações: 10 µm, e 3 µm. As setas indicam a formação de crateras (amarelas) e furos (vermelhas) como resultado da degradação enzimática.

**Fonte:** Elaborada pela autora.

Podemos observar nas Figuras 27 e 28, que a superfície da aveia antes da hidrólise enzimática (controle) é formada por grânulos de formas esféricas ou poliédricas, mais lisas e definidas. As imagens da aveia submetida a hidrólise enzimática, revelou a predominância dos inúmeros buracos na superfície dos grãos, superfícies mais irregulares, caracterizada por partículas que parecem ser resultantes do consumo das partículas maiores. A formação de cavidades sobre a superfície do substrato é uma evidência da ação da endoglucanase. No quadro da imagem com maior ampliação (3  $\mu\text{m}$ ), pode-se observar os efeitos de degradação do substrato, revelando que a superfície plana no controle, torna-se áspera e irregular nas amostras hidrolisadas.

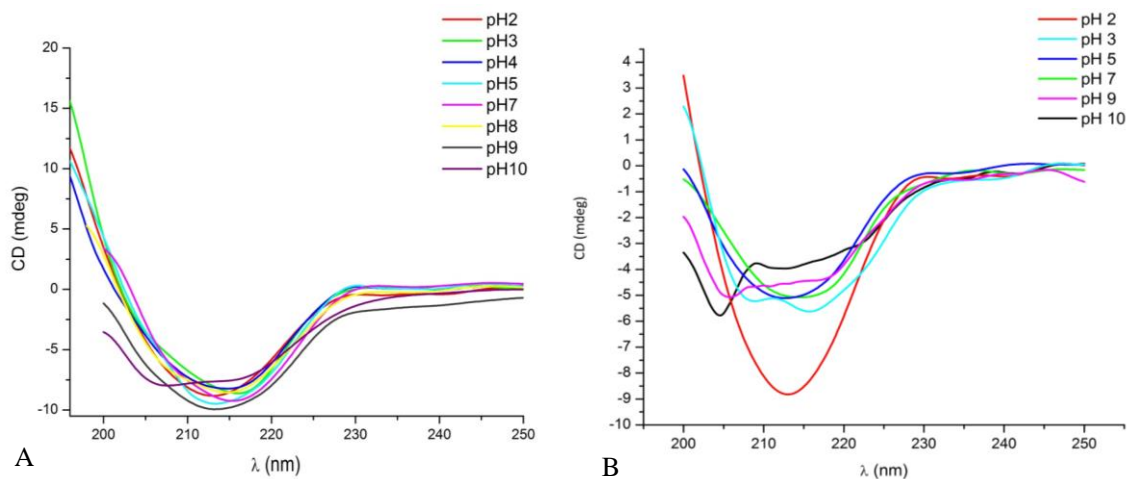
Comparativamente, o efeito do pH não pôde ser quantificado pelas análises de microscopia eletrônica e, embora a enzima tenha apresentado maior eficiência em valores de pH mais baixos o conjunto de imagens obtidas à pHs 3 e 5, foram semelhantes. Do mesmo modo, não houve diferença significativa entre o domínio catalítico e a enzima inteira relacionada com o efeito sobre o substrato de aveia. Provavelmente isso é devido ao tempo de hidrólise, no qual as enzimas já se encontravam em *plateau* na curva de atividade.

Em geral, há poucos estudos na literatura voltados para a visualização da atividade da celulase por diferentes técnicas de microscopia disponíveis.<sup>178,186</sup> Além disso, a maior parte dos trabalhos publicados retratam a atuação de celobiohidrolase I (CBHI) em substratos celulósicos. Deste modo, os resultados aqui apresentados representam um passo importante para a visualização de alterações que acontecem nos substratos durante a hidrólise enzimática.

### 5.2.12 Dicroísmo circular

Os espectros de dicroísmo circular, para os diferentes valores de pHs, permitiram a caracterização da estrutura secundária da proteína e como esta é influenciada pelas mudanças de pH. Quando observamos a proteína em pHs básicos (a partir do pH 7), o espectro é progressivamente alterado com uma perda do formato característico, ocorrendo um decréscimo na elipticidade molar, indicando uma diminuição do conteúdo de estrutura secundária regular, que é indicativo de desestruturação da molécula. Para a proteína inteira, observamos essa mudança nos espectros já a partir do pH 5 (Figura 29). Este comportamento, indica o forte do pH

sobre a estrutura secundária da enzima e sua preferência acidófila já vista anteriormente nos outros experimentos.



**Figura 29** - Espectro de dicroísmo circular obtido em diferentes pH a 25°C e varredura do comprimento de onda de 200 a 260 nm. A) *ThCel7B-CCD* e B) *ThCel7B-full*.

**Fonte:** Elaborada pela autora.

A análise do espectro nos permite observar um valor mínimo de elipticidade na região de 212 nm, correspondente ao pico característico de proteínas com folhas  $\beta$ , que é compatível à estrutura secundária de outras celulasas<sup>187; 188</sup>. Um sinal negativo na região de 222 nm, que é típico de hélices  $\alpha$  não foi detectado, sugerindo portanto um baixo teor de estruturas secundárias desse tipo.

Em relação à desnaturação térmica, os resultados da análise em pH 3, sugerem que a partir de 65 °C, ocorre uma perturbação na estrutura secundária da proteína, culminando com a diminuição brusca da elipticidade, que tende a zero. Todos esses resultados corroboram com os experimentos de *Thermofluor* e de atividade hidrolítica.

### 5.2.13 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

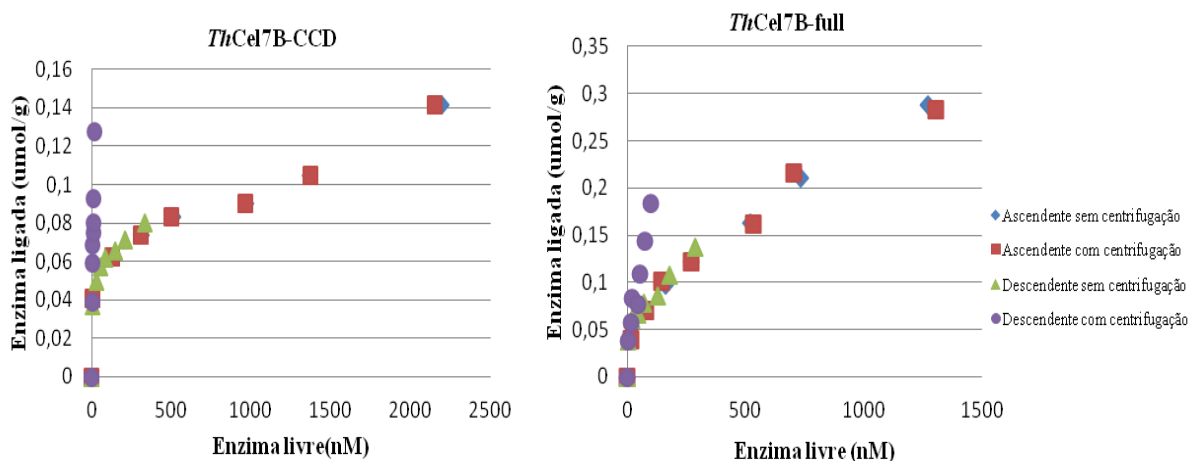
Para investigar a presença de possíveis agregados que pudessem estar dificultando o processo de cristalização, foi realizado com a *ThCel7B-CCD*, um ensaio de espalhamento dinâmico de luz (DLS) em diferentes pHs, na tentativa de distinguir diferentes estados de oligomerização e/ou agregação da proteína.

Quando a proteína foi analisado por DLS os perfis observados foram característicos de amostras de proteínas monodispersas em solução do pH 1 até o pH 7, sendo que os melhores *scores* foram observados para os pHs mais ácidos (1 a 5). A partir do pH 5 observamos que o perfil se altera e ocorre uma elevação do raio hidrodinâmico, o que corresponde a agregados de elevada massa molecular. Tal resultado corrobora com todos os outros resultados já obtidos, ou seja, a estabilidade da proteína está vinculada a pHs ácidos.

Exemplificando, quando foi realizado a medida no tampão HCl/KCl de pH 1, a massa molecular foi estipulada em  $47 \pm 9$  kDa e 100% das moléculas encontravam-se monodispersas. Quando o pH foi elevado para 6, em tampão citrato/ácido cítrico, a massa molecular manteve  $47 \pm 6$  kDa mas houve o decaimento para 72.4% da monodispersão. Em pH elevado como o 10, ocorre um aumento na estimativa da massa molecular para  $58 \pm 2$  kDa e 100% das moléculas se encontram polidispersa.

### 5.3 Ligação enzimática improdutiva

Para estudarmos a ligação enzimática improdutiva, realizamos após a hidrólise, um ensaio de diluição com e sem centrifugação, a fim de analisarmos de que modo a centrifugação interfere nesse processo. Na Figura 30, temos os resultados comparativos entre os processos com e sem centrifugação sobrepostos para as duas construções de *ThCel7B*.



**Figura 30** - Gráfico da influência da centrifugação no estudo de reversibilidade de adsorção para *ThCel7B*-full e *ThCel7B*-CCD, utilizando avicel como substrato.

**Fonte:** Elaborada pela autora.

O gráfico traçado da figura 30 mostra em  $\mu\text{mol/g}$  uma função da concentração de enzima livre antes e após a diluição, mostrando a reversibilidade ou não da enzima ao substrato. É possível verificar que, para os experimentos de diluição sem centrifugação, ascendentes e descendentes são essencialmente sobrepostas e que a adsorção das celulases investigadas é totalmente reversível. Porém, o gráfico muda drasticamente se o complexo celulose/celulase é sedimentado por centrifugação antes da diluição. Neste caso, a isotérmica descendente é muito mais acentuada do que a isoterma ascendente, caracterizando uma irreversibilidade pronunciada. A reprodutibilidade conseguida nesses experimentos é bastante consistente, no sentido de que as isotérmicas ascendentes no experimento com e sem centrifugação foram sempre essencialmente idênticas.

Outra informação que podemos tirar do gráfico é que, comparativamente temos maior concentração de enzima livre no experimento com a *ThCel7B-CCD* do que com *ThCel7B-full*, fato este que pode indicar que a adsorção está relacionada com a presença do CBM.

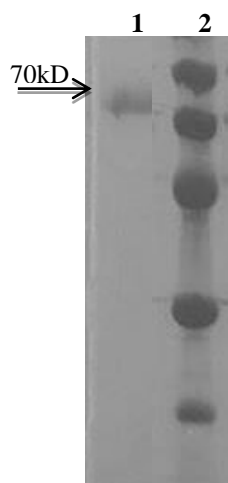
Para poder afirmar categoricamente o que ocorre quando as amostras são submetidas à centrifugação, é necessário uma investigação mais aprofundada. No entanto, podemos especular que a compactação do sedimento pode mudar o substrato de forma a impedir ou retardar a liberação subsequente da enzima, analogamente como o que ocorre no processo de hornificação (baixa do conteúdo de água nas suspensões de celulose por secagem ou prensagem úmida) levando a uma redução ampla e irreversível do volume de poros e, conseqüente, redução na digestibilidade enzimática.<sup>189</sup>

Notoriamente, muitos trabalhos usam a ressuspensão após o procedimento de centrifugação em seus protocolos experimentais, e nossos resultados sugerem que o processamento mecânico através da centrifugação e, possivelmente, outros tipos de compactação, podem comprometer a reciclagem de celulases.

#### **5.4 Sinergismo**

Após, expressão e purificação da celobiohidrolase I de *Trichoderma harzianum* (*ThCel7A*) em *Aspergillus niger* (Figura 31), a proteína foi caracterizada em função de pH e temperatura ótima para seguir com os ensaios de sinergismo.

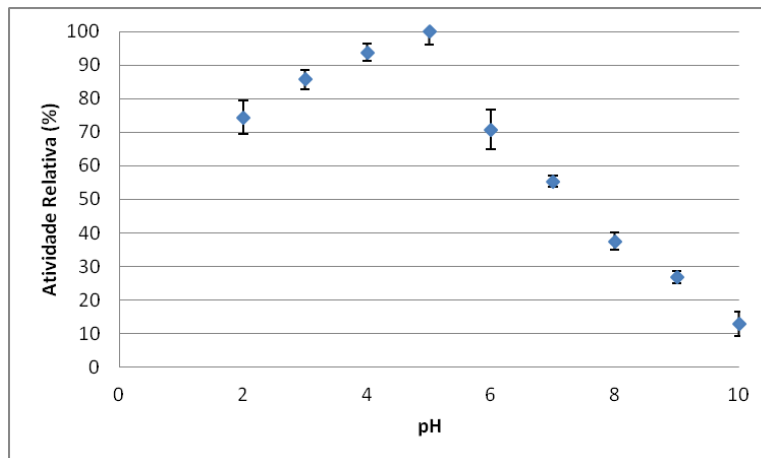




**Figura 31** - Gel SDS-PAGE 15% mostrando produção de celobiohidrolase I de *Trichoderma harzianum*. 1-*ThCel7A* após processo de purificação 2- Marcador de peso molecular. Destaque para a banda de 70kDa.

**Fonte:** Elaborada pela autora.

A atividade exoglucanásica da CBHI foi estudada em função do pH a 50 °C (temperatura ótima determinada experimentalmente) e com substrato solúvel pNPC (Figura 32).



**Figura 32** - Efeito do pH na atividade enzimática de *ThCel7A* utilizando pNPC como substrato e 50°C

**Fonte:** Elaborada pela autora

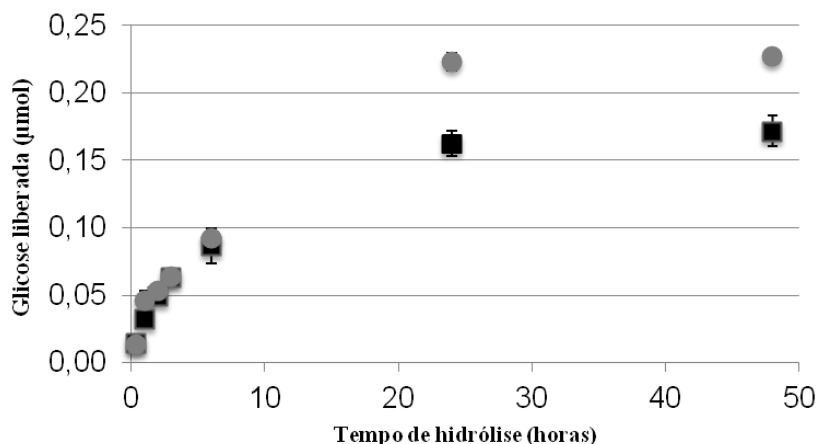
A figura mostra que a atividade exoglucanase aumenta acompanhando o aumento de pH dentro da faixa de pH de 2 a 5, com valor máximo em pH 5 e em seguida diminui a partir do pH 6. Com a confirmação da expressão e obtenção do pH e temperatura ótima para *ThCel7A*, demos continuidade aos estudos de sinergismo.

### 5.4.1 Determinação das condições para ensaios enzimáticos

O modelo mais amplamente aceito de sinergismo, endo-exo assume que existem duas classes distintas de celulasas e a razão molar da mistura pode influenciar a taxa de hidrólise<sup>99</sup>. Para determinar a concentração de cada enzima a ser usada nas experiências de sinergismo, a atividade das celulasas foram definidas em termos de FPU/g.

A fim de usar uma quantidade mínima de proteína necessária para uma liberação eficiente de glicose nas reações, a carga de enzima foi fixada em 0,15 FPU / g de substrato, o que corresponde 260 nM de *ThCel7A* e 120 nM de *ThCel7B*.

A variação das taxas de hidrólise em função do tempo também foi avaliada através da análise da glicose liberada após sete diferentes tempos de reação: 0,4, 1,0, 2,0, 3,0, 6,0, 24,0 e 48,0 horas. Para ambas enzimas, a hidrólise do papel de filtro seguiu uma curva de perfil típico com uma rápida taxa hidrolítica inicial, seguida de uma diminuição gradual até atingir um patamar (Figura 33), comportamento típico para celulasas, com a reação seguindo graus intermediários de conversão e então, a velocidade da reação diminui acentuadamente.<sup>190</sup>



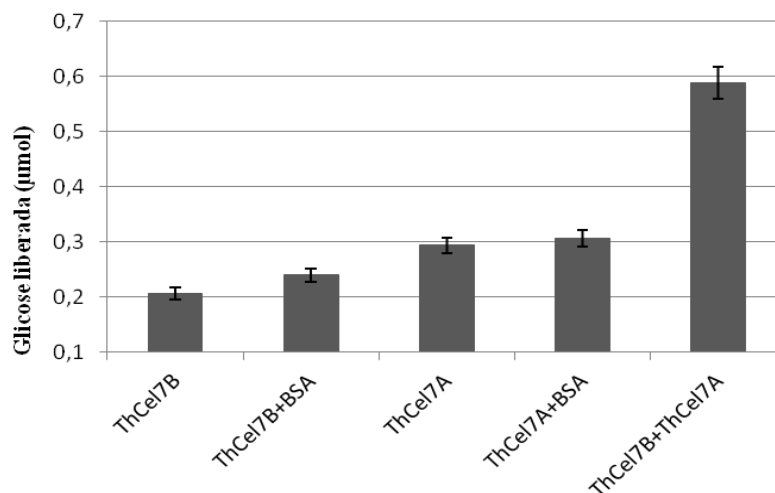
**Figura 33** - Gráfico mostrando a quantidade de glicose liberada após a hidrólise enzimática do papel filtro em até 48 horas de reação. *ThCel7B* (quadrado preto) e *ThCel7A* (círculo cinza).

**Fonte:** Elaborada pela autora.

É possível observar, analisando o gráfico acima, que a hidrólise da celulose se estabiliza após 24 horas para ambas as enzimas. Nessas condições, tanto a *ThCel7A* quanto a *ThCel7B* já ocuparam os locais de clivagem disponíveis para a atividades enzimáticas dos monocomponentes. Nosso experimento não contou com a presença de  $\beta$ -glicosidades, então

principalmente em relação à CBHI, pode ser que a hidrólise não tenha sido continuada devido à inibição pela celobiose.

Para garantir que o resultado que estávamos observando era devido ao sinergismo entre as enzimas, a BSA foi utilizada como controle para verificar o efeito de interações não específicas causadas pela adição de uma proteína não hidrolítica (Figura 34). A concentração de BSA utilizada foi equivalente à concentração de enzima aplicada nas experiências de sinergismo.



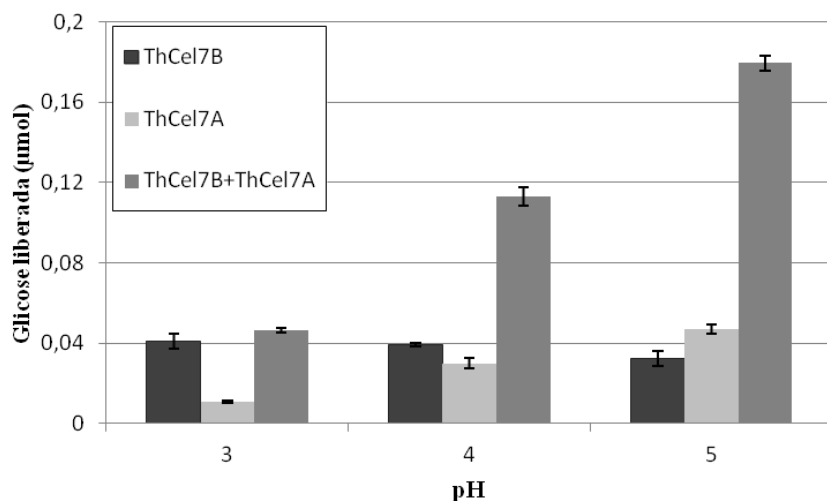
**Figura 34** - Gráfico da liberação de glicose após 24 horas de hidrólise do papel filtro por *ThCel7B* e *ThCel7A* agindo individualmente e em sinergia. Controle realizado na presença de BSA.

**Fonte:** Elaborada pela autora.

A coluna da direita do gráfico da Figura 34, confirma que as celulasas Cel7A e Cel7B de *T. harzianum* possuem um efeito sinérgico entre si, uma vez que a liberação de glicose no sinergismo foi 18% mais elevada do que a soma das atividades separadas. As celulasas testadas individualmente, com adição de BSA não mostrou efeito significativo no total de glicose liberada, o que significa que não houve interação sinérgica entre eles.

#### 5.4.2 Influência do pH no sinergismo

A influência do pH sobre a ação sinérgica de *ThCel7A* e *ThCel7B* foi avaliada variando o pH de 3 a 5. A quantidade de glicose liberada (µmol) pelas enzimas individualmente e em sinergismo são apresentados na Figura 35



**Figura 35** - Gráfico mostrando a influência do pH na glicose liberada a partir da hidrólise do papel filtro por *ThCel7A* e *ThCel7B* individualmente e em sinergismo.

**Fonte:** Elaborada pela autora.

A análise do gráfico mostra que o efeito sinérgico é maior no pH 5, com a quantidade de glicose liberada atingindo 0,18 μmol. Em termos de grau de sinergismo, o DS para o pH 3 não foi calculado devido a atividade da CBH ser praticamente nula, para o pH 4 o DS foi de 1,6 e para o pH 5 temos o maior valor de DS de 2,3. Em pH 5, o efeito sinérgico representa um aumento de cerca de 280% quando em comparação com celobiohidrolase atuando isoladamente, e um efeito ainda mais pronunciado de 450% quando comparado com a atividade da endoglucanase sozinha.

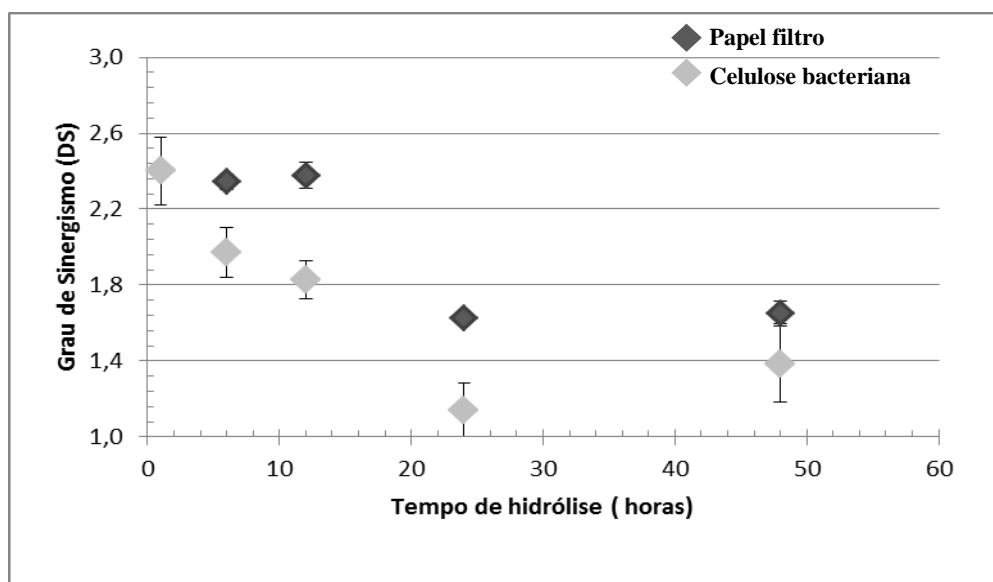
Nossos resultados indicam que o efeito do pH sobre o sinergismo está significativamente influenciado pelo aumento da atividade exoglucanase em função do pH, uma vez que a diminuição da atividade de *ThCel7B* em pH 4 e pH 5, foi completamente suprida pelo aumento da atividade hidrolítica de *ThCel7A*.

#### 5.4.3 Sinergismo entre *ThCel7A* e *ThCel7B* em diferentes substratos

Atualmente, é evidente que a combinação de atividades exo e endo deve resultar no aumento da taxa de hidrólise da celulose. Os nossos ensaios anteriores mostraram que há sinergismo decorrente da ação da endoglucanase *ThCel7B* em conjunto com a celobiohidrolase *ThCel7A*.

Há uma variação considerável nas atividades de celulasas dependendo do tipo de substrato, por isso é importante comparar o efeito de sinergismo em diferentes substratos. Para

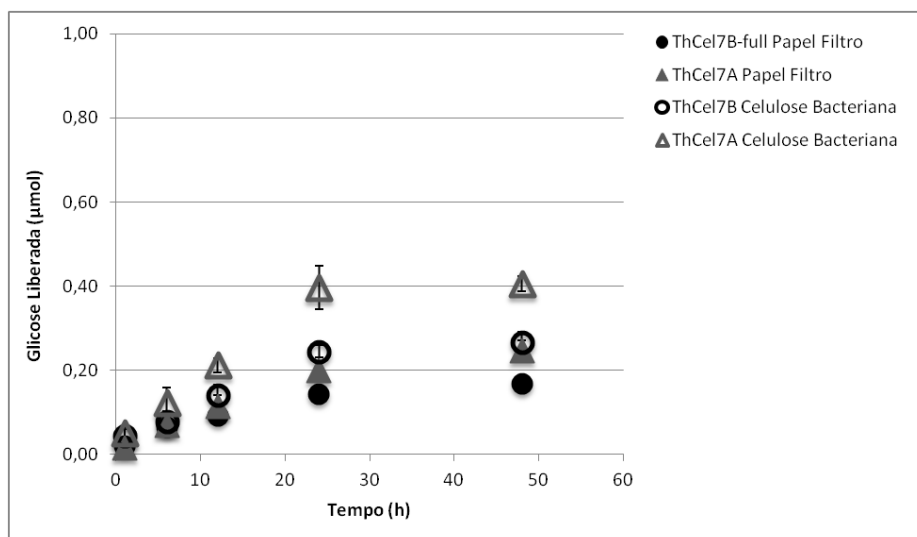
isso, utilizando papel filtro e substratos de celulose bacteriana, realizamos ensaios a fim de comparar o grau de sinergismo (DS) entre *ThCel7A* e *ThCel7B*. Estes dois substratos, possuem propriedades distintas, incluindo o grau de polimerização e a cristalinidade, fatores com impacto direto na eficácia da desconstrução enzimática.<sup>28</sup> Os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 36, onde relacionamos o grau de sinergismo e o tempo de reação.



**Figura 36** - Gráfico do grau de sinergismo (DS) entre *ThCel7B* e *ThCel7A* calculado para papel de filtro e celulose bacteriana em função do tempo . a hidrólise foi realizada em pH 5 e a concentração de açúcar foi quantificada por método de DNS.

**Fonte:** Elaborada pela autora.

Os resultados mostrados no gráfico acima destacam que o DS entre *ThCel7A* e *ThCel7B* muda conforme o substrato e é mais elevado para o papel de filtro em comparação com a celulose bacteriana. Contudo, a Figura 37 mostra que a liberação de glicose é sempre mais elevada para celulose bacteriana em comparação com o papel filtro, quando as enzimas trabalham sozinhas. Isso implica que, para diferentes substratos, o sinergismo é maior onde a eficiência de hidrólise é menor, ou seja, o sinergismo se faz notado em substratos mais complexos e mais difíceis de serem hidrolisados.



**Figura 37** - Gráfico mostrando a glicose liberada medida durante a hidrólise dos monocomponentes. É possível visualizar que a taxa em  $\mu\text{mol}$  é sempre maior em celulose bacteriana comparado com papel filtro.

**Fonte:** Elaborada pela autora.

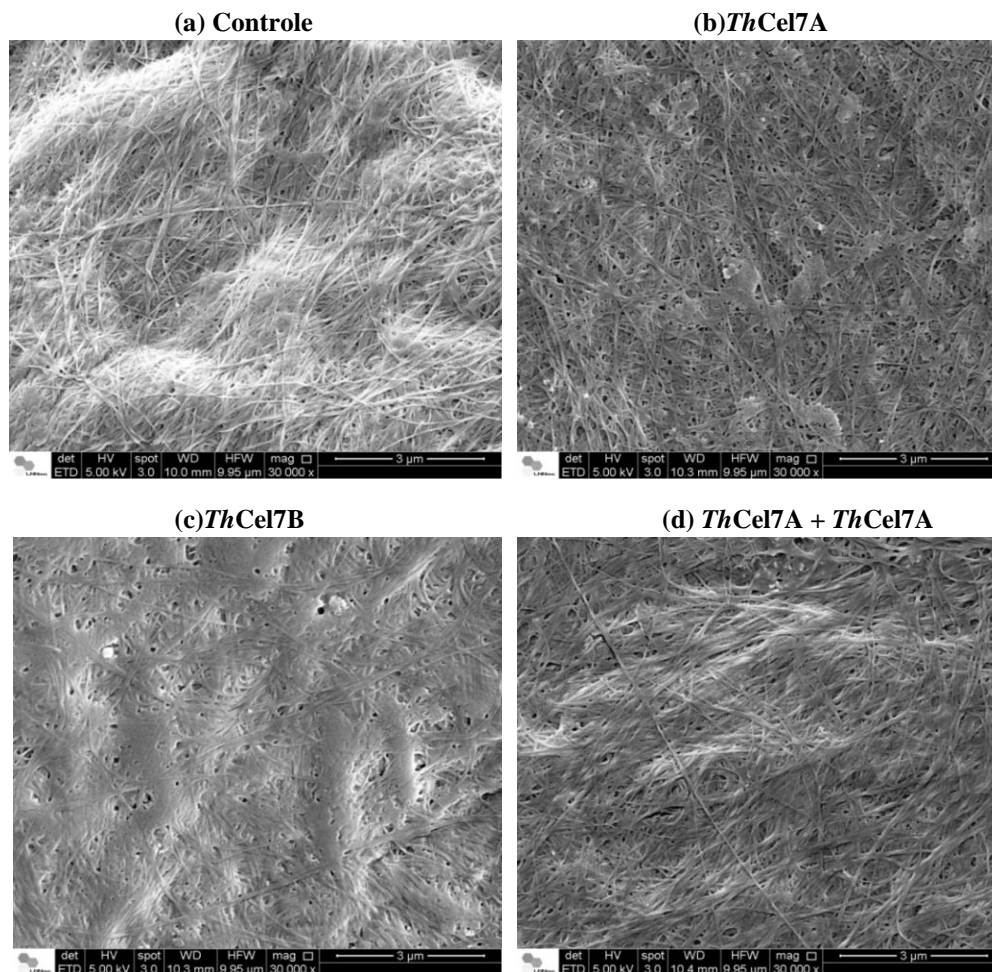
Outra informação relevante que podemos tirar desse experimento é que o grau de sinergismo é mais elevado para tempos de hidrólise mais curtos, e diminui gradualmente com o tempo de reação. Este comportamento se deve, provavelmente à elevada taxa de hidrólise inicial de enzimas separadas, como a da endoglucanase frente aos constituintes amorfos dos substratos celulósicos.<sup>191</sup>

#### 5.4.4 Análise do sinergismo em celulose bacteriana por microscopia eletrônica

Com o objetivo de investigar mudanças morfológicas introduzidas na celulose bacteriana pela hidrólise enzimática de *ThCel7A* em sinergismo com *ThCel7B*, utilizamos a técnica FASEM. A Figura 38 mostra imagens obtidas por microscopia da celulose bacteriana antes e após 48 h de hidrólise a uma temperatura de 50 °C e pH 5.0.

Antes do tratamento enzimático, a morfologia da celulose bacteriana é caracterizada por fibras entrelaçadas e bem definidas. Após a ação da celobiohidrolase, observamos o aparecimento de regiões não fibrilares, tais como visto no quadro b da Figura 38. Além disso, depois de uma observação cuidadosa de um grande número de amostras tratadas com esta enzima por 48 horas, é possível observar que a rede de fibras da celulose bacteriana fica um pouco mais aberta.

O quadro c da Figura 38 mostra a celulose bacteriana submetida à hidrólise por *ThCel7B* e que resultou em uma amorfização e amolecimento da superfície das fibras. Esta alteração morfológica, provavelmente, está relacionada com o ataque da endoglucanase aos "defeitos" encontrados ao longo da superfície da fibra. O último quadro (d), mostra o efeito sinérgico da *ThCel7A* com a *ThCEI7B* na celulose bacteriana, com uma pobre definição do contorno das fibras de celulose, o que indica a presença de material hidrolisado na sua superfície.



**Figura 38** - Imagens de FESEM obtidas da celulose bacteriana. A) Controle antes da hidrólise. B) Após hidrólise com *ThCel7A*; C) Após hidrólise com *ThCEI7B*; D) Após hidrólise com *ThCel7A + ThCEI7B*. Os experimentos foram conduzidos por 48 horas, a 50°C e pH 5. Escala 3µm.

**Fonte:** Elaborada pela autora.

Ao analisar as alterações morfológicas em menor tempo de hidrólise (12 horas), foi observado uma tendência muito similar. Tempos de hidrólise mais curtos não puderam ser avaliados, uma vez que as alterações morfológicas são demasiadamente pequenas para serem notadas.

#### 5.4.5 Análise da liberação de açúcar redutor total, solúvel e insolúvel produzidos na hidrólise em sinergismo

Na tentativa de compreender a forma como a atividade de cada enzima influencia o sinergismo, avaliamos a liberação de extremidades redutoras por endo e exoglucanases, a partir do papel de filtro em frações solúveis e insolúveis.

A Tabela 4 indica que a quantidade de açúcares solúveis liberadas por hidrólise é superior em todas as amostras (*ThCel7B*, *ThCel7A* e sinergismo) quando comparada com os açúcares redutores insolúveis. Como era esperado de uma endoglucanase, a *ThCel7B*, produz uma quantidade ligeiramente superior de extremidades redutoras insolúveis. Além disso, segundo Silveira (2014), a quantidade de açúcar solúvel e insolúvel pode mudar em relação à concentração do preparado enzimático.<sup>167</sup>

Um resultado surpreendente foi que as frações de açúcares solúveis liberados que eram 54 e 64% sob a ação das *ThCel7B* e *ThCel7A*, respectivamente, aumentou drasticamente para 92% sob a ação cooperativa destas duas enzimas, o que pode indicar que na ausência de endoglucanases, a elevada processividade intrínseca da exoglucanase foi limitada pelo modelo de substrato. Wang *et.al* (2013) em um trabalho recente, usando a microscopia de força atômica de alta resolução para estudar a degradação da celulose bacteriana após hidrólise em sinergismo de duas exoglucanases e uma endoglucanase de *Trichoderma reesei*, mostrou que os efeitos eram dependentes da ordem de adição das enzimas e que a eficiência hidrolítica foi maior quando a celobiohidrolase foi adicionada em amostra previamente tratada com a endoglucanase. De acordo com os autores, a ação da endoglucanase resultou na remoção de celulose amorfa, ao mesmo tempo que amaciou e inchou as fibras, expondo as microfibrilas e facilitando ataque da exoglucanase.<sup>192</sup>

**Tabela 4-** Açúcares redutores solúveis e insolúveis gerados por *ThCel7B* (endoglucanase) e *ThCel7A* (exoglucanase), agindo individualmente ou em sinergismo.

Enzima	Açúcar redutor (% do total)		Solúvel/Insolúvel
	Solúvel	Insolúvel	
<i>ThCel7B</i>	54 ± 2	46 ± 4	1.17
<i>ThCel7A</i>	64 ± 2	36 ± 4	1.75
<i>ThCel7A+</i> <i>ThCel7B</i>	92 ± 4	8 ± 5	13.14

**Fonte:** Elaborada pela autora.

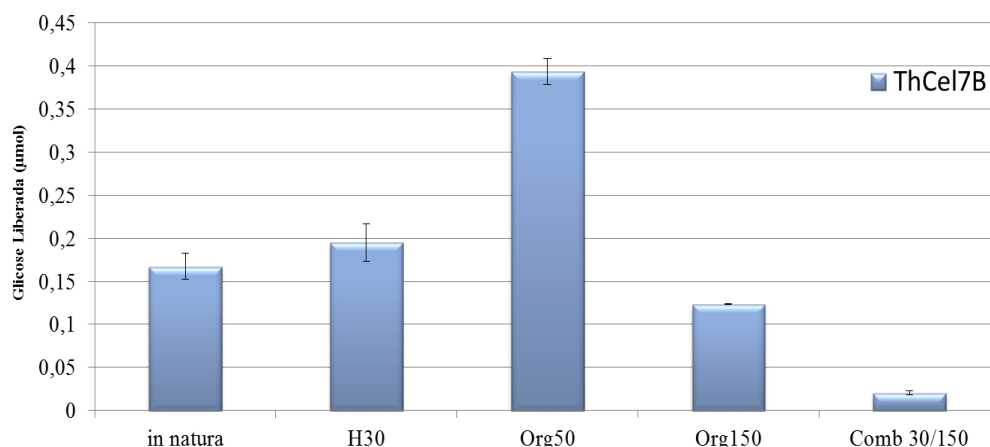


Este experimento também fornece informações sobre a capacidade de processamento da enzima, a qual está relacionada com a distribuição de açúcares redutores solúvel e insolúveis provenientes do papel de filtro. Uma vez que exoglucanases produzem mais unidades de celobiose livres, são consideradas mais processivas enquanto que as endoglucanases normalmente clivam a cadeia de celulose aleatoriamente, produzindo extremidades reductoras que permanecem agregados ao papel de filtro. Deste modo, proporcionalmente quanto mais açúcar reductor solúvel for medido, maior será a processividade da enzima. Experimentalmente, as baixas razões entre a produção de açúcar solúvel e insolúvel, produzidos pelas celulasas individualmente, indicam a baixa capacidade de processamento aparente neste substrato. Quando as duas enzimas agem juntas, esse grau processabilidade aumenta substancialmente.

Em resumo, em concordância com trabalhos anteriores, nossos resultados evidenciam que a atividade de endoglucanase parece ser um fator importante e talvez até limitante para a sinergia endo-exo sobre substratos insolúveis.<sup>167; 192</sup>

## 5.5 Hidrólise em bagaço de cana de açúcar

Para analisar detalhadamente a ação enzimática de *ThCel7B* em amostras mais complexas, utilizamos esta proteína para hidrólise do bagaço de cana pré-tratado e investigamos a eficiência de hidrólise. As quantidades de glicose liberada pela enzima nos diferentes bagaço de cana pré-tratado e *in natura* (sem pré-tratamento) estão apresentadas na Figura 39.



**Figura 39** - Gráfico de glicose liberada pela *ThCel7B* em substratos de bagaço de cana de açúcar tratados sob diferentes condições.

**Fonte:** Elaborada pela autora.

A liberação de glicose foi calculada por subtração da quantidade de glicose residual presente nos controles (bagaço + tampão). Isto é importante porque o bagaço possui uma quantidade significativa de sacarose residual, a qual deve ser considerada.

A melhor eficiência de hidrólise da *ThCel7B* foi observada na amostra Org 50, seguida em ordem decrescente por H30 > *in natura* > Org 150 > Comb30/150. Olhando a tabela de composição do bagaço (Tabela 3 **Erro! Fonte de referência não encontrada.**) podemos correlacionar que o bagaço onde a enzima teve maior eficiência (Org 50) contém elevada percentagem de hemicelulose na sua composição (~15%) quando comparado com o comb 30/150 (~5%), no qual a eficiência foi a menor. Comparando a hidrólise entre o mesmo tipo de tratamento, Org 50 e Org 150, observamos um acentuado decréscimo na quantidade de açúcar liberado para o segundo, fator que está, provavelmente, relacionado com a diminuição na composição de hemicelulose de 15% para 9%. A preferência de *ThCel7B* por substratos hemicelulósicos já havia sido confirmada ao investigarmos a clivagem no painel de substratos e obtido como substrato de maior atividade enzimática, o  $\beta$ -glucano e xiloglucano. Agora em substrato complexo, verificamos que essa preferência é real e se mantém.

Apesar do bagaço *in natura* e o pré tratado H30, possuírem maior porcentagem de hemicelulose (~20%) eles apresentam alto teor de lignina (~29%) se comparado ao Org 50 (~22%), o que dificulta o acesso enzimático ao substrato.

## 5.6 Cristalografia de proteínas

Embora várias endoglucanases GH7 tenham sido caracterizadas bioquimicamente, há apenas três estruturas cristalográficas desta família disponíveis no banco de dados PDB: *HiCel7B* de *Humicola insolens* (PDB id: 1A39);<sup>193</sup> *FoCel7B* de *Fusarium oxysporum* (PDB id: 1OVW)<sup>194</sup> e *TrCel7B* de *Trichoderma reesei* (PDB id: 1EG1).<sup>69</sup> Apesar desta última ser entre as endoglucanases, a enzima mais relevante industrialmente, uma compreensão completa da relação estrutura-função fica comprometida devido a baixa resolução da estrutura (3,6 Å de resolução). Assim, na tentativa de obter uma estrutura cristalográfica com melhor resolução e análises mais detalhadas da estrutura da proteína, muitos esforços foram concentrados para conseguir cristalizar a *ThCel7B*.

Após todos os ensaios de cristalização, realizados com *ThCel7B*-CCD, foram observados pequenos cristais na condição de 0,1 M de sulfato de amônio e 0,05 M de Tris-HCl a pH 7,5, os quais foram utilizados no “*seeding*”. Decorrido 3 meses, na mesma condição anteriormente descrita houve surgimento de um único cristal, que levou cerca de 8 meses para chegar no tamanho final de 0,2 mm e submetido à experimentos de difração de raios-X.

O cristal obtido foi submetido ao experimento de difração de raios-X, em condições criogênicas e apresentou padrões de difração bem definidos, aparentemente sem sobreposição de pontos (*overlaps*). Os dados foram integrados a uma resolução máxima de 3,2 Å usando o programa XDS, e o escalonamento foi realizado com o programa Aimless. Os parâmetros e as estatísticas de processamento desse conjunto de dados se encontram na tabela a seguir (Tabela 5).

**Tabela 5-** Parâmetros e estatísticas da coleta e processamento dos dados cristalográficos da enzima *ThCel7B*-CCD.

<i>ThCel7B</i> CCD	
Detector	APEX II CCD
Comprimento de onda (Å)	1,54
Intervalo de Resolução (Å)	29,8 - 3,2 (3,3 - 3,2)
Grupo espacial	P 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Célula unitária (a, b, c; Å)	74,6 99,4 114,1
Reflexões únicas	14522 (1427)
Multiplicidade	27 (19)
Completeza (%)	99,95 (99,79)
Rp.i.m (%)	18,6 (43,7)
I/σ(I)	5,7 (2,3)

**Fonte:** Elaborada pela autora.

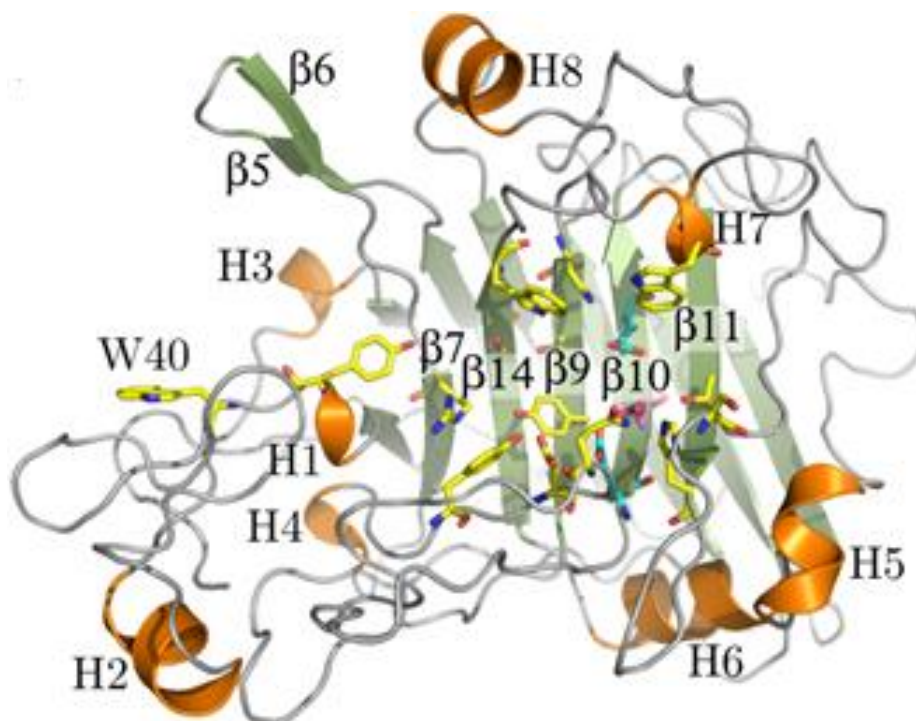
O processo de obtenção das fases do conjunto experimental de dados foi realizado por meio do método de substituição molecular, utilizando o programa PHASER e o modelo da endoglucanase I de *Trichoderma reesei* (87% de identidade sequencial). Posteriormente à obtenção de um modelo inicial, realizamos o refinamento do mesmo com o programa Phenix e Coot. O programa MOLPROBIT foi utilizado para a validação do modelo, cujos os diagramas construídos demonstraram a qualidade do modelo final da estrutura. A tabela mostra os parâmetros e estatísticas resultantes após a finalização do processo de refinamento.

**Tabela 6** - Parâmetros e estatísticas resultantes do processo de refinamento dos dados cristalográficos da enzima *ThCel7B-CCD*

<i>ThCel7B-CCD</i>	
Resolução (Å)	3,2
R-work (%)	21,11 (31,9)
R-free (%)	25,0 (34,4)
Distância das ligações (Å)	0,016
Ângulo das ligações (°)	1,44
Ramachandran favored (%)	95
Ramachandran outliers (%)	0
Clashscore	10,78

**Fonte:** Elaborada pela autora.

O modelo final é composto por duas cadeias de *ThCel7B-CCD*, entretanto, nenhum contato sugere que esta forma é estável em solução, confirmando com experimentos anteriores, que a proteína é monômero. A estrutura do monômero da enzima é composta por 24 fitas  $\beta$  e 8 hélices  $\alpha$ , onde as fitas  $\beta$  formam duas folhas  $\beta$  que ficam uma de frente para outra (Figura 40), formando um  $\beta$  sanduíche, com uma longa fenda de ligação de celulose (sítio catalítico), do mesmo modo que nas outras endoglucanase  $\beta$ -1,4.<sup>69; 193; 194</sup>



**Figura 40** - Estrutura de raios-X de *ThCel7B*-CCD.  $\beta$ -jelly roll com o sítio catalítico. Os aminoácidos catalíticos importantes como Glu196 e Glu201 são mostrados na forma de stick, assim como assistente catalítico Asp198.

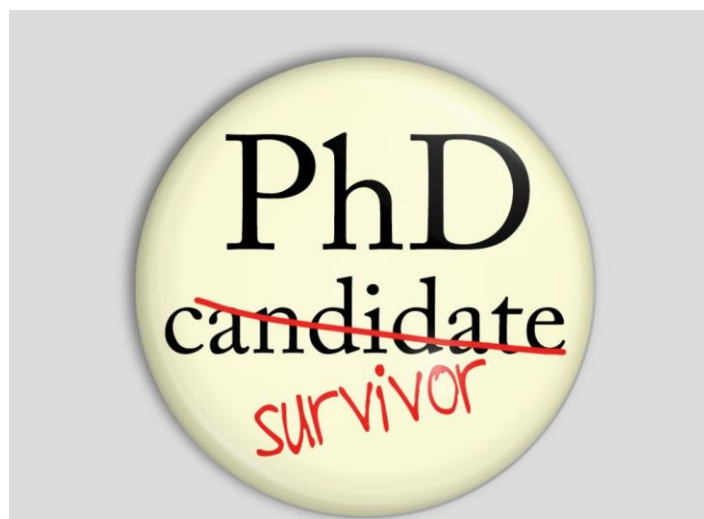
**Fonte:** Elaborada pela autora.

O modelo estrutural apresenta 8 pontes de sulfeto (cisteínas: 19-25, 49-70, 60-66, 139-338, 175-193, 194-171, 214-219 e 224-293) e duas glicosilações (Asn56 e Asn153). O sítio catalítico com os sub sítios na face côncava do  $\beta$ -sanduíche possui 48 Å de comprimento e 32 Å largura, ao longo das fitas 7, 9, 10, 11 e 14. A distância entre os aminoácidos catalíticos Glu196 e Glu201 é de 5,4 Å, típico de hidrolases da família GH 7 com mecanismo catalítico do tipo de retenção.<sup>195</sup>

Surpreendentemente, através da geração dos posicionamentos de simetria cristalográficas da unidade assimétrica a glicosilação Asn56 (NAG 375 e 376 e BMA 377) "doca" para o produto final do sítio catalítico da molécula de proteína adjacente. Particularmente, a beta manosidase 377 (BMA 377) e a n-acetil glucosamina 376 (NAG 376) estão ocupando os sub sítios +1 e +2 no sítio ativo de *ThCel7B*, sendo que BMA interage fortemente com o sítio catalítico através de pontes de hidrogênio. Um átomo de oxigênio da BMA interage com oxigênio do Glu201 de maneira esperada para o produto de hidrólise. Esta ocorrência possui semelhança estrutural notável, com as estruturas de endoglucanase e celobiohidrolase disponíveis com ligantes cristalizados no sítio ativo.

De posse dos dados estruturais, foi possível também, investigar as interações enzima-substrato utilizando simulações de dinâmica molecular (MD), as quais foram realizadas pelo Prof. Dr. Milton Sonoda. Foram identificadas conformações de carboidratos específicos e interações enzima-substrato que provocam a distorção do substrato no subsítio -1 para que possa ocorrer a catálise. As simulações também revelaram um sub sítio de ligação adicional, localizado ao lado do sub sítio +2, o qual parece ser importante para a ligação e reconhecimento de substratos particulares, elucidando a preferência pela clivagem de determinados substratos pela *ThCel7B*.

## Conclusões e Perspectivas



*"Mas na profissão, além de amar tem de saber. E o saber leva tempo pra crescer".*

*Rubem Alves*





## 6 Conclusões e Perspectivas

O presente trabalho determinou as características bioquímicas, biofísicas e estruturais da endoglucanase I Cel7B do fungo *Trichoderma harzianum*, apresentando resultados que contribuem para a compreensão das propriedades funcionais dessa enzima em particular bem como de outras celulasas pertencentes à família GH7.

Tanto o domínio catalítico, quanto a proteína inteira de *ThCel7B*, possuem atividade enzimática dentro de uma vasta variedade de substratos derivados de celulose e hemicelulose, com elevado nível hidrolítico em substratos com ligações  $\beta$ -1,4 e ligações mista  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,4, como por exemplo o  $\beta$ -glucano, no qual a atividade enzimática específica foi de  $75 \text{ U mg}^{-1}$ , maior atividade observada dentro do painel de substratos testado. Quando testada em substrato complexo, como a biomassa de cana de açúcar submetida a diferentes pré-tratamentos, a *ThCel7B* foi capaz de hidrolisar o bagaço, sendo que, a maior taxa hidrolítica se deu no bagaço Org 50, que em sua composição apresenta alta taxa de hemicelulose e baixa taxa de lignina. Outro dado relevante refere-se à determinação das condições ótimas para a atividade da enzima, especificamente acerca do pH (pH 3 e temperatura de  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ ), sendo que o melhor pH para a estabilidade térmica de *ThCel7B*-CCD e *ThCEL7B*-full foi de 5 ( $T_m$  de  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ ), conforme evidenciado pelos ensaios de *Thermofluor*. Os dados de cinética enzimática utilizando xiloglucano como substrato permitiram a determinação dos de um  $K_m$  de  $1,98 \pm 0,47 \text{ g.L}^{-1}$  para proteína inteira e  $2,9 \pm 0,6 \text{ g.L}^{-1}$  para a construção contendo o CCD, enquanto que o  $V_{\max}$  foi  $0,22 \pm 0,095 \text{ } \mu\text{M.s}^{-1}$  para *ThCel7B*-full e  $0.012 \pm 0.009 \text{ } \mu\text{M.s}^{-1}$  para *ThCel7B*-CCD, mostrando que a deleção do CBM altera a eficiência catalítica. Os ensaios de atividade residual foram surpreendentes, uma vez incubada a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  e no pH de maior estabilidade térmica (pH 5), a enzima manteve sua atividade intacta ao longo de 2 meses. A análise de flocos de aveia hidrolisados por *ThCel7B* permitiu a visualização dos efeitos da atividade hidrolítica da enzima, enquanto que experimentos de eletroforese capilar e espectroscopia de massas desenharam um perfil de degradação típico de endoglucanase, tendo a liberação de celotetraose, celotriose e celobiose após hidrólise da celohexaose. A técnica de dicroísmo circular mostrou espectros típicos de proteínas formadas majoritariamente por folhas  $\beta$  e os resultados de desnaturação térmica, mostrou que *ThCel7B* sofre perturbação da estrutura secundária em pHs elevados.

Espalhamento dinâmico de luz (DLS) também mostrou a influência do pH na estabilidade proteica, sendo que em pH acima de 6 a proteína se encontra polidispersa em solução.

Os experimentos de diluição utilizando ou não a centrifugação foram realizados a fim de elucidar a ligação improdutiva da celulase em substrato cristalino, e comprovou que a adsorção é 100% reversível quando não ocorre a centrifugação. Já os ensaios de sinergismo mostraram o efeito sinérgico entre *ThCel7B* e *ThCel7A*, com DS de 3 quando testado em papel filtro e pH 5; também ficou evidenciado que o grau de sinergismo é influenciado pelo tipo de substrato, sendo maior em papel filtro quando comparado com o obtido em celulose bacteriana e pelo tempo de reação, uma vez que em tempos menores o grau de sinergismo é maior. O sinergismo entre a endoglucanase e celobiohidrolase também foi visualizado por microscopia eletrônica, através da análise de amostras de celulose bacteriana hidrolisada por 24 horas. A quantificação de liberação de açúcares redutor insolúvel foi de  $46 \pm 4\%$  para *ThCel7B* e  $36 \pm 4\%$  para *ThCel7A*, sendo que este valor cai para  $8 \pm 5\%$  quando as duas enzimas estão em sinergismo, demonstrando que quando endoglucanase e celobiohidrolase agem juntas, a quantidade de açúcar redutor solúvel aumenta consideravelmente.

A estrutura cristalográfica da *ThCel7B*-CCD confirmou que o enovelamento é do tipo sanduíche de folhas  $\beta$ , com sítio catalítico do tipo fenda, que é bastante conservado dentre as hidrolases de glicosídeos da família 7, e os resíduos catalíticos foram identificados como sendo o Glu196 e Glu201.

Além dos resultados científicos aqui apresentados e discutidos, este trabalho proporcionou o aperfeiçoamento na formação profissional e pessoal desta doutoranda, através do estudo, aprendizado e utilização de diferentes técnicas biofísicas e bioquímicas que foram aplicadas na caracterização da proteína. As colaborações com pesquisadores de diferentes grupos de pesquisa nacionais e internacionais permitiram discussões produtivas, aperfeiçoamento de metodologias aplicadas além da amplificação do conhecimento.

Como perspectivas futuras, há a possibilidade de utilizar a enzima em questão para estudos de sinergismo voltado viabilização de coquetel enzimático, em conjunto com LPMOs e  $\beta$ -glicosidades. Há também a possibilidade de nos aprofundar no aprendizado e entendimento da processividade, visamos uma melhor compreensão da especificidade enzimática e dos mecanismos de ação, no contexto da parede celular e sobre carboidratos isolados.

## Referências



*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*

*Madre Teresa de Calcuta*



## REFERÊNCIAS

- 1 CORONADO, C. R.; DE CARVALHO JUNIOR, J. A.; SILVEIRA, J. L. Biodiesel CO<sub>2</sub> emissions: a comparison with the main fuels in the Brazilian market. **Fuel Processing Technology**, v. 90, n. 2, p. 204-211, 2009.
- 2 HOOD, E. E. et al. Subcellular targeting is a key condition for high-level accumulation of cellulase protein in transgenic maize seed. **Plant Biotechnology Journal**, v. 5, n. 6, p. 709-719, Nov. 2007.
- 3 OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.
- 4 BADGER, P. C. Ethanol from cellulose: a general review. In: JANICK, J.; WHIPKEY, A. (Ed.). **Trends in new crops and new uses**. Alexandria: ASHS Press, 2002. p.17-21.
- 5 TU, M.; CHANDRA, R. P.; SADDLER, J. N. Evaluating the distribution of cellulases and the recycling of free cellulases during the hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Biotechnology Progress**, v. 23, n. 2, p. 398-406, 2007.
- 6 SCHUSTER, B.; CHINN, M. Consolidated bioprocessing of lignocellulosic feedstocks for ethanol fuel production. **BioEnergy Research**, v. 6, n. 2, p. 416-435, 2013.
- 7 LEME, R. M. **Álcool combustível derivado da cana-de-açúcar e o desenvolvimento sustentável**. 2004. Disponível em: <<http://www.proceedings.scielo.br/pdf/agrener/n5v1/007.pdf>>. Acesso em: 02 dec. 2014.
- 8 CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de cana de açúcar**. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15\\_12\\_17\\_09\\_03\\_29\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_3o\\_lev\\_-\\_15-16.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_12_17_09_03_29_boletim_cana_portugues_-_3o_lev_-_15-16.pdf)>. Acesso em: 07 fev. 2016.
- 9 BRASIL. Ministerio de Minas e Energia. **Balanco energético nacional: ano base 2014**. Brasilia: 2014.
- 10 SOCCOL, C. R. et al. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4820-4825, Jul 2010.
- 11 CLASH. Disponível em <<http://www.clash.com.au/SamiProject/FossilFuel.htm>>. Acesso em: 07 dec.2015
- 12 MANZANO-AGUGLIARO, F. et al. Scientific production of renewable energies worldwide: an overview. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 18, p. 134-143, 2013. doi:10.1016/j.rser.2012.10.020

- 13 BETANCUR, G. J. V.; PEREIRA JUNIOR, N. Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production: part II: hemicellulose hydrolysate fermentability. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 14-15, 2010.
- 14 KUMAR, P. et al. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, 2009.
- 15 GRABBER, J. H. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? a review of cell wall model studies. **Crop Science**, v. 45, p. 820-831, 2005. doi:10.2135/cropsci2004.0191
- 16 TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 9, p. 1621-1651, Sep 2008.
- 17 VORAGEN, A. J. et al. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Structural Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 263-275, 2009
- 18 HIMMEL, M. E. et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 804-807, 2007.
- 19 MORGAN, J. L.; STRUMILLO, J.; ZIMMER, J. Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. **Nature**, v. 493, n. 7431, p. 181-186, 2013.
- 20 FELDMAN, D. Wood—chemistry, ultrastructure, reactions, by D. Fengel and G. Wegener, Walter de Gruyter, Berlin and New York, 1984. **Journal of Polymer Science: polymer letters edition**, v. 23, n. 11, p. 601-602, 1985.
- 21 FLORESTA. Disponível em: < <http://daflorestaopapel.com/p5/>>. Acesso em: 07 dez.2015.
- 22 KLEMM, D. et al. General considerations on structure and reactivity of cellulose: section 2.1–2.1.4. In: KLEMM, D. (Ed.). **Comprehensive cellulose chemistry**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 1998. v. 1. p.9-29.
- 23 PARK, S. et al. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 1-10, 2010.
- 24 ZUGENMAIER, P. Conformation and packing of various crystalline cellulose fibers. **Progress in Polymer Science**, v. 26, n. 9, p. 1341-1417, 2001.
- 25 COTTON technical guide. 2011. Disponível em: <<http://es.cottoninc.com/Cotton-Nonwoven-Technical-Guide-es/Cotton-Nonwoven-Technical-Guide.pdf>>. 2011. Acesso em: 02 dec. 2015.
- 26 GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775-4800, 2010.

- 27 SUN, J. X. et al. Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. **Polymer Degradation and Stability**, v. 84, n. 2, p. 331-339, 2004.
- 28 PAYNE, C. M. et al. Fungal cellulases. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 3, p. 1308-1448, 2015.
- 29 GABRIELI, I. et al. Separation, characterization and hydrogel-formation of hemicellulose from aspen wood. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, n. 4, p. 367-374, 2000. I
- 30 SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 219-228, 2003.
- 31 KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, n. 4, p. 411-456, 1999.
- 32 CHAUHAN, P. S. et al. Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 5, p. 1817-1830, 2012.
- 33 DE SOUZA, A. et al. Composition and structure of sugarcane cell wall polysaccharides: implications for second-generation bioethanol production. **BioEnergy Research**, v. 6, n. 2, p. 564-579, 2013.
- 34 HSIEH, Y. S.; HARRIS, P. J. Xyloglucans of monocotyledons have diverse structures. **Molecular Plant**, v. 2, n. 5, p. 943-65, 2009.
- 35 GORSHKOVA, T. A. et al. Cell-wall polysaccharides of developing flax plants. **Plant Physiology**, v. 110, n. 3, p. 721-729, 1996.
- 36 BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 15, n. 3-4, p. 583-620, 1997.
- 37 MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technol**, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.
- 38 ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.
- 39 CHANG, V.; NAGWANI, M.; HOLTZAPPLE, M. Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 74, n. 3, p. 135-159, 1998.

40 BRODEUR, G. et al. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 17, 2011. doi: 10.4061/2011/787532.

41 SARKAR, N. et al. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p. 19-27, 2012.

42 PAN, X. et al. Bioconversion of hybrid poplar to ethanol and co-products using an organosolv fractionation process: optimization of process yields. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 94, n. 5, p. 851-61, 2006.

43 ALVO, P.; BELKACEMI, K. Enzymatic saccharification of milled timothy (*Phleum pratense* L.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Bioresource Technology**, v. 61, n. 3, p. 185-198, 1997.

44 PITARELO, A. P. et al. Efeito do teor de umidade sobre o pré-tratamento a vapor e a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 35, n. 8, p. 1502-1509, 2012.

45 KERSTEN, P.; CULLEN, D. Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 44, n. 2, p. 77-87, 2007.

46 DA COSTA SOUSA, L. et al. 'Cradle-to-grave' assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 339-347, 2009.

47 JONES, J. L.; SEMRAU, K. T. Wood hydrolysis for ethanol production — previous experience and the economics of selected processes. **Biomass**, v. 5, n. 2, p. 109-135, 1984.

48 WYMAN, C. E. Biomass ethanol: technical progress, opportunities, and commercial challenges. **Annual Review of Energy and the Environment**, v. 24, n. 1, p. 189-226, 1999.

49 HAMELINCK, C. N.; HOOIJDONK, G. V.; 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.

50 CHENG, K. K. et al. Sugarcane bagasse mild alkaline/oxidative pretreatment for ethanol production by alkaline recycle process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, n. 1, p. 43-50, 2008.

51 KLEIN-MARCUSCHAMER, D. et al. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 4, p. 1083-1087, 2012.



- 52 RIVERA, E. C. et al. Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for bioethanol production: determining optimal enzyme loading using neural networks. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 85, n. 7, p. 983-992, 2010.
- 53 RABELO, S. C. et al. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 7, p. 2600-2607, 2011.
- 54 BEILEN, J. B. V.; LI, Z. Enzyme technology: an overview. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 338-344, 2002.
- 55 HIMMEL, M. E. et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 804-807, 2007.
- 56 MBA MEDIE, F. et al. Genome analyses highlight the different biological roles of cellulases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 227-234, 2012.
- 57 REESE, E. T.; SIU, R. G. H.; LEVINSON, H. S. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. **Journal of Bacteriology**, v. 59, n. 4, p. 485-497, 1950.
- 58 RYU, D. D. Y.; MANDELS, M. Cellulases: biosynthesis and applications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 2, n. 2, p. 91-102, 1980.
- 59 MANDELS, M. Applications of cellulases. **Biochemical Society Transactions**, v. 13, n. 2, p. 414-416, 1985.
- 60 GOULD R. F. **Cellulases and their applications**. Washington: ACS, 1969. (Advances in chemistry series, v. 95).
- 61 BERGHEM, L. E. R.; PETTERSSON, L. G. The mechanism of enzymatic cellulose degradation. **European Journal of Biochemistry**, v. 46, n. 2, p. 295-305, 1974.
- 62 LOMBARD, V. et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. D490-D495, 2014. doi: 10.1093/nar/gkt1178.
- 63 HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemistry Journal**, v. 280, pt 2, p. 309-316, 1991.

64 HENRISSAT, B.; TEERI, T. T.; WARREN, R. A. A scheme for designating enzymes that hydrolyse the polysaccharides in the cell walls of plants. **FEBS Letters**, v. 425, n. 2, p. 352-354, 1998.

65 MCCARTER, J. D.; STEPHEN WITHERS, G. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 4, n. 6, p. 885-892, 1994

66 KOSHLAND, D. E. Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. **Biological Reviews**, v. 28, n. 4, p. 416-436, 1953.

67 SINNOTT, M. L. Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer. **Chemical Reviews**, v. 90, n. 7, p. 1171-1202, 1990.

68 GILKES, N. R. et al. Domains in microbial beta-1, 4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 2, p. 303-315, 1991.

69 KLEYWEGT, G. J. et al. The crystal structure of the catalytic core domain of endoglucanase I from *Trichoderma reesei* at 3.6 Å resolution, and a comparison with related enzymes1. **Journal of Molecular Biology**, v. 272, n. 3, p. 383-397, 1997.

70 SRISODSUK, M. et al. Role of the interdomain linker peptide of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I in its interaction with crystalline cellulose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 28, p. 20756-61, 1993.

71 VAN TILBEURGH, H. et al. Limited proteolysis of the cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*: Separation of functional domains. **FEBS Letters**, v. 204, n. 2, p. 223-227, 1986.

72 RECEVEUR, V. et al. Dimension, shape, and conformational flexibility of a two domain fungal cellulase in solution probed by small angle X-ray scattering. **Journal of Biological Chemistry** v. 277, n. 43, p. 40887-40892, 2002.

73 LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

74 KLEMAN-LEYER, K. M. et al. The cellulases endoglucanase i and cellobiohydrolase ii of *trichoderma reesei* act synergistically to solubilize native cotton cellulose but not to decrease its molecular size. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 8, p. 2883-2887, 1996.

- 75 CANTAREL, B. L. et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. D233-D238, 2009.
- 76 GILKES, N. R. et al. Attack of carboxymethylcellulose at opposite ends by two cellobiohydrolases from *Cellulomonas fimi*. **Journal of Biotechnology**, v. 57, n. 1–3, p. 83-90, 1997.
- 77 DIVNE, C. et al. The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. **Science**, v. 265, n. 5171, p. 524-528, 1994.
- 78 OTWINOWSKI, Z.; MINOR, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. **Methods in Enzymology**, v. 276, p.307-326, 1997.
- 79 DE CASTRO, A. M. et al. *Trichoderma harzianum* IOC-4038: a promising strain for the production of a cellulolytic complex with significant  $\beta$ -glucosidase activity from sugarcane bagasse cellulignin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 7, p. 2111-2122, 2010.
- 80 NUMMI, M. et al. Cellobiohydrolase from *Trichoderma reesei*. **Biochemical Journal**, v. 215, n. 3, p. 677-683, 1983.
- 81 ZHANG, Y. H.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 797-824, 2004.
- 82 CARREA, G.; COLOMBO, G. Coupling high enzyme activity and stability: a challenging target. **Trends in Biotechnology**, v. 18, n. 10, p. 401-402, 2000.
- 83 KOROTKOVA, O. G. et al. Isolation and properties of fungal beta-glucosidases. **Biochemistry**, v. 74, n. 5, p. 569-577, 2009.
- 84 GOURLAY, K.; ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Use of substructure-specific carbohydrate binding modules to track changes in cellulose accessibility and surface morphology during the amorphogenesis step of enzymatic hydrolysis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 1-14, 2012.
- 85 EKWE, E. et al. Non-hydrolytic cellulose active proteins: research progress and potential application in biorefineries. **Industrial Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 123-131, 2013.

- 86 GUILLÉN, D.; SÁNCHEZ, S.; RODRÍGUEZ-SANOJA, R. Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 5, p. 1241-9, 2010.
- 87 HORN, S. J. et al. Measuring processivity. **Methods in Enzymology**, v. 510, p. 69-95, 2012.
- 88 ZHANG, J. et al. The carbohydrate-binding module of xylanase from *Nonomuraea flexuosa* decreases its non-productive adsorption on lignin. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2013.
- 89 COSGROVE, D. Loosening of plant cell walls by expansins. **Nature**, v. 407, 2000. doi: 10.1038/35030000.
- 90 BAKER, J. O. et al. Investigation of the cell-wall loosening protein expansin as a possible additive in the enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 217-223, 2000.
- 91 SALOHEIMO, M. et al. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 17, p. 4202-4211, 2002.
- 92 GEORGELIS, N.; NIKOLAIDIS, N.; COSGROVE, D. J. Biochemical analysis of expansin-like proteins from microbes. **Carbohydrate Polymers**, v. 100, p. 17-23, 2014. doi:10.1016/j.carbpol.2013.04.094
- 93 QUINLAN, R. J. et al. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 108, n. 37, 2011. doi: 10.1073/pnas.1105776108.
- 94 HORN, S. J. et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 1-13, 2012.
- 95 HEMSWORTH, G. R. et al. Discovery and characterization of a new family of lytic polysaccharide monooxygenases. **Nature Chemical Biology**, v. 10, n. 2, p. 122-126, 2014.
- 96 LO LEGGIO, L. et al. Structure and boosting activity of a starch-degrading lytic polysaccharide monooxygenase. **Nature Communications**, v. 6, 2015..doi: 10.1038/ncomms6961.

97 VAAJE-KOLSTAD, G. et al. An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. **Science**, v. 330, n. 6001, 2010. doi: 10.1126/science.1192231 >.

98 AGGER, J. W. et al. Discovery of LPMO activity on hemicelluloses shows the importance of oxidative processes in plant cell wall degradation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 17, p. 6287-6292, 2014.

99 KOSTYLEV, M.; WILSON, D. B. Synergistic interactions in cellulose hydrolysis. **Biofuels**, v. 3, 2012. doi: 10.4155/bfs.11.150 >.

100 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.

101 WOOD, T. M.; MCCRAE, S. I. Synergism between enzymes involved in the solubilization of native cellulose. . **Advances in Chemistry Series**, v. 181, 1979. doi: 10.1021/ba-1979-0181.ch010.

102 DIN, N. et al. C1-Cx revisited: intramolecular synergism in a cellulase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 24, p. 11383–11387, 1994.

103 DRISKILL, L. E. et al. Relationship between glycosyl hydrolase inventory and growth physiology of the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus* on carbohydrate-based media. **Applied and Environmental Microbiology** v. 65, n. 3, p. 893-897, Mar 1999.

104 SILVEIRA, M. H. L. et al. The essential role of plant cell wall degrading enzymes in the success of biorefineries: current status and future challenges. In: DA SILVA, S. S.; CHANDEL, K. A. (Ed.). **Biofuels in Brazil: fundamental aspects, recent developments, and future perspectives**. Cham: Springer International Publishing, 2014. p.151-172.

105 HENRISSAT, B. et al. Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis. **Gene**, v. 81, n. 1, p. 83-95, Sep 1989.

106 GARCÍA, R. et al. Characterization of protein glycoforms with N-linked neutral and phosphorylated oligosaccharides: studies on the glycosylation of endoglucanase 1 (Cel7B) from *Trichoderma reesei*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 33, pt 2, p. 141-152, Apr 2001.

107 WANG, K. et al. A highly-active endo-1,3-1,4- $\beta$ -glucanase from thermophilic *Talaromyces emersonii* CBS394.64 with application potential in the brewing and feed industries. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 9, p. 1448-1456, 2014.

- 108 BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 5, p. 355-383, Aug 2000.
- 109 HILDÉN, L.; VÄLJAMÄE, P.; JOHANSSON, G. Surface character of pulp fibres studied using endoglucanases. **Journal of Biotechnology**, v. 118, n. 4, p. 386-397, Sep 2005.
- 110 VON OSSOWSKI, I. et al. Engineering the exo-loop of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase, Cel7A. A comparison with *Phanerochaete chrysosporium* Cel7D. **Journal of Molecular Biology**, v. 333, n. 4, p. 817-829, Oct 2003.
- 111 ESTERBAUER, H. et al. Enzymatic hydrolysis of cellulose production of *Trichoderma cellulase* in laboratory and pilot scale. **Bioresource Technology**, v. 36, n. 1, p. 51-65, 1991.
- 112 KUHLS, K. et al. Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 15, p. 7755-7760, 1996.
- 113 SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. **Mycological Research**, v. 100, n. 8, p. 923-935, 1996.
- 114 CHAVERRI, P.; SAMUELS, G. J. *Hypocrea lixii*, the teleomorph of *Trichoderma harzianum*. **Mycological Progress**, v. 1, n. 3, p. 283-286, 2002. doi: 10.1007/s11557-006-0025-8.
- 115 CHAVERRI, P. et al. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum*/*Hypocrea lixii* complex. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 27, n. 2, p. 302-313, May 2003.
- 116 GRONDONA, I. et al. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 8, p. 3189-3198, 1997.
- 117 AHMED, S. et al. Production and purification of cellulose-degrading enzymes from a filamentous fungus *Trichoderma harzianum*. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, n. 3, p.1411-1419. 2009
- 118 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.
- 119 CEREGHINO, G. P. et al. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 329-332, Aug 2002.

120 LUBERTOZZI, D.; KEASLING, J. D. Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 53-75, 2009

121 SEGATO, F. et al. High-yield secretion of multiple client proteins in *Aspergillus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, n. 2, p. 100-106, Jul 2012.

122 FASANELLA, C. C. **Ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium sp.* em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente**. 2008. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

123 FLEISSNER, A.; DERSCH, P. Expression and export: recombinant protein production systems for *Aspergillus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 4, p. 1255-1270, Jul 2010.

124 PUNT, P. J. et al. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 200-206, May 2002.

125 PACALA, S.; SOCOLOW, R. Stabilization Wedges: Solving the Climate Problem for the Next 50 Years with Current Technologies. **Science**, v. 305, n. 5686, p. 968-972, 2004.

126 BRANDT, A. R. et al. Peak oil demand: the role of fuel efficiency and alternative fuels in a global oil production decline. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 14, p. 8031-8041, 2013.

127 DAVIS, R. et al. **Process design and economics for the conversion of lignocellulosic biomass to hydrocarbons**: dilute-acid and enzymatic deconstruction of biomass to sugars and catalytic conversion of sugars to hydrocarbons. 2015. Technical review. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/docs/fy15osti/62498.pdf>>. Acesso em: 15 maio 2015.

128 NORDBERG, H. et al. The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 updates. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. D26-D31, 2014. doi: 10.1093/nar/gkt1069.

129 SERPA, V. I. **Produção e caracterização de proteínas do complexo celulolítico de *Trichoderma harzianum*, envolvidas na hidrólise enzimática da biomassa**. 2012. 166 p. Tese (Doutorado em Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

130 MAEDA, R. N. et al. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugarcane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1196-1201, 2011.

131 STORMS, R. et al. Plasmid vectors for protein production, gene expression and molecular manipulations in *Aspergillus niger*. **Plasmid**, v. 53, n. 3, p. 191-204, 2005.

132 LANDY, A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. **Annual Review of Biochemistry**, v. 58, p. 913-49, 1989. doi: 10.1146/annurev.bi.58.070189.004405

133 SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning** : a laboratory manual. New York: Spring Harbor, 2001.

134 SCHÄGGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, n. 2, p. 368-379, 1987.

135 SERVER, M. **Matrix Science**. Disponível em: <<http://www.matrixscience.com/searchformselect.html>>. Acesso em: 28 jul. 2013.

136 CHEVALLET, M.; LUCHE, S.; RABILLOUD, T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. **Nature Protocols**, v. 1, n. 4, p. 1852-1858, 2006.

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

138 WOOD, T. M. Preparation of crystalline, amorphous, and dyed cellulase substrates. **Methods in Enzymology**, v. 160, p. 19-25, 1988.

139 ERICSSON, U. B. et al. Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. **Analytical Biochemistry**, v. 357, n. 2, p. 289-298, 2006.

140 JENA bioscience. Disponível em: <<http://www.jenabioscience.com/>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

141 NARAN, R.; PIERCE, M. L.; MORT, A. J. Detection and identification of rhamnogalacturonan lyase activity in intercellular spaces of expanding cotton cotyledons. **Plant Journal**, v. 50, n. 1, p. 95-107, 2007.

142 FRAZIER, R. A.; AMES, J. M.; NURSTEN, H. E. The development and application of capillary electrophoresis methods for food analysis. **Electrophoresis**, v. 20, n. 15-16, p. 3156-3180, 1999.



- 143 WILLIAMS, T. J. Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis. **Scanning**, v. 27, n. 4, p. 215-216, 2005. doi: 10.1002/sca.4950270410. Book review.
- 144 GIL, N. et al. Use of enzymes to improve the refining of a bleached Eucalyptus globulus kraft pulp. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, n. 2, p. 89-95, 2009.
- 145 LIU, N. et al. Fiber modification of kraft pulp with laccase in presence of methyl syringate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, n. 2, p. 89-95, 2009.
- 146 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.
- 147 KNOWLES, P. F. Biophysical chemistry: part II 'techniques for the study of biological structure and function'. **Biochemical Education**, v. 9, n. 4, p. 157-157, 1981. doi: 10.1016/0307-4412(81)90143-6. Book review.
- 148 STEPHENS, P. J. Circular dichroism: principles and applications. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 27, p. 8182-8182, 2002. Book review.
- 149 SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. **Analytical Biochemistry**, v. 287, n. 2, p. 252-60, 2000.
- 150 LEE, S. B. et al. Adsorption of cellulase on cellulose: Effect of physicochemical properties of cellulose on adsorption and rate of hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 24, n. 10, p. 2137-2153, 1982.
- 151 VÄLJAMÄE, P. et al. The initial kinetics of hydrolysis by cellobiohydrolases I and II is consistent with a cellulose surface-erosion model. **European Journal of Biochemistry**, v. 253, n. 2, p. 469-475, 1998.
- 152 CANNELLA, D. et al. Production and effect of aldonic acids during enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high dry matter content. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, 2012. doi: 10.1186/1754-6834-5-26.
- 153 GILKES, N. R. et al. The adsorption of a bacterial cellulase and its two isolated domains to crystalline cellulose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 10, p. 6743-6749, 1992.
- 154 KADAM, K. L.; RYDHOLM, E. C.; MCMILLAN, J. D. Development and validation of a kinetic model for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 3, p. 698-705, 2004
- 155 ZHENG, Y. et al. Temperature sensitivity of cellulase adsorption on lignin and its impact on enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Journal of Biotechnology**, v. 166, n. 3, p. 135-143, 2013.

156 PINTO, R. et al. Studies on the cellulose-binding domains adsorption to cellulose. **Langmuir**, v. 20, 2004. doi: 10.1021/la035611u >.

157 MAURER, S. A.; BEDBROOK, C. N.; RADKE, C. J. Cellulase Adsorption and Reactivity on a Cellulose Surface from Flow Ellipsometry. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 51, n. 35, p. 11389-11400, 2012.

158 MA, A. et al. The enzymatic hydrolysis rate of cellulose decreases with irreversible adsorption of cellobiohydrolase I. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, n. 7, p. 543-547, 2008.

159 LINDER, M.; TEERI, T. T. The cellulose-binding domain of the major cellobiohydrolase of *Trichoderma reesei* exhibits true reversibility and a high exchange rate on crystalline cellulose. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 22, p. 12251-12255, 1996.

160 PELLEGRINI, V. O. A. et al. Reversibility of substrate adsorption for the cellulases Cel7A, Cel6A, and Cel7B from *Hypocrea jecorina*. **Langmuir**, v. 30, n. 42, p. 12602-12609, 2014.

161 GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**. v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

162 WATSON, D. L.; WILSON, D. B.; WALKER, L. P. Synergism in binary mixtures of *Thermobifida fusca* cellulases Cel6B, Cel9A, and Cel5A on BMCC and Avicel. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 101, n. 2, p. 97-111, 2002.

163 CHAWLA, P. R. et al. Microbial cellulose: fermentative production and applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 107-124, 2009.

164 SCHRAMM, M.; HESTRIN, S. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 1. Micromethod for the determination of celluloses. **Biochemical Journal**, v. 56, n. 1, p. 163-166, 1954.

165 SILVEIRA, M. H. et al. Assessment of the enzymatic hydrolysis profile of cellulosic substrates based on reducing sugar release. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 392-6, 2014. doi: 10.1016/j.biortech.2013.09.135.

166 RABINOVICH, M. L.; MELNICK, M. S.; BOLOBOVA, A. V. The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. **Biochemistry (Moscow)**, v. 67, n. 8, p. 850-871, 2002. doi: 10.1023/A:1019958419032 >.

167 SILVEIRA, M. H. L. **Pré-tratamento de bagaço de cana com CO<sub>2</sub> supercrítico na presença de etanol e líquido iônico** : pré-otimização das variáveis do processo e avaliação da acessibilidade do substratos produzidos. 2014. 178 p. Tese (Doutorado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal do Parana, Curitiba, 2014.

168 KABSCH, W. XDS. **Acta Crystallographica D**, v. 66, pt 2, p. 125-132, 2010.

- 169 EVANS, P. R.; MURSHUDOV, G. N. How good are my data and what is the resolution? **Acta Crystallographica D**, v. 69, pt 7, p. 1204-1214, 2013.
- 170 MATTHEWS, B. W. Solvent content of protein crystals. **Journal of Molecular Biology**, v. 33, n. 2, p. 491-497, 1968.
- 171 MCCOY, A. J. et al. Phaser crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, n. 4, p. 658-674, 2007.
- 172 AFONINE, P. V. et al. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. **Acta Crystallographica D**, v. 68, pt 4, p. 352-367, 2012.
- 173 EMSLEY, P. et al. Features and development of Coot. **Acta Crystallographica D**, v. 66, n. 4, p. 486-501, 2010.
- 174 CHEN, V. B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallogr D**, v. 66, n. Pt 1, p. 12-21, Jan 2010.
- 175 SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS. **ExpPASy Prot Param tool**. Disponível em: <<http://web.expasy.org/protparam/>>. Acesso em: 29 jan. 2016.
- 176 PAYNE, C. M. et al. Glycosylated linkers in multimodular lignocellulose-degrading enzymes dynamically bind to cellulose. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 36, p. 14646-14651, 2013.
- 177 SAHA, B. C. Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides*. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 1871-1876, 2004.
- 178 DING, S. J.; GE, W.; BUSWELL, J. A. Endoglucanase I from the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. Purification, characterization, cloning and expression. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 22, p. 5687-5695, 2001.
- 179 SHUMIAO, Z. et al. High-level expression of an *Aspergillus niger* endo-beta-1,4-glucanase in *Pichia pastoris* through gene codon optimization and synthesis. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 467-473, 2010.
- 180 XIANG, L. et al. Identification and characterization of a new acid-stable endoglucanase from a metagenomic library. **Protein Expression and Purification**, v. 102, p. 20-26, 2014.
- 181 KIM, H. M. et al. Characteristics of bifunctional acidic endoglucanase (Cel5B) from *Gloeophyllum trabeum*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 7, p. 1081-1089, 2012.
- 182 MIOTTO, L. S. et al. The characterization of the endoglucanase Cel12A from *Gloeophyllum trabeum* reveals an enzyme highly active on  $\beta$ -Glucan. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e108393, 2014.

- 183 HASPER, A. A. et al. EglC, a New Endoglucanase from *Aspergillus niger* with major activity towards xyloglucan. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1556-1560, 2002.
- 184 VLASENKO, E. et al. Substrate specificity of family 5, 6, 7, 9, 12, and 45 endoglucanases. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2405-2411, 2010.
- 185 TUOHY, M. G. et al. Kinetic parameters and mode of action of the cellobiohydrolases produced by *Talaromyces emersonii*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1596, n. 2, p. 366-380, 2002.
- 186 WANG, J. et al. Real-time observation of the swelling and hydrolysis of a single crystalline cellulose fiber catalyzed by cellulase 7B from *Trichoderma reesei*. **Langmuir**, v. 28, n. 25, p. 9664-9672, 2012.
- 187 V VOUTILAINEN, S. P. et al. Improving the thermostability and activity of *Melanocarpus albomyces* cellobiohydrolase Cel7B. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, n. 2, p. 261-272, 2009.
- 188 COLUSSI, F. et al. Effect of pH and temperature on the global compactness, structure, and activity of cellobiohydrolase Cel7A from *Trichoderma harzianum*. **European Biophysical Journal**, v. 41, n. 1, p. 89-98, 2012.
- 189 LUO, X. L. et al. Effects of wet-pressing-induced fiber hornification on enzymatic saccharification of lignocelluloses. **Cellulose**, v. 18, n. 4, p. 1055-1062, 2011.
- 190 HALL, M. et al. Cellulose crystallinity--a key predictor of the enzymatic hydrolysis rate. **FEBS Journal**, v. 277, n. 6, p. 1571-1582, 2010.
- 191 VÄLJAMÄE, P. et al. Acid hydrolysis of bacterial cellulose reveals different modes of synergistic action between cellobiohydrolase I and endoglucanase I. **European Journal of Biochemistry**, v. 266, n. 2, p. 327-334, 1999.
- 192 WANG, J. et al. Direct in Situ observation of synergism between cellulolytic enzymes during the biodegradation of crystalline cellulose fibers. **Langmuir**, v. 29, n. 48, p. 14997-15005, 2013.
- 193 MACKENZIE, L. F. et al. Crystal structure of the family 7 endoglucanase I (Cel7B) from *humicola insolens* at 2.2 Å resolution and identification of the catalytic nucleophile by trapping of the covalent glycosyl-enzyme intermediate. **Biochemical Journal**, v. 335 pt 2, p. 409-416, 1998.
- 194 SULZENBACHER, G. et al. Structure of the *Fusarium oxysporum* endoglucanase I with a nonhydrolyzable substrate analogue: substrate distortion gives rise to the preferred axial orientation for the leaving group. **Biochemistry**, v. 35, n. 48, p. 15280-15287, 1996. I
- 195 DAVIES, G.; HENRISSAT, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure**, v. 3, n.9, p. 853-859, 1995. doi: 10.1016/S0969-2126(01)00220-9.

# Anexos





## Anexo I

Tabela 7 - Composição do meio de cultura CM (*Complete medium*)

Reagente	Concentração
<b>D-glicose</b>	10 g L <sup>-1</sup>
<b>Peptona</b>	2 g L <sup>-1</sup>
<b>Extrato de levedura</b>	1 g L <sup>-1</sup>
<b>Casamino ácida</b>	1 g L <sup>-1</sup>
<b>Uracila</b>	1,1 g L <sup>-1</sup>
<b>Solução 20 X de sais de nitrato</b>	5% (v v <sup>-1</sup> )
NaNO <sub>3</sub>	120 g L <sup>-1</sup>
KCl	10,4 g L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	16,3 g L <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20,9 g L <sup>-1</sup>
<b>Solução de vitaminas (100x)</b>	0,1% (v v <sup>-1</sup> )
Riboflavina	0,2 g L <sup>-1</sup>
Tiamina-HCl	0,2 g L <sup>-1</sup>
Nicotinamida	0,2 g L <sup>-1</sup>
Piridoxina-HCl	0,1 g L <sup>-1</sup>
Ácido pantotênico	0,02 g L <sup>-1</sup>
Biotina	0,0004 g L <sup>-1</sup>
<b>Solução de oligoelementos</b>	0,1% (v v <sup>-1</sup> )
ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	22 g L <sup>-1</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11 g L <sup>-1</sup>
FeSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	5 g L <sup>-1</sup>
CoCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O	1,7 g L <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub> -5H <sub>2</sub> O	1,6 g L <sup>-1</sup>
MnCl <sub>2</sub> -4H <sub>2</sub> O	5 g L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O	1,5 g L <sup>-1</sup>
EDTA	50
<b>Solução de uridina 100 mM</b>	1% (v v <sup>-1</sup> )
<b>Solução estoque de MgSO<sub>4</sub> 2,25 M</b>	0,5% (v v <sup>-1</sup> )

Fonte: Elaborada pela autora

**Tabela 8** - Composição do meio de cultura SRM (*Selective Regeneration Medium*)

Reagente	Concentração
<b>Sacarose</b>	340 g L <sup>-1</sup>
<b>Solução 1 (40X)</b>	2,5% (v v <sup>-1</sup> )
NaNO <sub>3</sub>	240 g L <sup>-1</sup>
KCl	20,8 g L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	60,8 g L <sup>-1</sup>
Solução de KOH 4M	4,5 % (v v <sup>-1</sup> )
<b>Ágar</b>	17,5 g L <sup>-1</sup>
<b>Solução de oligoelementos</b>	0,1% (v v <sup>-1</sup> )
ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	22 g L <sup>-1</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11 g L <sup>-1</sup>
FeSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	5 g L <sup>-1</sup>
CoCL <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O	1,7 g L <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub> -5H <sub>2</sub> O	1,6 g L <sup>-1</sup>
MnCl <sub>2</sub> -4H <sub>2</sub> O	5 g L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O	1,5 g L <sup>-1</sup>
EDTA	50
<b>Solução 2 (40X)</b>	2,5% (v v <sup>-1</sup> )
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	20,8 g L <sup>-1</sup>

Fonte: Elaborada pela autora.

**Tabela 9** - Composição do meio MM J

Reagente	Concentração
<b>D-maltose</b>	40 g L <sup>-1</sup>
<b>Solução 20 X de sais de nitrato</b>	5% (v v <sup>-1</sup> )
NaNO <sub>3</sub>	120 g L <sup>-1</sup>
KCl	10,4 g L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	16,3 g L <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	20,9 g L <sup>-1</sup>
<b>Solução estoque de MgSO<sub>4</sub> 2,25 M</b>	2 % (v v <sup>-1</sup> )
<b>Solução de oligoelementos</b>	0,1% (v v <sup>-1</sup> )
ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	22 g L <sup>-1</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11 g L <sup>-1</sup>
FeSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	5 g L <sup>-1</sup>
CoCL <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O	1,7 g L <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub> -5H <sub>2</sub> O	1,6 g L <sup>-1</sup>
MnCl <sub>2</sub> -4H <sub>2</sub> O	5 g L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O	1,5 g L <sup>-1</sup>
EDTA	50

Fonte: Elaborada pela autora



## Anexo II

### ✓ Patentes e registro referente ao período de doutoramento:

Igor Polikarpov; Vanessa O. A. Pellegrini; Viviane I. Serpa. **“Oligonucleotídeos para produção de endoglucanase, sequências para produção de endoglucanase, processo de obtenção de endoglucanase e usos da endoglucanase”**. Categoria: Produto e Processo. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: BR10201301080. Data de depósito: 02/05/2013.

### ✓ Publicações referentes ao período de doutoramento:

#### Artigos publicados

PELLEGRINI, V. O. A.; LEI, N.; KYASARAM, M.; OLSEN, J. P.; BADINO, S. F.; WINDAHL, M. S.; COLUSSI, F.; CRUYS-BAGGER, N.; BORCH, K.; WESTH, P. Reversibility of Substrate Adsorption for the Cellulases Cel7A, Cel6A, and Cel7B from *Hypocrea jecorina*. **Langmuir**, v. 30, n. 41, p. 12602-12609, 2014.

PELLEGRINI, V. O. A.; SERPA, V. I.; GODOY, A. S.; CAMILO, C. M.; BERNARDES, A.; REZENDE, C. A.; PEREIRA JUNIOR, N.; CAIRO, J. P. L. F.; SQUINA, F. M.; POLIKARPOV, I. Recombinant *Trichoderma harzianum* endoglucanase I (Cel7B) is a highly acidic and promiscuous carbohydrate-active enzyme **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 22, p. 9591-9604, 2015.

#### Artigo submetido para publicação

LIBERATO, M. V.; SILVEIRA, R. L.; PRATES, E. R.; ARAUJO, E. A.; PELLEGRINI, V. O. A.; CAMILO, C. M.; KADOWAKI, M. A.; OLIVEIRA NETO, M.; POPOV, A.; SKAF, M. S.; POLIKARPOV, I. **Molecular characterization of a family 5 glycoside hydrolase suggests an induced-fit enzymatic mechanism** – Este trabalho está submetido para Nature Scientific Reports e encontra-se em fase de revisão sugerida pela revista.

 **Artigos em fase de preparação**

PELLEGRINI, V. O. A.; BERNARDES, A.; SANTO, M. E.; REZENDE, C. A.; POLIKARPOV, I. **Synergism between endoglucanase I (*ThCel7B*) and cellobiohydrolase I (*ThCel7A*) from *Trichoderma harzianum* in the degradation of different substrates** – Este trabalho encontra-se em fase final de escrita.

SONODA, M. T.; PELLEGRINI, V. O. A.; GODOY, A. S.; KADOWAKI, M. A. S.; NASCIMENTO, A. S.; POLIKARPOV, I. **Structure and dynamics of endoglucanase I from *Trichoderma harzianum* suggest architecture adaptations for wide spectrum activity over hemicellulose** – Este trabalho encontra-se escrito e em fase correção com o orientador.

BERNARDES, A.; CURTOLO, F.; PELLEGRINI, V. O. A.; CAMILO, C. M.; MELLO, B. L.; GUIMARÃES, F. E. G.; POLIKARPOV, I. **Molecular mechanisms involved in the synergistic effect of carbohydrate binding modules in the substrates saccharification by celulasas** – Este trabalho encontra-se em fase final de escrita.