UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

MARIA LUIZA VOLTATÓDIO

Caracterização bioquímica e biofísica da Celobiohidrolase II do fungo
Trichoderma harzianum IOC3844 produzida por expressão homóloga

São Carlos

2012

MARIA LUIZA VOLTATÓDIO

Caracterização bioquímica e biofísica da Celobiohidrolase II do fungo *Trichoderma harzianum* IOC3844 produzida por expressão homóloga

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

Área de concentração: Física Aplicada

Opção: Física Biomolecular

Orientadora: Profa. Dra. Yvonne
Primerano Mascarenhas

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2012

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

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

Voltatódio, Maria Luiza
Caracterização bioquímica e biofísica da
celobiohidrolase II do fungo *Trichoderma harzianum*
IOC 3844 produzida por expressão homóloga / Maria
Luiza Voltatódio; orientadora Yvonne Primerano
Mascarenhas - versão corrigida -- São Carlos, 2012.
93 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física
de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2012.

1. *Trichoderma*. 2. Celulases. 3.
Celobiohidrolase. I. Mascarenhas, Yvonne Primerano ,
orient. II. Título.

*Dedico este trabalho ao meu maior exemplo,
minha mãe.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo eterno apoio e incentivo, por serem sempre compreensíveis com minhas ausências e por aguentarem minhas chatices, sempre me dando outra chance.

Às minhas irmãs, Fabiana e Denise, pelo companheirismo, pelas travessuras, pelos risos incontroláveis, enfim, por todos os momentos divididos, e mesmo que pudesse não as trocaria por nenhuma outra, mesmo com uns “pés de guerra” vez em quando.

Acredito que por algum motivo único as pessoas cruzam nosso caminho. Não à toa, um grupo de amigas se formou, cada uma vindo de um cantinho. Certamente Deus sabia que seriam tempos difíceis e nos deu umas as outras para que pudéssemos compartilhar nossas angustias, sonhos, lágrimas e alegrias, e claro, para que nunca nos sentíssemos sós. Talvez fosse possível sem vocês, mas com certeza teria sido mais difícil. Obrigada Aninha, Fran, Má, Rê e Vivi, por fazerem parte da minha vida e contribuírem para que me tornasse uma pessoa melhor e mais feliz.

À Lis e Flávio pelos gestos de amizade e momentos de descontração.

À Vanessa, que se tornou uma querida amiga.

As amigas Virginia e Vanessa, pela paciência comigo, por entenderem meus ‘descuidos’ com nossa amizade.

À todos que estiveram ao meu lado no laboratório, que de uma forma ou outra contribuíram, seja com uma palavra de incentivo, com um olhar carinhoso, ou sendo apenas companheiro, e não poderiam deixar de ser lembrados como: Amanda, Larissa, Juliana, Jaque, Daiana, Livia, Ivan, Caio, Bruno, Kelvin, Heline, Maycou, Marcos Michel, Bachega, César, Atilio, Jademilson, Simone, Tavin, Humberto, Victor, Fenanda Costa, Mamé, Gustavo, Fernanda Batista, Gabi, Leonardo e Camila.

Ao Luis Guilherme, pelas aulas de física e ensinamentos futebolísticos

Ao Alexander, que me fez ver que as vezes não é de um protocolo que precisamos, e por ser tão paciente sempre.

Ao amigo Kel, pela indicação, confiança e por estar presente quando eu mais preciso.

Aos docentes e funcionários do Instituto de Física de São Carlos, em especial aos que me deram apoio para desenvolver o trabalho: Susana, Maria, Prof. Títo, Prof Otavio, Prof. Ilana, Elizandra e Sandra.

À Livia M. e ao Mario por toda ajuda com a dissertação.

À Prof. Yvonne Mascarenhas, pela gentileza em me conceder a oportunidade para realizar esse trabalho.

Ao Prof. Igor Polikarpov pela orientação e confiança.

Ao LCLS e pesquisadores do CTBE pelo espaço cedido e discussões na realização de vários experimentos.

À Universidade de São Paulo (USP) e ao Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP), por oferecer toda estrutura necessária para desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES, CNPq e FAPESP pelo auxílio.

*A educação não muda o mundo. A educação
muda pessoas. Pessoas mudam o mundo.
Paulo Freire*

RESUMO

VOLTATÓDIO, M. L. **Caracterização bioquímica e biofísica da Celobiohidrolase II do fungo *Trichoderma harzianum* IOC3844 produzida por expressão homóloga.** 2012. 93 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

O esgotamento das reservas, especialmente do petróleo mais fino, aliado à crescente demanda energética e à necessidade inadiável de reduzir as emissões de carbono para a atmosfera, sinalizam para a necessidade da busca de novas fontes de energia renováveis e limpas. As preocupações com o aquecimento global têm feito crescer o interesse mundial pelos biocombustíveis. O novo conceito de biocombustíveis de segunda geração corresponde à produção de etanol combustível a partir de biomassa lignocelulósica como matéria-prima. No entanto, para tornar possível a utilização da biomassa é necessária a conversão das moléculas constituintes da parede celular em açúcares fermentáveis. A tecnologia mais promissora para a conversão dessa biomassa lignocelulósica à etanol combustível é com base na hidrólise enzimática da celulose usando celulasas. Alguns microrganismos como o fungo *Trichoderma* ssp. secretam um eficiente complexo enzimático de celulasas. Tendo as celobiohidrolases, elevada importância na hidrólise primária da celulose, o objetivo desse trabalho foi realizar a caracterização bioquímica e biofísica a celobiohidrolase II (CBHII) do complexo de celulasas do fungo filamentoso *Trichoderma harzianum* IOC 3844. A enzima depois de purificada mostrou uma melhor atividade contra o substrato *p*NPC a 60°C em pH 4,8. Estudos de eletroforese capilar mostraram apenas moléculas com uma unidade de glicose para um substrato simples inicial contendo 5 glicoses. Análises de dicroísmo circular mostraram um padrão de estrutura secundária predominante em alfa hélice, e na análise da estrutura terciária, o espectro de emissão da CBHII mostrou um comprimento de onda de fluorescência máxima a 333nm em pH5,0, indicando que os triptofanos estão parcialmente expostos ao solvente. Ensaio utilizando a técnica de espalhamento de luz a baixo ângulo, permitiram a geração de um modelo tridimensional o qual mostrou-se domínios globulares unidos por um *linker*, e as posições relativas entre eles, demonstrando grande similaridade com enzimas CBHII já descritas na literatura, e sendo assim, de grande interesse biotecnológico para hidrólises de biomassas.

Palavras-chaves: *Trichoderma*. Celulase. Celobiohidrolase.

ABSTRACT

VOLTATÓDIO, M. L. **Biochemical and biophysical characterization of cellobiohydrolase II from *Trichoderma harzianum* IOC 3844 produced by homologous expression.** 2012. 93 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

The depletion of reserves, especially of refined oil, with increased energy demands and the urgent need to reduce the carbon emissions on the atmosphere, signals the necessity to search for new sources of energy renewable and clean. Concerns about global warming have led to an increased world interest in biofuels. The new concept of second generation biofuels corresponds to fuel ethanol production from biomass lignocellulosic feedstock. However, to make possible the use of biomass is necessary the conversion of cell-wall molecules into fermentable sugars. The most promising technology for the conversion of lignocellulosic biomass to ethanol fuel is based on the enzymatic degradation of cellulose using cellulase. Some microorganisms such *Trichoderma ssp.* secretes an efficient enzymatic complex of cellulase. Since the cellobiohydrolases are highly importance in the primary hydrolysis of cellulose, the objective of this study was to perform the biochemical and biophysical characterization of cellobiohydrolase II (CBHII) present into the cellulase complex from the *Trichoderma harzianum* IOC 3844. The enzyme showed its better activity against pNPC at 60°C and pH 4,8. Capillary electrophoresis showed only glucose molecules as the final product of C5 oligosaccharide hydrolysis. Circular dichroism analysis showed a pattern of secondary structure mainly composed of alpha helix, and the tertiary structure analysis by the emission spectrum of the CBHII showed a wavelength of maximum fluorescence at 33nm at pH 5, indicating that the tryptophans are exposed to solvent. The three dimensional model generated by SAXS showed a structure with two globular domains joined by a *linker*, and the relative positions among them exhibited great similarity with CBHII described on the literature, and thus, presenting a great biotechnological interest for hydrolysis of biomass.

Keywords: *Trichoderma*. Cellulose. Cellobiohydrolase.

LISTA DE FIGURAS

figura 1 - Representação esquemática das moléculas de celulose, hemicelulose e lignina na parede celular das plantas. (fonte: www.genomics.energy.org)	26
Figura 2 - Modo de ação das celulasas em celulose cristalina.	34
Figura 3 - Processividade do substrato pela CBHII depois de liberar o dissacarídeo	36
Figura 4 - Placas de meio BDA com o fungo <i>T. harzianum</i> esporulado.	41
Figura 5 - Fermentador bioflo 110 (new brunswick) durante cultivo do fungo <i>T. harzianum</i> para expressão das celulasas.....	43
Figura 6 - Molécula do substrato <i>P</i> -NP-B-D-Cellobioside (PNPC).	48
Figura 7 - Substrato marcado com APTS cinco moléculas de glicose unidas por ligações β 1-4 (pentose).....	49
Figura 8 - Cinética enzimática durante os dias de cultivo..	54
Figura 9 - Cromatograma da coluna <i>Q-sepharose</i>	56
Figura 10 - SDS-PAGE (15% de poliacrilamida) com as frações correspondentes ao cromatograma mostrado na figura anterior	57
Figura 11 - Cromatograma da coluna <i>monoS</i> HR 5/5.	57
Figura 12 - SDS-PAGE das frações de proteínas separadas no cromatograma da coluna <i>monoS</i> HR 5/5.	58
Figura 13 - Cromatograma da coluna <i>phenyl sepharose</i>	58
figura 14 - SDS-PAGE (15% poliacrilamida) com a separação obtida da coluna de interação hidrofóbica	59
figura 15 - SDS-PAGE das proteínas separadas na <i>q-sepharose</i> em pH8.....	60
Figura 16 - Cromatograma da coluna deae-sepharose HP. eluição feita com gradiente em <i>steps</i>	61
Figura 17 - SDS-PAGE 15% de poliacrilamida com as frações da eluição com gradiente em <i>steps</i> na coluna deae-sepharose HP.	62
Figura 18 - Cromatograma da coluna <i>phenyl sepharose</i> HP.....	63
Figura 19 - SDS-PAGE 15% de poliacrilamida mostrando a banda de CBHII (seta preta) entre os marcadores de 66 e 45 kDa eluída na coluna <i>phenyl sepharose</i> HP.....	63
Figura 20 - Sequência de CBHII de <i>T. harzianum</i> com o peptídeo derivado da digestão com tripsina em negrito e sublinhado.	64
Figura 21 - Temperatura e pH ótimos para CBHII.....	65
Figura 22 - Espectro de eletroforese capilar. Hidrólise completa e incompleta para um substrato com C5.	67

Figura 23 - Efeito de uma amostra opticamente ativa absorvendo uma luz incidente linearmente polarizada. Os desenhos mostram o vetor campo elétrico visto ao longo da direção de propagação. (a) luz linearmente polarizada. (b) luz elipticamente polarizada produzida pela passagem da luz incidente através da amostra opticamente ativa. a seta vermelha representa a somatória da luz circularmente polarizada para a direita e da luz circularmente polarizada esquerda.	69
Figura 24 - Espectros de dicroísmo circular no UV distante.	70
Figura 25 - Espectro de dicroísmo circular da CBHII de <i>T. harzianum</i>	71
Figura 26 - Diagrama de Jablonski. Processo de criação de um estado eletrônico excitado por absorção óptica e subsequente emissão de fluorescência.	72
Figura 27 - Espectro de emissão de fluorescência da CBHII no comprimento de onda de excitação de 295nm variando o pH de 2 a 10.	73
Figura 28 - Sequência primária da proteína celobiohidrolase II de <i>T.harzianum</i>	74
Figura 29 - Sequência da CBHI de <i>T. harzianum</i>	75
Figura 30: Representação dos domínios conservados da CBHI e CBHII de <i>T. harzianum</i>	75
Figura 31 - Padrões de espalhamentos e $p(r)$ característicos de objetos geométricos com o mesmo D_{max} , figura extraída de svergun ⁷²	78
Figura 32 - Curva de espalhamento e $p(r)$. A) curva de espalhamento de CBHII de <i>T.harzianum</i> ($\ln i(q)$ vs q) . o inserto contém o gráfico de guinier ($\ln i(q)$ vs. q^2), o qual foi obtido o raio de giro. B) a função de distribuição de distancias para os dados experimentais de CBHII de <i>T.harzianum</i> . C) curva de espalhamento ($\ln i(q)$ vs q) (em preto) e resultados do ajuste com modelo <i>ab initio</i> gerado pelo programa dammin (em vermelho).	80
Figura 33 - Envelope tridimensional da proteína CBHII. Modelo obtido com o programa dammin (dummy átomos).	81
Figura 34 - Comparação entre as curvas de espalhamento e $p(r)$ para CBHI e CBHII.....	83
Figura 35 - Gráfico kratky de dados de espalhamento ilustrando mudanças no comportamento para uma partícula esférica.	84
Figura 36 - Gráfico de kratky. comparação dos perfis de Kratky para CBHI e CBHII de <i>T.harzianum</i>	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CBH	celobiohidrolase
CBM	domínio de ligação a celulose
BG	beta-glicosidase
CD	dicroísmo circular
CMC	carboximetil celulose
D _{max}	distância máxima
DAM	modelo de átomos <i>dummy</i>
DC	domínio catalítico
DCCR	delineamento composto central rotacional
DNS	ácido dinitrosalicílico
DTT	ditioteritol
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
EG	endoglucanase
EX	exoglucanase
FPLC	fast performance liquid chromatography
GH	glicosil hidrolase
GOD	glucose oxidase
HPLC	high performance liquid chromatography
MS	espectrometria de massa
NR	extremidade não redutora
R	extremidade redutora
R _g	raio de giro
SAXS	espalhamento de raios X a baixo ângulo
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polycrylamide gel electrophoresis
SAXS	espalhamento de raios X a baixo ângulo
ThCBH	celobiohidrolase de <i>Trichoderma harzianum</i>
TrCBH	celobiohidrolase de <i>Trichoderma reesei</i>
UV	ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

L	Litro
°C	graus Celsius
mL	Mililitro
rpm	rotação por minuto
min	Minuto
hs	Horas
Da	Dalton
M	Molar
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
nm	Nanômetro
λ	comprimento de onda
Å	Angstrom
pH	potencial hidrogeniônico
CO ₂	Dióxido de carbono

SUMÁRIO

1 Introdução	25
1.1 Biomassa	26
1.2 Hidrólise da biomassa	27
1.3 Fungo filamentoso.....	29
1.4 Celulases	31
1.5 Aplicação industrial das celulases.....	37
2 Justificativa e Objetivos	39
3 Materiais e Métodos	41
3.1 Cultivo do fungo <i>Trichoderma harzianum</i> IOC 3844	41
3.2 Pré-inóculo e Meio de Cultura	41
3.3 Determinação da atividade enzimática em diferentes substratos	42
3.4 Expressão das celulases.....	43
3.5 Determinação do perfil de proteínas totais secretadas pelo fungo (SDS-PAGE).....	44
3.6 Purificação.....	45
3.7 Identificação da proteína por espectrometria de massas	46
3.8 Determinação das condições ótimas de atividade quanto ao pH e a temperatura por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para CBHII.....	47
3.9 Eletroforese Capilar.....	49
3.10 Dicroísmo circular (CD).....	50
3.11 Espectroscopia de Emissão de Fluorescência	51
3.12 Estudos estruturais da CBH II utilizando Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)...	51
4 Resultados e Discussão	53
4.1 Determinação do tempo de cultivo.....	53
4.2 Purificação	55
4.2.1 Tentativas de purificação da CBHII de <i>Trichoderma harzianum</i>	55
4.3 Espectrometria de Massa.....	64
4.4 Determinação das condições ótimas de pH e temperatura para a atividade da enzima CBHII...	65
4.5 Eletroforese Capilar.....	66

4.6 Dicroísmo circular e espectroscopia de emissão de fluorescência	68
4.7 Alinhamento das sequências de CBHI e CBHII de <i>Trichoderma harzianum</i>	74
4.8 SAXS.....	75
4.8.1 SAXS de CBHII de <i>T. harzianum</i>	76
4.8.2 Comparação entre as celobiohidrolases I e II de <i>T. harzianum</i>	82
REFERÊNCIAS	87

1 Introdução

Ao longo dos anos, o uso da energia não renovável possibilitou importantes avanços e conquistas imprescindíveis para a humanidade. A autossuficiência energética é tida como pré-requisito fundamental para a segurança de uma nação. Por exemplo, a crise do petróleo deflagrada na década de 70 acarretou prejuízos marcantes à economia global devido à vaidade e onipotência dos dirigentes de nações produtoras de petróleo localizadas no Oriente Médio. Além disso, o emprego desse tipo de recurso energético tem contribuído para alterações climáticas de forma irreversível.

O esgotamento das reservas, especialmente do petróleo mais fino, aliado à crescente demanda energética e à necessidade inadiável de reduzir as emissões de carbono para a atmosfera, sinaliza para a necessidade da busca de novas fontes de energia, como a adoção de fontes energéticas renováveis e limpas¹. Há três formas básicas de combate ao efeito estufa: *Sequestro e contenção de dióxido de carbono* (CO₂) e de outros gases de efeito estufa, que consiste na captação desses gases na atmosfera ou no local de sua emissão, o que não parece, até agora, economicamente viável; *Conservação*, uma opção certamente muito conveniente, mas inviável em grande escala visto as condições dinâmicas da sociedade atual, mas possível certamente, como medida parcial; e por fim a *Substituição por combustível alternativo renovável* a partir de biomassa. Os únicos energéticos limpos capazes de substituir adequadamente os derivados de petróleo são aqueles obtidos a partir de biomassa. Isso ocorre porque a biomassa seca contém cerca de metade da quantidade de energia contida na mesma massa de petróleo².

As preocupações com o aquecimento global têm feito crescer o interesse mundial pelos biocombustíveis, bem como a busca por alternativas aos combustíveis fósseis³. A população mundial continua crescendo, estimando que até 2050 a população chegue a 9,4 bilhões de pessoas, e junto com esse crescimento a demanda por alimentos, energia e combustíveis também aumentará, tornando as limitações ainda mais evidentes⁴. Uma das alternativas para amenizar esses problemas seria uma maior produção e utilização de biocombustíveis de segunda geração, como o etanol celulósico.

1.1 Biomassa

Biocombustíveis de segunda geração correspondem àqueles produzidos utilizando biomassas lignocelulósicas como matéria-prima, como por exemplo, o etanol. Essas matérias-primas são provenientes de resíduos agroindustriais como o sabugo e palha de milho, o bagaço da cana-de-açúcar⁵, caule e cascas, resíduos sólidos urbanos (papel e papelão, lixo de jardim) e da indústria de papel e celulose. A celulose é o principal componente desses materiais, mas o substrato lignocelulósico também é formado por outros dois polímeros a hemicelulose e a lignina⁶ (figura 1).

Figura 1 - Representação esquemática das moléculas de celulose, hemicelulose e lignina na parede celular das plantas. (fonte: www.genomics.energy.org)

A energia solar recebida pela superfície da Terra é muito maior que a necessária para suprir as necessidades humanas atuais, sendo que a quantidade de energia solar estocada na forma de carbono através da fotossíntese é 10 vezes maior que o gasto energético mundial⁷, com uma biossíntese anual estimada em 10^{11} toneladas⁸.

A celulose é o biopolímero renovável mais abundante na Terra⁹, sendo constantemente ressintetizada pela fotossíntese⁸. A celulose é o principal polímero constituinte da parede celular das plantas, representando cerca de 35-50% do peso seco dos tecidos vegetais, variando de acordo com o tipo de célula e a maturidade da planta¹⁰. Este polímero linear é formado por subunidades de D-glicose, unidas por ligações glicosídicas β -1,4, formando longas cadeias chamadas de fibras, que são unidas entre si por pontes de hidrogênio e forças de Van der Waals, formando unidades maiores. Essa cadeia linear é constituída de forma que cada resíduo de glicose fique invertido 180° em relação ao resíduo de glicose vizinho, portanto é a celobiose, e não a glicose, a unidade básica de repetição da celulose¹¹, como demonstra a Figura 1.

A hemicelulose é um polissacarídeo complexo que está associado a celulose e a lignina. Ela também é composta por uma longa cadeia de moléculas de açúcares, mas contém, além de hexose, pentoses, tendo a xilose como a pentose predominante, sendo então constituída por uma mistura de polissacarídeos^{12;13}. Já a lignina é uma macromolécula, ramificada e amorfa, constituída predominantemente de compostos aromáticos com cadeia altamente irregular, e tem como função primária promover o suporte estrutural da planta e envolver as moléculas de celulose e hemicelulose tornando-as de difícil acesso^{12; 14}.

Os materiais lignocelulósicos são compostos além desses três polímeros principais, por uma grande variedade de grupos químicos orgânicos de baixa massa molecular, como por exemplos: ácidos graxos, ceras, alcaloides, proteínas, fenólicos, pectinas, gomas, resinas, amido, glicosídeos, óleos essenciais¹³.

Quando a estrutura da biomassa ainda está íntegra, representa um obstáculo à ação de microrganismos, os quais não são capazes de assimilar agregados moleculares deste tamanho. As soluções para a degradação deste material estão sendo estudados, procurando encontrar uma série de formas para desestruturar esses compostos e torna-los acessíveis ao processo de transformação.

1.2 Hidrólise da biomassa

O Brasil, graças à sua variada atividade industrial e agrícola, possui uma grande variedade de resíduos agroindustriais cujo bioprocessamento seria de grande interesse econômico e social, entre eles tem-se: as indústrias de papel e celulose (sepilho, maravalhas e cavacos desclassificados de eucalipto e pinus), serrarias (serragem), usinas de açúcar e álcool (bagaço de cana-de-açúcar) e, de um modo geral, unidades de produção agrícola geradoras de resíduos de culturas, como a palha de cereais, de milho, de trigo, sabugo de milho, cascas de arroz e de aveia, dentre outros ¹⁵. Somando tudo isso obtém-se aproximadamente 350 milhões de toneladas, com capacidade de produção de 147 milhões de toneladas de açúcares (sacarose e glicose), gerando um potencial de 92 bilhões de litros de etanol produzidos. Se considerarmos as eficiências de hidrólise e fermentação, a capacidade de produção de etanol é de aproximadamente 60 bilhões de litros^{16; 17}. A utilização destes resíduos em bioprocessos, além de uma alternativa para obtenção de energia com base em matéria orgânica renovável (biomassa), é uma ajuda para solucionar o problema da poluição ambiental.

A conversão enzimática de celulose em glicose está longe de ser simples devido à natureza física do substrato ¹⁸. Para que ocorra a conversão enzimática da celulose em glicose é necessário que, primeiro a fase lignocelulósica seja pré-tratada para a remoção da lignina, deixando a porção celulósica exposta para ação das celulasas. Esse pré-tratamento altera a composição e quebra a matriz lignocelulósica, retirando impedimentos estruturais. Há várias técnicas de pré-tratamentos que incluem processos físicos, químicos, mecânicos e biológicos e suas combinações¹³.

A sacarificação da celulose pode ser realizada de duas principais formas: por tratamento químico (hidrólise ácida) ou hidrólise enzimática¹⁹.

A hidrólise ácida pode ser feita com ácido concentrado ou diluído. O processo com ácido diluído envolve alta temperatura e pressão, possui tempo de reação de segundos a minutos, facilitando processos contínuos. Um exemplo é a utilização de ácido sulfúrico 1% (v/v), com 13 segundos de reação a 237°C, que converte cerca da metade do polissacarídeo em glicose. Esse processo se mostra limitado, pois ocorrem dois tipos de reação durante a hidrólise, sendo que na primeira a celulose é convertida a açúcares solúveis, e na segunda, esses açúcares são convertidos em outras moléculas. A sua grande vantagem é a alta taxa de reação, mas com a desvantagem de baixo rendimento em açúcares^{12; 20}.

O processo com ácido concentrado usa temperaturas mais brandas, e somente a pressão é envolvida. Também ocorre em duas etapas que duram de uma a quatro horas cada.

Utilizam-se concentrações crescentes de ácidos, de 30 a 40% na primeira etapa e de 70% na segunda. No final da segunda etapa tem-se 90% de açúcares recuperados, sendo essa uma grande vantagem. Entretanto, caso não se tenha um cuidado rígido no controle das condições, outros produtos químicos, que são potenciais tóxicos aos microrganismos, como furfurais, podem se formar, prejudicando a etapa seguinte, que é a fermentação^{12; 20}.

A utilização de celulasas na hidrólise da celulose ocorre em condições mais suaves de pressão, temperatura e pH em relação aos processos químicos. Como exibe elevada especificidade, essa técnica elimina a chance de ocorrência de substâncias tóxicas, como furfurais, não acarretando problemas às células microbianas que serão utilizadas para fermentação dos açúcares solúveis. Essas enzimas são hidrolases que clivam ligações *O*-glicosídicas²⁰ e trata-se de um complexo de enzimas¹⁷. Todo organismo que degrada celulose cristalina secreta um sistema de celulasas. Esses sistemas são compostos de uma variedade de enzimas com diferentes especificidade e modo de ação, atuando em sinergismo para quebra da celulose, criando sítios acessíveis umas para as outras e diminuindo problemas de inibição pelos produtos da hidrólise^{18; 21}. Na hidrólise enzimática, embora o custo de produção dos biocatalisadores ainda seja alto, são detectados pontos de economia no processo, tanto do ponto de vista energético, já que ocorre em condições mais brandas de temperatura e pressão, como metalúrgico, não sendo necessários equipamentos confeccionados com materiais nobres, resistentes a ácidos.

1.3 Fungo filamentoso

Os fungos, juntamente com as bactérias heterotróficas, são os principais decompositores da biosfera, quebrando matéria orgânica e reciclando elementos químicos. Muitos fungos atacam organismos vivos e alguns são agentes causadores de doenças em plantas. Muitos deles são economicamente importantes para o homem, destacando-se nas áreas médica, fitopatológica e como produtores de metabólitos. Sua importância econômica está diretamente relacionada ao interesse comercial na produção de antibióticos pelas indústrias farmacêuticas, na produção de queijos, pães e vinhos, pela indústria de alimentos e

vem ganhando cada vez mais espaço na indústria biotecnológica em processos fermentativos e na produção de celulases²².

Os fungos filamentosos constituem um grupo de organismos multicelulares eucariotos típicos. São organismos aclorofilados que produzem esporos. Eles secretam enzimas digestivas no substrato onde crescem, quebrando grandes moléculas em moléculas suficientemente menores para serem absorvidas pela célula fúngica, nutrindo-se dessa forma por absorção. Muitas dessas enzimas que eles secretam são responsáveis pela decomposição de restos de plantas e animais, tornando possível a reciclagem de elementos químicos. Reproduzem-se assexuada e sexuadamente, cujas estruturas somáticas filamentosas, conhecidas como hifas, são rodeadas por paredes celulares²³. As hifas são estruturas microscópicas tubulares, ramificadas e septadas de crescimento apical²⁴. Elas se agrupam formando colônias macroscópicas, chamada micélio. Dentro da colônia ocorre diferenciação na função do micélio, enquanto a parte vegetativa penetra no substrato para conseguir nutrientes, o micélio aéreo projeta-se para o exterior da colônia para produzir estruturas reprodutivas²⁴. Além dos fungos filamentosos estarem associados à matéria orgânica em decomposição, participando dos ciclos naturais reciclando carbono e outros elementos, também estão presentes como patógenos oportunistas em plantas e animais²⁴.

Os ascomicetos que compreendem cerca de 32.300 espécies descritas incluem fungos economicamente importantes, como os bolores que estragam os alimentos. Com exceção das leveduras unicelulares, os ascomicetos têm formas filamentosas, e em geral suas hifas têm septos perfurados, permitindo que o citoplasma e os núcleos se movimentem de uma célula para outra.

Na maioria das espécies dessa classe a reprodução assexuada é feita por meio de fissão binária, fragmentação ou com a formação de conídios, a partir de células conidiogênicas que nascem no ápice das hifas modificadas, chamada conidióforos, produzindo esporos (conídios) externamente, e não dentro de esporângios como nos zigomicetos. Uma mesma espécie de fungo pode produzir um ou mais tipos de esporos, que nessa fase assexuada são conhecidos como anamorfos²³

A reprodução sexuada sempre envolve a formação de um asco, estrutura que dá nome a classe, e tem o formato de um saco, onde dentro dele serão formados os ascósporos haploides. A formação dos ascos ocorre dentro de um corpo frutífero que é composto de hifas entrelaçadas e firmemente compactadas. Durante a maturidade do fungo os ascos se rompem e liberam os ascósporos, que nessa fase sexual se conhece como teleomorfos²⁴.

O gênero *Trichoderma* inclui fungos cosmopolitas capazes de colonizar diferentes substratos e com diversas condições ambientais. Um dos mais significantes nichos ecológicos ocupados pelas espécies de *Trichoderma* é a rizosfera, a qual é colonizada efetivamente devido à capacidade destes fungos em interagirem com a planta e com outros organismos do solo. Como agente de biocontrole, pode proteger plantas contra patógenos de solo^{25; 26} e promover crescimento de plantas²⁷, através de um fator que regula o crescimento e germinação de sementes. Esse gênero tem sido estudado extensivamente como fonte potencial de celulasas²⁸.

Em *Trichoderma harzianum* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae) observa-se macroscopicamente, a formação de colônias concêntricas de bordas irregulares, notando-se um crescimento de cor branca nos primeiros dias e posteriormente formam-se os esporos de cor amarela ou verde. É um fungo de crescimento rápido sobre diferentes substratos uma característica importante da esporulação para esse fungo é a produção de estruturas de resistência, denominadas clamidiósporos²⁴.

Na área industrial algumas espécies de *Trichoderma* têm sido largamente utilizadas na produção de celulasas. De modo geral, isolados de *T. harzianum* têm tido destaque nestas formulações, embora outras espécies afins possam também fazer parte de todo o processo de produção²⁹.

1.4 Celulasas

As enzimas produzidas por microrganismos que hidrolisam, de forma eficiente, oligos e polissacarídeos podem ser classificadas de acordo com alguns critérios, baseado na especificidade ao substrato, na similaridade da sequência de aminoácidos e no seu modo de ação.

As glicosil hidrolases (GHs) fazem parte de um grande grupo de enzimas que realizam a hidrólise entre dois ou mais carboidratos. Com base na especificidade ao substrato essas enzimas podem ser classificadas com critérios estabelecidos pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (*International Union of biochemistry and molecular biology*

– IUBMB). De acordo com a IUBMB cada enzima recebe um código denominado ‘EC number’ (*enzyme Commission number*), que são representadas dessa forma: EC 3.2.1.x, onde x representa o substrato, mas também pode representar em alguns casos o mecanismo molecular ou o tipo de ligação entre as moléculas. Esse sistema de classificação é bem simples, e uma das razões é porque ele não leva em conta as características estruturais da enzima. Dessa maneira, enzimas que atuam sobre substratos similares podem ser incluídas numa mesma classe, sem considerar outras características, mas é pouco eficiente para enzimas que atuam sobre vários substratos, como as GHs que agem sobre polissacarídeos complexos presentes na natureza, e que exibem uma ampla gama de substratos.

Com um modo de classificação pouco eficiente, surgiu a necessidade de um segundo critério para classificar as GHs, o que foi sugerido por Henrissat em 1991³⁰. Assim as GHs começaram a ser classificadas dentro de famílias, de acordo com a similaridade de sequências de aminoácidos e conformação estrutural, mantendo as GHs com domínios conservados e semelhança estrutural dentro de uma mesma família. Utilizando esse método de classificação, foram definidas 130 famílias diferentes, que estão disponíveis no CAZy (*Carbohydrate-Active EnZymes*). Visto que as estruturas tridimensionais das proteínas são mais conservadas do que suas sequências de aminoácidos, as famílias são agrupadas em ‘clans’. Atualmente existem 14 clans de famílias de GHs, que vai de GH-A a GH-N, sendo a GH-A a maior delas, com 19 famílias agrupadas.

As enzimas do complexo celulolítico, expressas por fungos têm sido tradicionalmente classificadas em três grandes grupos, de acordo com seu modo de ação catalítico, e mais recentemente com suas propriedades estruturais. Dessa forma são encontrados três tipos principais divididos com base na atividade enzimática: as **Endoglucanases**, **Exoglucanases** (celobiohidrolases) e **β -glicosidases**^{10; 19; 31; 32}.

○ Endoglucanases (EG)

As Endoglucanases (EC 3.2.1.4) são as enzimas responsáveis pelo início da hidrólise, elas clivam a cadeia de forma randômica em regiões amorfas da celulose, liberando oligossacarídeos de vários graus de polimerização e novos terminais, sendo um redutor e outro não redutor^{20; 33}.

- Exoglucanases (Ex)

O grupo das exoglucanases é formado pelas celobiohidrolases (CBHs) e pela glucano-hidrolases (GHs). As exoglucanases atuam de maneira progressiva sobre os terminais redutor e não redutor, da fibra celulósica, liberando celobiose pelas CBHs e glicose pelas GHs como seus principais produtos¹⁰. Um exemplo é a GH 1,4-β-D-glucano-glucano-hidrolase (EC 3.2.1.74) que apesar de pouco relatada desempenha um importante papel na hidrólise da celulose, pois é capaz de liberar glicose diretamente do polímero e celobiose muito lentamente¹⁹ (Cazy: <http://www.cazy.org/>). De acordo com Lynd et al. (2002)³⁴ as exoglucanases possivelmente também podem atuar de forma a ‘descamar’ a estrutura da celulose microcristalina. As CBHs ainda podem ser divididas em dois tipos: enzimas do tipo I (CBHs I) que atuam na extremidade redutora (R) da cadeia de celulose, enquanto que as enzimas do tipo II (CBHs II) clivam na extremidade não redutora (NR). Essas enzimas geralmente são inibidas por celobiose, ou seja, sofrem inibição pelo seu próprio produto de hidrólise²⁰.

- β-glicosidases (BG)

As β-glicosidases formam um importante grupo, elas são responsáveis pela hidrólise de celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose. Essas enzimas são geralmente responsáveis pela regulação do processo de hidrólise da celulose, atuando como fator limitante na velocidade durante a hidrólise enzimática. Assim ela não somente produz glicose como também reduz a inibição das celobiohidrolases pela celobiose, dando maior eficiência a todo processo⁶.

Esses três tipos de enzimas do complexo celulolítico, separadamente, não hidrolisam de forma eficiente o substrato celulósico, sendo necessária uma ação de forma sinérgica (figura 2) das três enzimas, dessa forma consegue-se um melhor rendimento do que a soma dos rendimentos das enzimas atuando individualmente^{10; 17}.

São conhecidos pelo menos três principais tipos de sinergismo:

- Sinergia EG-Ex: onde a endoglucanase atua nas regiões amorfas da fibra, disponibilizando terminais redutores e não redutores para ação das CBHs;
- Sinergia Ex-Ex: As CBH I e CBH II atuam simultaneamente na hidrólise dos terminais redutores e não redutores liberados por ação da endoglucanase;
- Sinergias Ex-BG e EG-BG: como seus produtos de hidrólise, a celobiohidrolase e a endoglucanase liberam celobiose e oligossacarídeos, respectivamente, que são substratos para a β -glicosidase.

Figura 2 - Modo de ação das celulasas em celulose cristalina. Figura extraída de Castro, 2010¹⁹.

As duas celobiohidrolases de *Trichoderma reesei* parecem ser complementares em alguns aspectos. Há também dados estruturais para o formato especial do túnel do sítio catalítico da CBHI e CBHII que estão envolvidos em diferentes interações. Uma característica que é encontrada nas celobiohidrolases, bem como em muitas outras celulasas de fungos e bactérias, é a estrutura modular das enzimas, exibindo dois domínios. Um pequeno domínio de ligação a celulose (CBD) e um domínio catalítico (DC) maior, que são unidos por um *linker* de aminoácidos glicosilado³⁵⁻³⁸. Até hoje tem sido impossível cristalizar uma celulasase inteira, com DC, CBD e o *linker*, e uma vez que estes domínios podem ser separados por ação proteolítica e manipulação gênica, alguns desses domínios têm resultado em cristais adequados para análise por difração de raios X. Estruturas tridimensionais de CBHI e CBHII foram determinadas por difração de raios X e constatou-se que ambas CBHs têm uma longa região de túnel fechado, onde estão localizados os sítios ativos. Pesquisas com CBHs de

T.reesei mostraram que o sítio catalítico da CBHII é menor e o *linker* maior, em comparação com a CBHI³⁶.

O mecanismo de reação da hidrólise pode ocorrer por inversão ou retenção da configuração do anômero C2 do anel glicosídico envolvendo um doador de prótons e um nucleófilo. Para as duas formas o doador de prótons fica próximo ao oxigênio glicosídico, e o nucleófilo fica na posição vicinal ao carbono 2 do anel. A diferença do mecanismo de inversão é que a distância do nucleófilo é de 4,5Å maior que o de retenção, comportando assim uma molécula de água. O ataque nucleófilo é feito por dois resíduos aproximando-os pelo lado da ligação glicosídica, e há a retenção ou inversão da configuração anomérica do anel glicosídico³⁷.

O sítio ativo estendido da CBHII pode acomodar seis unidades de glicose³⁸. Essas enzimas apresentam seu mecanismo catalítico dentro de um túnel fechado mantendo preso uma única cadeia de polissacarídeos destacada da superfície cristalina, que através de numerosos eventos catalíticos chamada de reação possessiva, impede que a cadeia de polissacarídeo perca-se no meio cristalino novamente. A figura 3 mostra o mecanismo de processividade da cadeia de polissacarídeo³⁹.

Figura 3 - Processividade do substrato pela CBHII. Depois de liberar o dissacarídeo, a extremidade não redutora da cadeia de celulose deve deslizar através do túnel catalítico de forma que os próximos resíduos 2 e 1 com o oxigênio glicosídicos, sejam apresentados corretamente ao aminoácido catalítico³⁹.

O túnel do sítio ativo da CBHII de *Trichoderma reesei* contém quatro sítios de ligação glicosil definidos estruturalmente, chamados de -2 a +2. O terminal não redutor da cadeia de celulose se liga ao subsítio -2, que precisa ser ocupado para que ocorra a hidrólise. Em geral a catálise ácida ocorre entre os subsítios -1 e +1 com a inversão da configuração do carbono anomérico⁴⁰.

1.5 Aplicação industrial das celulasas

A produção em escala industrial das celulasas começou no final da década de 80 sendo utilizada como aditivo em ração animal, em seguida, ganhou outras aplicações nas indústrias de alimentos, têxteis, de bebida, polpa e papel¹⁹. Atualmente essas enzimas são usadas comumente em muitas aplicações industriais e a demanda por enzimas mais estáveis, altamente ativas e específicas vem crescendo rapidamente⁴¹. Durante as duas últimas décadas o uso dessas enzimas tem crescido consideravelmente, chegando as celulasas, juntamente com as hemicelulasas, a representar atualmente, mais de 20% do mercado mundial⁴².

Na indústria alimentícia as enzimas são adicionadas em sopas, cereais e vegetais desidratados para aumentar a reidratação quando chegam aos consumidores. Também são usadas na fabricação de pães, biscoitos e bolos, para melhorar a textura e permitir uma melhor distribuição de aromas²⁰. Na indústria de bebidas elas são usadas na produção de vinhos, melhorando a maceração das cascas das uvas, aumentando sua qualidade, estabilidade e aroma. Em sucos de frutas são usadas de forma a promover uma hidrólise parcial de componentes da parede celular, diminuindo a viscosidade e contribuindo para o melhoramento das propriedades sensoriais, liberando componentes voláteis. O uso de celulasas em sucos de frutas reduz a geração de resíduo e aumenta a conversão das frutas em sucos²⁰. O uso de celulasas na ração animal faz com que a digestibilidade aumente, uma vez que elas atuam sinergisticamente com as proteínas naturais do sistema digestivo dos animais, aumentando o valor nutricional dos alimentos. Na indústria têxtil essas enzimas são usadas em diversos processos de forma a dar melhor acabamento às peças. Nesse mesmo contexto, sabões em pó adicionados de celulasas são usados durante a lavagem para aumentar o brilho das cores, remover sujeira das fibras de algodão, aumentar a maciez e amenizar o desgaste dos tecidos. Misturadas a hemicelulasas, tais enzimas são usadas na indústria de polpa e papel para uma modificação controlada de propriedades mecânicas da polpa, hidrólise parcial de carboidratos, liberação das tintas da fibra a ser reciclada e também na completa hidrólise das fibras das polpas^{20; 41}.

As celulasas, tanto em misturas como isoladamente, têm uma vasta gama de aplicações em potencial sendo investigadas por pesquisas. Em 2005 o total de importações brasileiras no mercado de enzimas foi de US\$ 95,7 milhões enquanto que as exportações

foram de US\$ 5,4 milhões, indicando uma grande desvantagem na produção e uso das enzimas no país. Assim, a utilização de bagaço de cana-de-açúcar na produção destas enzimas se torna uma alternativa para as indústrias de biotecnologia para produzirem enzimas com custo mais barato, além de agregar valor a estes resíduos e contribuir com a limpeza do meio ambiente⁴².

2 Justificativa e Objetivos

O petróleo, o carvão mineral e o gás natural juntos representam cerca de 55% do consumo energético mundial. Diante da falta de perspectivas futuras na exploração do petróleo, bem como os danos causados ao meio ambiente devido à utilização dos combustíveis fósseis, principal fonte de gases causadores das mudanças climáticas e o aquecimento global, estudos com o objetivo encontrar e desenvolver substitutos para esse tipo de combustível tornam-se cada vez mais importantes. Dessa forma, a produção de energia limpa a partir de matérias orgânicas renováveis, como biomassas lignocelulósicas, mostra-se a alternativa mais sustentável e racional.

A tecnologia mais promissora para a conversão dessa biomassa lignocelulósica à etanol combustível tem como princípio a hidrólise enzimática da celulose usando celulasas⁴³. No entanto, o custo da conversão enzimática dessa biomassa pré-tratada em açúcares fermentáveis ainda é um grande gargalo para a produção de biocombustíveis⁴⁴. Com isso, trabalhos com um enfoque como apresentado nesta dissertação são cada vez mais necessários para o entendimento e consequente melhoramento da atividade de microrganismos capazes de degradar material celulósico, pretendendo-se dessa forma contribuir para otimizar a produção de etanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar.

Sendo as Celobiohidrolases, enzimas de elevada importância na hidrólise primária da fibra de celulose, o objetivo geral desse trabalho consiste na caracterização bioquímica e biofísica da CBHII do complexo de celulasas do fungo filamentoso *Trichoderma harzianum* IOC 3844, tendo em vista contribuir dessa forma para otimização do processo de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.

Os objetivos específicos foram:

- Identificar e purificar a celobiohidrolase II;
- Determinar as condições ótimas para atividades;
- Caracterização da CBHII através de técnicas bioquímicas (SDS-PAGE), e biofísicas (dicroísmo circular, espectroscopia de fluorescência, espalhamento de raios X a baixo ângulo).

3 Materiais e Métodos

3.1 Cultivo do fungo *Trichoderma harzianum* IOC 3844

A cepa de *T. harzianum* IOC 3844, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Nei Pereira Jr. (EQ/UFRJ), foi crescida em placas de petri (Difco Laboratories, USA), com meio de cultura preparado com 200g batata (*Solanum tuberosum*) l⁻¹ adquiridas no mercado, 15g glicose l⁻¹ e 12g Agar l⁻¹, em estufa a 28°C por sete dias (figura 4) e posteriormente as placas foram mantidas a 4°C. Para o inóculo, os esporos foram ressuspensos em solução salina (NaCl 0,9%) e a contagem do número de esporos foi realizada em câmara hematocitométrica de Neubauer (Neubauer Improved Chamber). Os esporos não inoculados foram guardados em freezer -80°C com 20% (v/v) glicerol.

Figura 4 - Placas de meio BDA com o fungo *T. harzianum* esporulado.

3.2 Pré-inóculo e Meio de Cultura

Os meios utilizados para inóculo e pré-inóculo foram adaptados de Mandels (1969)⁴⁵, os quais contêm: 0.3 g Uréia l⁻¹; 2.0 g KH₂PO₄ l⁻¹; 1.4 g (NH₄)₂SO₄ l⁻¹; 0.4 g CaCl₂ · 2H₂O l⁻¹; 0.3 g MgSO₄ · 7H₂O l⁻¹; 0.6 g Extrato de levedura l⁻¹; 5.0 mg FeSO₄ · 7H₂O l⁻¹; 1.6 mg MnSO₄ · 4H₂O l⁻¹; 1.4 mg ZnSO₄ · 7H₂O l⁻¹; 2.0 mg CoCl₂ · 6H₂O l⁻¹. Para o

crescimento celular foi inoculado usando-se uma solução de 10^6 esporos/mL em um pré-inóculo com 10g l^{-1} de glicose e mantidos a 28°C com agitação (200 rpm) por dois dias.

3.3 Determinação da atividade enzimática em diferentes substratos

Para a determinação do tempo de cultivo testes de atividades enzimáticas CMCase, β -glicosidase e FPase, utilizando como substratos, carboximetilcelulose (CMC), celobiose e papel filtro, respectivamente, foram feitos para estipular o melhor dia para interrupção.

Atividade CMCase foi determinada utilizando CMC (derivado de celulose, com características de celulose amorfa e ramificada, formada pela substituição parcial dos grupos hidroxilas por grupos carboximetil: $-\text{CH}_2-\text{COOH}$) 1% preparada em solução tampão em pH5. A Reação com $50\mu\text{L}$ de substrato mais $50\mu\text{L}$ do extrato enzimático foi incubado a 50°C por 15 minutos. Após esse tempo a reação foi interrompida com adição de ácido dinitrosalicílico (DNS) e incubada a 95°C por 15 minutos. O DNS conferiu uma cor característica para a reação, e posteriormente foram lidas a 540nm em um espectrofotômetro (Multiskan Spectrum – Thermo Scientific).

Para os testes de β -glicosidase foi utilizado como substrato celobiose 2% preparada em solução tampão com pH5. A mistura de $50\mu\text{L}$ de substrato mais $50\mu\text{L}$ do extrato enzimático, ocorreu a 50°C por 15 minutos. Logo depois a reação foi paralisada em banho fervente (10 minutos). Em seguida foi adicionado a reação 1mL de reagente GOD (glucose-oxidase-peroxidase – Kit GOD) e incubada a 37°C por 15 minutos. Neste passo também é adicionado uma amostra de glicose padrão, componente do kit. As amostras foram medidas a 505nm em espectrofotômetro.

Testes FPase, foi realizado com o uso de papel filtro (whatman 1) com diâmetro de 7mm . Em uma placa de PCR contendo um disco de papel filtro por poço, foi adicionado $20\mu\text{L}$ de extrato enzimático mais $40\mu\text{L}$ de solução tampão em pH5. A reação foi incubada por 60 minutos a 50°C . Em seguida foi adicionado $120\mu\text{L}$ de DNS e incubadas por mais 15 minutos a 95°C . As amostras foram lidas em um espectrofotômetro a 540nm .

3.4 Expressão das celulases

Para a produção das celulases, meio de cultura Mandels contendo 10g Avicel l⁻¹ foi inoculado com 10% (v/v) do pré-inóculo em um fermentador de 7,5 L (Bioflo 115-New Brunswick Scientific Co., EUA) (Figura 5), equipado com controle automático de temperatura, pH, agitação e nível. O volume de meio utilizado para a produção da enzima foi de 5L, com temperatura mantida a 28°C e agitação de 200 rpm. A taxa de aeração foi ajustada de modo que a taxa de O₂ dissolvido nunca fosse abaixo de 60% de saturação de ar no meio de cultura. O pH foi mantido $5,0 \pm 0,2$ e controlado automaticamente por meio da adição de ácido fosfórico ou NaOH 20%. A formação de espuma foi suprimida pela adição de antiespumante (20% v/v) (Sigma). Após 5 dias, o cultivo foi encerrado, o micélio e o Avicel remanescente foram removidos por centrifugação. O sobrenadante foi filtrado e concentrado por ultrafiltração tangencial em sistema *hollowfiber*, com cartucho com poro de 0,42µm e 10 kDa de corte (GE), respectivamente. Depois de filtrado e concentrado, o sobrenadante foi trocado para tampão Tris/HCl 50mM pH 7,5, para posterior purificação.

Figura 5 - Fermentador Bioflo 110 (New Brunswick) durante cultivo do fungo *T. harzianum* para expressão das celulases.

3.5 Determinação do perfil de proteínas totais secretadas pelo fungo (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (dodecilssulfato de sódio) é muito utilizada para análises de massas moleculares de proteínas. O gel é uma matriz formada por um polímero de acrilamida, onde pode-se escolher a porosidade da malha de acordo com a concentração de acrilamida, quanto maior a concentração, menores os poros formados pela malha.

Nesse experimento, amostras de proteínas são previamente preparadas com SDS, que é um detergente anfipático. Por ser um agente desnaturante com alta carga negativa, o SDS converte as proteínas da forma nativa para uma estrutura linear, negativamente carregada. Na ausência de SDS, proteínas com massas iguais não migram no gel da mesma forma por causa de suas diferentes cargas. As amostras foram então fervidas por 5 minutos na presença de um agente redutor, 2-mercaptoetanol ou ditioneítrito (DTT), desfazendo as pontes dissulfeto e ajudando na perda da estrutura tridimensional das proteínas, que podem agora ser aplicadas no gel de poliacrilamida. A separação das bandas de proteínas se dá por meio de corrente elétrica, fazendo com que as proteínas migrem do polo negativo para o polo positivo. Dessa forma as proteínas menores passam com maior facilidade, se movendo com mais rapidez pela malha do gel, enquanto que as maiores terão maior dificuldade e migrarão de forma mais lenta. Para o cálculo da massa molecular utiliza-se um padrão com uma mistura de proteínas com massas moleculares conhecidas.

Para a análise do perfil de proteínas totais expressadas pelo fungo durante o cultivo, foi utilizado gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE). Alíquotas do crescimento fúngico provenientes do cultivo foram coletadas e centrifugadas. Amostras com o sobrenadante foram preparadas usando uma solução preparada com: tampão tris 2M pH6,8; 6% de SDS; 30% de glicerol (87%); 15% de β -mercaptoetanol; 0,01% de azul bromofenol (0,5%); usada na proporção de 3:1 de amostra para solução, as amostras preparadas foram fervidas, em banho-maria, por 5 min. As amostras de proteínas foram aplicadas no gel e a eletroforese processada a 100 V, a 25°C. As proteínas foram reveladas através da coloração dos géis com 0,2% de Coomassie Brilliant Blue R-250 em solução de metanol:ácido acético:água (50:10:40 v/v/v)⁴⁶. As massas moleculares aparentes das proteínas foram determinadas por comparação com

proteínas padrão de massas moleculares conhecidas (GIBCO BRL) aplicadas ao gel de poliacrilamida.

3.6 Purificação

As proteínas produzidas pelo fungo *T. harzianum* foram submetidas a técnicas de cromatografia em equipamentos FPLC (*Fast Performance Liquid Chromatography* – GE). Para isso foram usadas colunas cromatográficas de troca iônica, *DEAE-Sepharose HP* (Sigma-Aldrich) e uma coluna de interação hidrofóbica *Phenyl Sepharose HP* (GE-Healthcare).

O extrato bruto foi inicialmente concentrado em um sistema de filtração tangencial, *Hollow Fiber*, em coluna com corte de 10kDa. O extrato concentrado foi então aplicado em uma coluna de troca iônica DEAE – Sepharose HP 16/20 previamente equilibrada com tampão inicial Tris/HCl 50mM pH 7,5 (tampão A). No primeiro passo de purificação, a coluna foi lavada com tampão A de modo a retirar as proteínas que não interagiram com a coluna até que a linha de base de absorbância (280nm) permanecesse constante e estável. O gradiente de eluição foi feito em três passos com diferentes concentrações de sal, 20, 50 e 100% de tampão B (tampão A adicionado de 0,5M de NaCl). A coluna foi lavada com 2,5 volumes de coluna (VC) com 10mM de NaCl adicionado no tampão A, com um fluxo de 2 mL/min. Durante o primeiro passo do gradiente (20% de tampão B) pode-se observar um pico majoritário no cromatograma, referente a banda de CBHII, posteriormente revelada por SDS-PAGE 15% de poliacrilamida. As frações contendo CBHII foram coletadas separadamente. Durante os outros passos foram eluídas outras proteínas, como a CBHI, que saiu com 250mM de NaCl.

Para o segundo passo de purificação, as proteínas presentes na fração de interesse, eluídas da coluna DEAE-Sepharose, foram dessalinizadas em tampão acetato de amônio 1M pH 5.5 (tampão C) em coluna *Sephadex G25* (GE-Healthcare) promovendo também a troca da amostra para esse tampão.

A amostra dessalinizada e em tampão acetato de amônio 1M pH 5.5 (tampão C) foi aplicada em uma coluna de interação hidrofóbica, *Phenyl Sepharose HP 26/20*, previamente equilibrada com o mesmo tampão. Para eluição foi realizado um gradiente linear inverso o qual iniciava-se com 100% do tampão acetato de amônio 1M e essa concentração diminuía até 0%.

As frações recuperadas das colunas foram analisadas por eletroforese em SDS-PAGE 15% de poliacrilamida, coradas com *Coomassie Brilliant Blue* (R-250), para revelar a separação das proteínas e o grau de pureza da amostra eluída.

3.7 Identificação da proteína por espectrometria de massas

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica analítica utilizada para identificar compostos, elucidar algumas propriedades estruturais e químicas de moléculas e determinar sequências aminoacídicas de peptídeos que serão comparadas com massas e sequências depositadas em bancos de dados.

Para serem analisadas por MS as amostras podem ser inseridas diretamente no espectrômetro de massas, o qual pode ou não estar acoplado em equipamentos que utilizam técnicas de separação, como a cromatografia líquida, a cromatografia gasosa ou a eletroforese capilar. A análise por MS consiste na geração de íons com base em compostos, orgânicos ou inorgânicos, por meio de um ionizador, que pode ser um *spray* eletrostático. Em seguida os íons são separados de acordo com a sua relação massa-carga por um analisador de massas, e por fim são detectados quali e quantitativamente por um detector⁶⁰.

Para confirmação da identidade da proteína, amostras contendo a suposta proteína CBHII, foram submetidas a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 15%. Posteriormente o gel foi corado e a banda que acreditava-se conter a enzima de interesse foi recortada e retirada do gel de poliacrilamida. Os passos para o processo de extração consistiram em, dividir o pedaço extraído do gel em pedaços menores (1mm²) e descorá-los com solução acetonitrila/bicarbonato de amônio 25mM pH8 (50% v/v). Essa lavagem também serve para retirar o SDS. Em seguida, o gel foi desidratado com acetonitrila e seco

em um sistema Speed Vac. Os géis secos foram reduzidos com solução de DTT, preparada com bicarbonato de amônio e iodoacetamida. Depois de várias lavagens com bicarbonato de amônio os géis foram secos novamente e uma solução de tripsina, preparada em ácido acético 50mM, foi adicionada, e seu excesso removido. A reação de digestão pela tripsina ocorreu *over night* a 37°C. Após a incubação a solução foi removida para um tubo limpo. A extração dos peptídeos foi feita com ácido fórmico/acetonitrila (50% v/v) e depois de 30 minutos em temperatura ambiente, a solução foi removida e o procedimento repetido por duas vezes. As soluções ricas em peptídeos foram reunidas e concentradas até aproximadamente 20µL, e guardadas em freezer para posterior análise de espectrometria de massa. Protocolo modificado a partir de Shevchenko et. al. (1996)⁴⁷.

Os peptídeos digeridos foram analisados pela empresa MS Applications Research Scientist Waters Corporations, Brasil, em um espectrômetro de massas do tipo Electrospray Tandem MS (Q-TOF), equipado com interfase nanospray (Micromass). O programa MASCOT (www.matrixscience.com) foi usado para a identificação de proteínas. A lista de massas dos peptídeos foi pesquisada usando a base de dados de proteína NCBI nr (base de dados não-redundante do National Center for Biotechnology Information).

3.8 Determinação das condições ótimas de atividade quanto ao pH e a temperatura por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para CBHII

O Delineamento Composto Central Rotacional (CCRD), contendo cinco níveis para cada variável independente (codificados como -1,414, -0,707, 0, +0,707, +1,414) foi empregado para determinar as faixas ideais e avaliar os efeitos dos dois parâmetros principais da atividade ótima da proteína em questão, temperatura e pH. Essas variáveis e seus níveis foram predeterminados baseado na literatura disponível sobre a CBHII de *Trichoderma reesei*, onde, para a temperatura, a variação ficou entre 40 e 80°C e, para o pH, variou entre 2,6 e 7. Os valores codificados e reais das variáveis independentes estão apresentados na Tabela 1.

Para este experimento foi utilizado o substrato *p*-NP- β -D-cellobioside (*p*NPC, Sigma, EUA) (Figura 6) na concentração estoque de 5mM solubilizado em água. Alíquotas de 50 μ L de substrato foram misturadas com 10 μ L de enzima a 0,5mg/mL e 40 μ L do mesmo tampão. A reação foi aquecida nas determinadas temperaturas por 15 minutos e 100 μ L de carbonato de sódio 1 M foi adicionado para interromper a reação. A medida da absorbância foi feita em $\lambda = 410 \text{ nm}$ ⁴⁸.

Figura 6 - Molécula do substrato *p*-NP- β -D-cellobioside (*p*NPC).

Durante a reação da enzima com o substrato, em temperatura e pH adequados, ocorre a clivagem do substrato, sendo liberado celobiose e *p*-nitrofenil (*p*NP). Quando adicionado carbonato de sódio na reação, o *p*NP reage conferindo cor ao experimento. Assim, quanto mais *p*NPC clivado, mais forte a cor revelada. A curva padrão foi construída utilizando o reagente *p*-nitrofenol para determinação da concentração (mM) de açúcar liberado na reação.

Todas as atividades foram expressas em unidades internacionais (IU), onde uma unidade de atividade corresponde a 1 μ mol de açúcar redutor (glicose equivalente) liberado por minuto de reação.

Tabela 1 - Variáveis independentes (valores codificados e reais).

		Níveis				
Variáveis	Símbolo	-1,414	-0,707	0	0,707	+1,414
Temperatura (°C)	A	40	50	60	70	80
pH	B	2,6	3,7	4,8	5,9	7,0

Um total de onze experimentos foram realizados, sendo 2^2 experimentos para o delineamento fatorial completo e 3 pontos centrais para avaliar o erro puro. Com a resposta obtida (atividade da CBHII para pNPC) foi montado um modelo de segunda ordem polinomial. Depois disso, os dados experimentais foram analisados através do software Statistica 7.0 (StatSoft, Inc.) para obter a significância estatística dos coeficientes de regressão para as variáveis dependentes, variância de ajuste do modelo (ANOVA) e a plotagem de superfície tridimensional resposta (RSM).

3.9 Eletroforese Capilar

Para análise da enzima CBHII de *T. harzianum*, utilizamos o oligossacarídeo sintético formado por cinco moléculas de glicose (C5) (Sigma - EUA) como substrato (figura 7).

Figura 7 - Substrato marcado com APTS. Cinco moléculas de glicose unidas por ligações β 1-4 (hexose).

Foram realizadas hidrólises parciais e totais, variando o tempo em que enzima e substrato marcado com 1pM de APTS ficaram incubados a 50°C.

A análise dos produtos da quebra do substrato foram realizadas por um detector de fluorescência com laser induzido – BioFocos 2000 (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Um capilar de sílica fundida (TSP050375, Polymicro Technologies) de 50µm de diâmetro e 31 cm de comprimento foi utilizado como coluna de separação dos oligossacarídeos. As condições de eletroforese foram 15kV/70-100µA utilizando 100 mM fosfato de sódio (pH 2.6) como tampão de corrida e temperatura controlada a 20°C. Os substratos marcados com APTS foram excitados a 488 nm e a emissão foi coletada através de um filtro de 520nm.

3.10 Dicroísmo circular (CD)

As medidas de CD foram realizadas a temperatura controlada de 25°C utilizando o espectropolarímetro JASCO J-720 (JASCO Corporation, Tóquio, Japão) na faixa de 190 a 260nm em cubetas de quartzo com caminho óptico de 1mm. Os espectros de CD foram obtidos empregando-se médias de oito varreduras. As contribuições dos tampões obtidos sob condições idênticas foram subtraídas e todos os espectros de CD foram corrigidos a fim de eliminar a radiação parasita, isto é, causada por quaisquer outros agentes que não a amostra. Os espectros originais foram filtrados com Transformadas de Fourier, preservando as bandas típicas de cada espectro. Os experimentos de dicroísmo circular foram realizados no Laboratório de Biofísica Molecular (IFSC-USP).

A solução proteica proveniente da purificação em diversas colunas, foi utilizada para analisar a integridade das estruturas secundárias nas condições de extração e monitorar as possíveis mudanças conformacionais induzidas por influência do pH através das medidas de CD. A concentração da proteína utilizada foi de 1,5µM em tampões Na₂HPO₄/ácido cítrico e Glicina/NaOH 20mM. A proteína foi previamente incubada por 10 horas nas soluções tamponadas com pH variando de 3 a 10 a 25°C.

3.11 Espectroscopia de Emissão de Fluorescência

As medidas de emissão de fluorescência da proteína foram realizadas no modo estático utilizando-se o espectrofluorímetro K2 (ISS Inc. Champaign, IL, EUA). Os espectros de fluorescência foram obtidos a temperatura controlada de 25°C. Amostras foram excitadas a 295nm e a emissão de fluorescência foi monitorada no intervalo de 300 a 400nm. Cubetas de quartzo de 1mm de caminho ótico foram utilizadas nas medidas. A fim de minimizar o efeito do espalhamento de luz, os espectros de emissão de fluorescência dos tampões foram subtraídos dos espectros das amostras. Foram analisadas as possíveis mudanças conformacionais da Celobiohidrolase II induzidas por influência dos pHs de 2 ao 10.

3.12 Estudos estruturais da CBH II utilizando Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

Esses estudos foram feitos em colaboração com Dr. Mario de Oliveira Neto, e todas as medidas de SAXS foram realizadas no LNLS, Campinas-SP.

Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) foi coletado para diferentes concentrações de CBHII de *T. harzianum*, variando de 1 a 6 mg/mL na linha de SAXS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil) utilizando comprimento de onda $\lambda=1.48 \text{ \AA}$, detector bidimensional (MarCCD) e distância amostra-detector de 1026.96 mm, cobrindo um intervalo de transferência de momento de $0.015 \text{ \AA}^{-1} < q < 0.33 \text{ \AA}^{-1}$. As curvas de espalhamento da solução de CBH II e do tampão foram coletadas em 2 etapas de 300 segundos para monitoramento dos danos causados pela radiação à amostra, além da estabilidade do feixe. Análise sistemática foi realizada subtraindo os dados pelo ruído gerado pelo CCD no mesmo tempo de exposição, em seguida, normalizando-os pela intensidade do feixe incidente e multiplicando-os pela absorção da amostra. O espalhamento da solução tampão foi subtraído da curva de espalhamento da solução de proteína nas diferentes concentrações. Finalmente os padrões bidimensionais das diferentes concentrações de CBH II foram integrados em 2Θ . O raio de giro (R_g) foi obtido por dois métodos distintos, utilizando a equação de Guinier⁴⁹ (equação 1), e pelo método de Transformada Inversa de Fourier

implementado no programa Gnom⁵⁰, onde também obtivemos a função de distribuição de distâncias $p(r)$ e o $D_{máx}$ da proteína.

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

A coleta e análise dos dados de SAXS da CBHI de *Trichoderma harzianum* utilizadas para comparação foram realizadas com os mesmos parâmetros utilizados para CBHII, descrita detalhadamente acima.

Modelos por homologia foram produzidos baseados na sequência de CBHII de *T. harzianum* e nos modelos “template” domínios catalítico⁵¹ de CBHII (pdb id 1QK2) e o de ligação a celulose⁵² de CBHI (pdb id 1CBH), ambos de *T. Reesei*. A modelagem foi realizada utilizando o programa Swiss model⁵³.

Estruturas de baixa resolução, chamadas de modelo de átomos *Dummy* (DAM) foram obtidas a partir dos dados experimentais da CBHII de *T.harzianum* utilizando o programa Dammin. O programa simula a estrutura inteira da proteína, gerando inicialmente uma esfera tridimensional preenchida por esferas menores. Para chegar a um modelo aceitável, o programa ajusta a curva de espalhamento teórica sobre a curva experimental, de forma a ficarem mais parecidas possível, e durante os ajustes das curvas, esferas são retiradas, adicionadas ou deslocadas, até que o modelo tridimensional gerado seja compatível com a curva de espalhamento experimental. A resolução dos modelos gerados é dada por $R=2\pi/q_{max}$. Os valores de R_g , D_{max} , a função de discrepância (χ) e a curva de espalhamento simulada do DAM foram calculados utilizando o programa Crysol⁵⁴.

Visto que até o momento não existe nenhuma estrutura cristalográfica resolvida para CBHII contendo ambos os domínios, os modelos por homologia dos domínios em separado, catalítico e CBM foram posicionados junto ao DAM para a determinação da posição relativa entre eles. Este procedimento foi realizado utilizando o pacote Massha⁵⁵.

4 Resultados e Discussão

4.1 Determinação do tempo de cultivo

O tempo de cultivo é um fator muito importante no processo de expressão das celulasas. Caso o cultivo seja interrompido no começo há uma grande chance da proteína de interesse não ter sido produzida, ou se produzida, com baixo rendimento. Por outro lado, se for finalizado tardiamente o fungo já pode ter começado a expressar proteínas proteolíticas e comprometido todo o extrato produzido.

Celulasas que clivam a celulose de forma aleatória em regiões amorfas são conhecidas como endoglucanases. A CMCase é um teste específico para esse tipo de celulase. As β -glicosidases são enzimas que hidrolisam a celobiose em duas moléculas de glicose, sendo sua atividade medida através de kit comercial. FPase é o teste de atividade que mede o sinergismos dos três grupos de celulasas (endoglucanase, celobiohidrolases e β -glicosidases).

Para a determinação do tempo de cultivo, testes enzimáticos, com intervalos de 24 horas entre uma amostra e outra, foram realizados. O gráfico de crescimento do fungo durante o cultivo é mostrado a seguir:

Figura 8 - Cinética enzimática durante os dias de cultivo. CMCase em vermelho; β -glicosidase em verde; FPase em azul; em roxo a dosagem da concentração de proteínas.

Após cinco dias o cultivo foi interrompido, e o extrato, contendo as proteínas de interesse, foi separado do micélio e do avicel que não foi consumido. O quinto dia foi determinado com base na cinética de atividade enzimática, com diferentes substratos, apresentada pelo fungo durante os dias de cultivo. A figura 12 mostra as atividades enzimáticas: CMCase em vermelho; β -glicosidase em verde; FPase em azul; em roxo a dosagem da concentração de proteínas.

Com base nas medidas realizadas concluímos que, embora a concentração de proteína ainda estivesse aumentando no quinto dia, a atividade, para todos os substratos testados, começava a diminuir. Isso pode ocorrer pelo fato do fungo começar a expressar proteínas proteolíticas, prejudicando o rendimento das celulases de interesse.

4.2 Purificação

Para estudar uma proteína é indispensável que a mesma esteja isolada de sua mistura proteica, com um alto grau de pureza. Esse isolamento é conseguido através de passos de purificação, que podem ser realizados por cromatografia de afinidade, troca iônica, interação hidrofóbica e por exclusão por tamanho. A precipitação com sulfato de amônio é bastante usada como um primeiro passo, servindo tanto para concentrar extratos proteicos, quanto como uma pré-purificação, já que diferentes proteínas precipitam em diferentes concentrações desse sal.

Biomoléculas são purificadas usando técnicas de cromatografia que as separa de acordo com suas diferentes propriedades específicas. A cromatografia de troca iônica é uma técnica frequentemente usada para purificar proteínas e outras biomoléculas carregadas. Ela separa moléculas com base na diferença de suas cargas de superfície, se mostrando uma técnica bastante adequada em todas as etapas em protocolos de purificação.

A purificação de celulasas produzidas por sistema de expressão homólogo não é algo trivial. Por serem glicosiladas essas proteínas acabam se comportando de forma diferente, mesmo quando em condições previamente estabelecidas. O baixo rendimento também é um dos fatores que torna a purificação dessas enzimas ainda mais difícil.

4.2.1 Tentativas de purificação da CBHII de *Trichoderma harzianum*

Com o objetivo de estabelecer um protocolo para a purificação de CBHII de *Trichoderma harzianum* vários métodos e diferentes colunas foram testadas. Abaixo, algumas estratégias testadas:

➤ Tentativa I:

Com o extrato em tampão tris/HCl 50mM pH7, iniciamos a primeira tentativa em estabelecer um protocolo. O processo de purificação começou com a coluna de troca iônica, *Q-sepharose* (GE-Healthcare) previamente equilibrada com o mesmo tampão. O extrato concentrado e tamponado, com cerca de 225mg de proteína, foi dividido em oito corridas (para não sobrecarregar a coluna). Para as oito corridas observou-se o mesmo padrão de separação das proteínas, onde a CBHII não interagiu com a coluna e saiu junto com muitos contaminantes, durante a lavagem da coluna com tampão sem sal. O cromatograma dessa coluna é mostrado na figura 9, e as proteínas separadas na primeira etapa de cromatografia por troca iônica foram visualizadas em SDS-PAGE (15% de poliacrilamida) mostrada na figura 10. As proteínas que interagiram com a coluna foram eluídas em um gradiente linear com o mesmo tampão inicial adicionado de 1M de NaCl.

Figura 9 - Cromatograma coluna *Q-Sepharose*. A fração contendo a CBHII está representada no pico FT.

Figura 10 - SDS-PAGE (15% de poliacrilamida) com as frações correspondentes ao cromatograma mostrado na figura anterior. A banda da CBHII está indicada pela seta preta.

As frações que não interagiram com a coluna (*flowthrough*-FT) *Q*-sepharose nas oito corridas diferentes (representada no SDS-PAGE da figura 10 por FT), foram unidas, preparadas e divididas em três partes, para três corridas diferentes (para não sobrecarregar a coluna), para um segundo passo, dessa vez uma troca catiônica, *MonoS* HR 5/5 (Amersham Biosciences). Nesta coluna usamos tampão formato de sódio 50mM pH3,5, e para eluição o mesmo tampão adicionado de 1M de NaCl. A fração cotendo a CBHII também não interagiu com a coluna, e a proteína saiu durante a lavagem da coluna com tampão sem sal.

Figura 11 - Cromatograma da coluna *MonoS* HR 5/5. Os números indicam as respectivas frações isoladas no SDS-PAGE da figura 12.

Figura 12 - SDS-PAGE das frações de proteínas separadas no cromatograma da coluna *MonoS* HR 5/5. Circulada em azul as frações com a CBHII.

As frações com a CBHII separadas no SDS-PAGE da figura 12, foi passada para tampão tris/HCl 50mM pH7 adicionado de 1M de sulfato de amônio, e em seguida foi injetada em uma coluna de interação hidrofóbica (*Phenyl Sepharose HP*). O cromatograma da fenil é mostrado na figura 13, com a CBHII começando a ser eluída no final do gradiente, indicada pelo número 1, com aproximadamente 70mM de sulfato de amônio e terminando a eluição com tampão sem sal. O resultado dessa purificação pode ser visto no SDS-PAGE da figura 14.

Figura 13 - Cromatograma da coluna *phenyl sepharose*. Pico correspondente a CBHII indicado pelo número 1.

Figura 14 - Gel SDS-PAGE (15% poliacrilamida) com a separação obtida da coluna de interação hidrofóbica, com o número 1 correspondente ao cromatograma da figura anterior. Ao lado SDS-PAGE com a banda de CBHII concentrada indicada pela seta preta.

No final de todo esse processo de purificação, restou pouco mais de 1mg de CBHII ainda com contaminantes, tornando este, um protocolo muito longo, ineficiente, e com baixo rendimento.

➤ Tentativa II:

Em outra tentativa, trocamos a coluna *Q-Sepharose* por uma coluna de bancada com resina *DEAE-Sepharose A-50* (GE-Healthcare). Para essa coluna foi utilizado tampão tris/HCl 50mM pH7 e a eluição das proteínas que interagiram com a coluna, foi feita com o mesmo tampão adicionado de 500mM de NaCl, em apenas um passo. A fração que não interagiu com a coluna, contendo a CBHII, foi recuperada durante a lavagem da coluna com tampão sem sal. Essa fração foi preparada e injetada na coluna *MonoS*, nas mesmas condições descritas anteriormente para a mesma. Da mesma forma, a parte que não ligou à coluna foi coletada e aplicada na coluna *phenyl-sepharose*, repetindo as condições usadas anteriormente. No final desse teste voltamos a fração contendo a CBHII para a coluna *Q-Sepharose* mudando o tampão para pH8. O resultado não foi muito melhor que o anterior, mas uma pequena fração de CBHII se mostrou um pouco menos contaminada, como pode ser visto no SDS-PAGE da figura 15.

Figura 15 - Gel SDS-PAGE das proteínas separadas na *Q-sepharose* em pH8. Indicada pela seta preta, a fração da CBHII com maior grau de pureza obtido nesse passo.

A fração indicada pela seta preta na figura 15, representa a fração mais limpa da CBHII conseguida no final da corrida na coluna *Q-Sepharose*, com tampão em pH8. Apesar de conter menos contaminante, foram necessários muitos passos para chegar a apenas cerca de 0,4mg de proteína.

➤ Tentativa III (diversas estratégias)

Além dessas colunas citadas acima, outras estratégias também foram testadas, como, colunas de troca iônica e de interação hidrofóbica de alta resolução, gradiente de pH e sal e até uma coluna de algodão tratado, na tentativa de reter as celulasas, separando-as das demais proteínas do extrato, não obtendo em nenhum dessas tentativas proteína pura e melhores rendimentos.

➤ Tentativa IV:

Após várias tentativas, estabelecemos um protocolo com base no método utilizado por Jager et. al. (2010)⁵⁶ com enzimas de um complexo celulolítico comercial de *Trichoderma reesei*. Para a CBHII de *T. harzianum*, conseguimos purificá-las em três passos de purificação, com uma troca iônica, uma desalting e uma interação hidrofóbica, utilizando as mesmas colunas com pequenas modificações nos tampões (descrito na seção 3.5. de materiais

e métodos). O cromatograma abaixo (Figura 16) refere-se ao primeiro passo de purificação onde a amostra foi aplicada na coluna *DEAE-Sepharose* previamente equilibrada com tampão inicial Tris/HCl 50mM pH 7,5 (tampão A).

Figura 16 - Cromatograma da coluna DEAE-Sepharose HP. Eluição feita com gradiente em steps. O pico correspondente a proteína CBHII está indicado pela seta em preto.

Como pode ser visualizado, o gradiente de eluição foi realizado em três passos em tampão contendo o sal NaCl, sendo que as concentrações de sal utilizadas para cada passo foram de 20, 50 e 100%. A fração contendo a proteína CBHII foi eluída com 20% de NaCl e encontra-se indicada no cromatograma pela seta em preto.

Embora a CBHI e a CBHII tenham sido separadas, como no protocolo descrito por Jager, a CBHII de *T.reesei* (*TrCBHII*) é separada nessa primeira coluna sem sal, diferentemente da CBHII de *Trichoderma harzianum* (*ThCBHII*), podendo essa diferença de 0,5 unidades de pH ser suficiente para que ocorra mudança de pH necessária para a proteína interagir com a coluna.

Figura 17 - Gel SDS-PAGE 15% de poliacrilamida com as frações da eluição com gradiente em *steps* na coluna DEAE-Sepharose HP. Destacado em vermelho a proteína CBHII eluída com 200mM de NaCl. Em MM) padrão de massa molecular; 1) amostra aplicada na coluna; 3,4 e 5) frações em diferentes partes do pico mostrado pela seta preta no cromatograma da figura 13.

Um pouco dessa diferença com a purificação pode ser explicada pela glicosilação. As celulasas produzidas por fungos sofrem modificações pós-traducionais, onde podem ser adicionados novos grupos funcionais na proteína como, por exemplo, carboidratos. Essa modificação pode alterar a carga de superfície da proteína e sua hidrofobicidade, e geralmente podem variar consideravelmente dependendo das condições de cultivo.

Para o próximo passo a mistura de proteínas foi dessalinizada em uma coluna de exclusão por tamanho (*sephadex* G25- GE-Healthcare). Durante esse passo também houve a troca de tampão da amostra para acetato de amônio 1M pH5.5.

A cromatografia de interação hidrofobia (HIC) é muito utilizada para complementar outras técnicas de purificação, podendo ser utilizada depois de passos de precipitação com sulfato de amônio ou mesmo depois da troca iônica, sem precisar de uma preparação adicional, já que as amostras são aplicadas com uma alta concentração de sal. O elevado nível de sal faz com que aumente a interação entre os componentes hidrofóbicos da amostra e o meio cromatográfico, separando as proteínas de acordo com as diferenças na sua hidrofobicidade superficial, utilizando interação reversível entre a proteína e a superfície hidrofóbica de uma coluna de interação hidrofóbica.

As proteínas dessalinizadas e em tampão acetato de amônio 1M pH5.5 (tampão C) foram então aplicadas em uma coluna de interação hidrofóbica, *Phenyl Sepharose HP*,

previamente equilibrada com o mesmo tampão. A eluição deu-se por gradiente linear de 100 a 0% de tampão C, onde separamos a CBHII das bandas de proteínas contaminantes, conseguindo uma banda pura de CBHII. A figura 18 e 19 mostram respectivamente o perfil cromatográfico referente à eluição da amostra pela a coluna *Phenyl Sepharose* e a eletroforese em gel SDS-PAGE 15% correspondente ao pico de eluição.

Figura 18 - Cromatograma da coluna *Phenyl Sepharose HP*. Indicado pela flecha preta o pico da eluição da CBHII com um gradiente de eluição de 100 a 0% de tampão C.

Figura 19 - Gel SDS-PAGE 15% de poliacrilamida mostrando a banda de CBHII (seta preta) entre os marcadores de 66 e 45 kDa eluída na coluna *Phenyl Sepharose HP*.

O SDS-PAGE da figura 19 mostra que a fração purificada continha uma banda pura com massa molecular de aproximadamente 55kDa. A massa molecular teórica da *ThCBHII* é

de 49,2kDa, porém como já esperávamos, o valor experimental obtido para sua massa molecular foi maior devido à glicosilação extensa⁵⁷. Para comparação, a massa molecular teórica da proteína CBHII de *T. reesei*, calculada com base em sua sequência de aminoácidos foi de 47kDa, enquanto que o valor observado experimentalmente foi próximo a 53kDa^{58; 59} o que reforça o fato da diferença de massa molecular teórica e experimental observada para a proteína *ThCBHII* estar relacionada as glicosilações presentes na enzima nativa.

Comparando com os métodos testados, essa estratégia de purificação baseada em Jager se mostrou mais eficiente, já que utiliza menos passos de purificação, reduzindo o tempo gasto e a perda de proteínas, que ocorre entre um passo e outro. Sendo a CBHII expressa em baixa quantidade, qualquer perda se torna significativa.

4.3 Espectrometria de Massa

Para confirmação da identidade da enzima purificada, a mesma foi submetida a digestão trípica e os peptídeos gerados foram analisados por espectrometria de massa. Os resultados da pesquisa mostraram que os perfis peptídicos obtidos foram consistentes com a sequência de aminoácidos de CBHII depositada, demonstrando que a proteína purificada de 49,2kDa era efetivamente a proteína CBHII de *Trichoderma harzianum*⁶¹.

```
MVGILATLATLATLAASVPLEERQSCSSVWGQCGQNWAGPFCCASGSTCVYSNDYYSQCLPGAASSSS
STRASSTTSRVSSATSTRSSASTPPPASSTTPAPPVSGTATYSGNPFAGVTPWANSFYASEVSTLAIPS
LTGAMATAAAAVAKVPSEFMWLDTLDKTPLMSSTLSDIRAANKAGGNYAGQFVVYDLPDRDCAAAASNGEY
SIADGGVDKYKNYIDTIRGIVTTFSDVRILLVIEPDSLNLVTNLATPKCSNAQSAYLECINYAITQLNL
PNVAMYLDAGHAGWLGWPNQDPAAQLFANVYKNASSPRAVRGLATNVANYNAWNITTPPSYTGNAVYN
EKLYIHAIGPLLANHGWNSAFFITDQGLGKQPTGQLEWGNWCNAVGTGFGIRPSANTGDSLLDSFVWVKP
GGECDGTSNSSAPRFDYHCASADALQPAPQAGSWFQAYFVQLLTNANPSFL
```

Figura 20 - Sequência de CBHII de *T. harzianum* com o peptídeo derivado da digestão com tripsina em negrito e sublinhado. A mistura de peptídeos resultantes foi analisada por espectrometria de massa que confirmou a identidade da proteína.

4.4 Determinação das condições ótimas de pH e temperatura para a atividade da enzima CBHII

A atividade de uma enzima é dependente do pH e da temperatura, uma vez que estes parâmetros podem provocar mudanças na sua distribuição de cargas, consequentemente, em seu enovelamento, conformação, e atividade catalítica. Os resultados de pH e temperatura ótimos foram obtidos através de metodologia de Delinamento Composto Central Rotacional. A análise estatística desse método gerou um gráfico de superfície de resposta indicando os parâmetro ótimos, que mostraram melhor atividade da enzima CBHII para o substrato pNPC, a 60°C e pH4,8, como pode ser visto na figura 21.

Figura 21 - Temperatura e pH ótimos para CBHII. (A) Gráfico de superfície de resposta e (B) gráfico de contorno indicando faixas ideais de temperatura e pH na atividade da enzima CBHII de *T. harzianum* com o substrato pNPC.

Como um primeiro passo do nosso estudo, a determinação do pH ótimo entre 2,6 e 7, para atividade exoglucanase da CBHII de *T.harzianum* foi testada em uma temperatura constante a 50°C, temperatura essa, comumente descrita na literatura como sendo ótima para celulasas de fungos. Estes resultados mostraram que a 50°C, a atividade exoglucanase aumenta a medida que o pH aumenta dentro da faixa de pH de 3 a 5 e, em seguida, diminui dentro da faixa de pH de 5 a 7 (Fig. 21A), não mostrando uma diferença drástica entre os pHs 4,5 e 5,5. A enzima atingiu a sua atividade ótima a 60°C em pH4,8, essas condições são semelhantes às encontradas para outras celobiohidrolases^{62; 63}.

Com o pH ótimo determinado, foram feitos testes para determinar a melhor temperatura para atividade enzimática da CBHII. A atividade foi realizada entre as temperaturas de 40 e 80°C, sendo possível notar o aumento da atividade com a elevação da temperatura entre 50 a 60°C, atingindo a atividade máxima a 60°C. De forma constante, a atividade acima de 65°C, foi diminuindo até que não fosse mais notada (figura 21B).

Observou-se também que variações no intervalo de temperatura de 55°C a 65°C e pH entre 4,5 e 5,5 não é prejudicial à atividade ótima da CBHII. Por outro lado, ficou claro que em pH 4,8 variações significativas de temperatura, acima de 65°C ou abaixo de 50°C (78,2 ° C ou 21,8°C) são suficientes para diminuir drasticamente a atividade da enzima. Comportamento semelhante é observado a 60 ° C, quando o pH muda para 2,18 ou 7,0. Em síntese, pode-se observar através dos resultados obtidos que a enzima tem sua atividade ótima nos intervalos 4,5 a 5,5 e 50 a 65°C de pH e temperatura, respectivamente.

Este tipo de estudo é fundamental em processos industriais, onde a manipulação das variáveis como temperatura e pH é de extrema importância para a eficiência do processo e redução de custos.

4.5 Eletroforese Capilar

A eletroforese é uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de compostos iônicos ou ionizáveis, em um campo elétrico. Na eletroforese clássica, solutos carregados são separados através de um meio líquido condutivo, sobre uma superfície que permite o deslocamento das soluções de eletrólitos e dos solutos, utilizando papel, ou gel como superfície de separação. Entretanto, durante a passagem da corrente elétrica ocorre o aumento da temperatura, sendo o gel ou papel incapazes de dissipar esse calor, limitando a rapidez, eficiência, e aumento da escala de separação eletroforética.

Em eletroforese capilar, a separação se dá em tubos de dimensões capilares, com 25 a 75µm de diâmetro interno, 50 a 100 cm de comprimento, preenchidos com solução tampão. O uso de tubos com dimensões capilares favorece a dissipação do calor, diminuindo as limitações provocadas pelo aquecimento. A técnica pode ser realizada com pequenos volumes de amostras (± 10 nL), com alta resolução, capacidade de separação e eficiência. Uma das grandes vantagens dessa técnica é a simplicidade de sua instrumentação. O sistema consiste

de uma fonte de tensão, capilares, que normalmente são de sílica fundida, eletrodos (geralmente de platina) e um detector apropriado. Para evitar o aumento de temperatura, o capilar fica mantido à temperatura constante.

A fim de elucidar o modo de hidrólise da enzima *ThCBHII*, foram realizadas análises do padrão de clivagem por eletroforese capilar, utilizando o oligossacarídeo sintético, constituído de cinco moléculas de glicose (C5) ligadas entre si por ligações do tipo β -1,4. O substrato marcado anteriormente com APTS foi submetido à hidrólise enzimática parcial e total (Figura 22).

Figura 22 - Espectro de Eletroforese Capilar. Hidrólise completa e incompleta para um substrato com C5.

Como resultado das análises foram gerados vários espectros, um com apenas o substrato, outros durante a hidrólise parcial do substrato e um último espectro com o produto final da hidrólise do substrato marcado.

No espectro referente ao substrato C5, pode-se perceber um pequeno pico de contaminação com substrato C4 (formado por quatro moléculas de glicose). No começo da hidrólise observa-se um pico majoritário correspondente ao C3, que pode ter sido formado pela liberação de celobiose (C2) do substrato C5, já que o pico de C5 decresce à medida que o C3 aumenta. Durante a hidrólise observa-se um pequeno aumento no pico correspondente ao substrato C4, ocorrido provavelmente pela liberação de glicose (C1) do substrato C5. No final da hidrólise nota-se o surgimento de um pico de C2 majoritário, que logo é convertido em C1.

Para esse experimento esperávamos glicose como produto final, o que ocorreu, mas o processamento do substrato foi diferente. Com a liberação gradual de celobiose, reduzindo o substrato C5 em C3 e C3 em C1, como é reportada na literatura¹⁹. Segundo Lynd et al. (2002)¹⁰ a CBHI (*T. reesei*), que também é caracterizada por liberar celobiose, pode, ocasionalmente, liberar celotriose ou glicose durante o estágio inicial da hidrólise. Os resultados obtidos para o experimento de eletroforese capilar, nos leva a perguntar se a CBHII poderia, assim como a CBHI, liberar glicose como produto de sua reação.

4.6 Dicroísmo circular e espectroscopia de emissão de fluorescência

A espectroscopia de dicroísmo circular (CD) em proteínas e peptídeos é uma ferramenta muito utilizada no estudo de mudanças conformacionais, sofridas devido a mudanças de temperaturas, pH, determinados solventes, na interação com ligantes e em ensaios de desnaturação e renaturação de proteínas. Essa técnica fornece informações capazes de caracterizar, quantificar e discriminar estruturas secundárias (α -hélices, fitas- β , voltas e estruturas não ordenadas) presentes nestas moléculas⁶⁴. Moléculas assimétricas em solução são opticamente ativas, isto é, quando elas interagem com uma luz circularmente polarizada elas absorvem luz polarizada à direita e à esquerda de maneira desigual. Esta diferença na absorção gera luz elipticamente polarizada que pode ser medida por um espectropolarímetro de CD, que converte este sinal em elipticidade (θ) expresso em miligraus. O sinal de CD será positivo ou negativo dependendo da absorção preferencial da luz polarizada à direita ou à esquerda. Os cromóforos mais numerosos e característicos que proteínas e peptídeos possuem para a luz circularmente polarizada na faixa do UV-distante (170 a 260nm), são as ligações peptídicas⁶⁵.

Figura 23 - Efeito de uma amostra opticamente ativa absorvendo uma luz incidente linearmente polarizada. Os desenhos mostram o vetor campo elétrico visto ao longo da direção de propagação. (A) luz linearmente polarizada. (B) Luz elipticamente polarizada produzida pela passagem da luz incidente através da amostra opticamente ativa. A seta vermelha representa a somatória da luz circularmente polarizada para a direita e da luz circularmente polarizada esquerda.

A elipcidade gerada pela diferença nas duas componentes, E_L e E_R , está relacionada à diferença de absorção pela amostra, sendo elipcidade a razão entre os eixos maior e menor da elipse.

Os espectros de CD de proteínas apresentam bandas nas regiões de 180-250 nm que correspondem às ligações peptídicas presentes nas proteínas. A figura 24 ilustra os diferentes espectros de CD descritos para as diferentes estruturas secundárias que fazem parte das proteínas em geral.

Figura 24 - Espectros de dicroísmo circular no UV distante. Estruturas secundárias em α -hélice (vermelho), folha β (verde) e uma região de sequência aleatória (preto) para uma cadeia polipeptídica. Extraído de Fasman, 1996⁶⁶.

A estrutura secundária e terciária da CBHII foi investigada por CD e medidas de fluorescência, respectivamente. O espectro de CD no UV distante medido a 25°C e pH5 (Figura 25) se mostrou bem característicos de proteína contendo elementos em α -hélices, o que é compatível com a estrutura secundária já descrita para celobiohidrolase II de *T. reesei*⁵¹. Este resultado indica um perfil de estrutura secundária devidamente enovelada viável para estudos estruturais e funcionais. Na Figura 25 é possível observar que no intervalo entre os pHs 4 e 9 não ocorreram modificações significantes na estrutura secundária da proteína. Pequenas variações foram observadas no valor da elipticidade, com dois mínimos negativos, um em 208nm e outro em 215nm para o pH5, pH ótimo da enzima. Entretanto em pH10 nota-se uma grande mudança, exibindo assim um espectro de CD típico de proteínas não ordenadas/desenoveladas.

Figura 25 - Espectro de dicroísmo circular da CBHII de *T. harzianum*. É possível ver claramente a perda de estrutura secundária em pH10.

A espectroscopia de emissão de fluorescência é largamente utilizada para caracterizar macromoléculas biológicas e verificar mudanças conformacionais discretas no microambiente dos grupos fluorescentes naturais (fluoróforos) como triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe). A fluorescência destes resíduos é altamente sensível ao ambiente em que se encontram, portanto, é possível monitorar suas alterações por parâmetros como a posição do máximo de emissão ($\lambda_{\text{máx}}$) e a intensidade de fluorescência devido à ação de solventes, ligantes, íons ou agentes solubilizantes⁶⁷.

Além dos fluoróforos naturais descritos acima, podem ser utilizados fluoróforos extrínsecos, que devem ser adicionados, ou ligados a um componente.

Moléculas absorvem luz, que em seu aspecto ondulatório, consiste de campos elétrico e magnético perpendiculares entre si, que oscilam senoidalmente à medida que se propagam pelo espaço, mas também pode se comportar como um feixe de partículas, chamados fótons. Quando um fóton encontra uma molécula, ele pode ser espalhado, mudando sua direção de propagação, ou absorvido, transmitindo sua energia, e assim a molécula é dita excitada. Dependendo da energia absorvida e das características dos níveis de energia da amostra essa energia absorvida é reemitida como fluorescência.

Quando a energia do fóton é absorvido pela molécula, ocorre a mudança de elétrons entre níveis de energia, chamada de transição. Uma transição entre níveis eletrônicos de energia representa a energia requerida para mover um elétron de uma à outra. As mudanças de níveis de energia são representadas no diagrama por setas. Durante o decaimento, de um estado excitado para o estado fundamental, é que ocorre a emissão da energia absorvida, como fluorescência, como é mostrado na figura 26 pelo diagrama de Jablonski.

Figura 26 - Diagrama de Jablonski. Processo de criação de um estado eletrônico excitado por absorção óptica e subsequente emissão de fluorescência.

As medidas de absorbância são feitas em um espectrofotômetro, que consiste de uma fonte de luz, um monocromador, onde é selecionado o comprimento de onda, um porta amostra, um detector de luz, e um registrador para capturar os dados de saída do detector. Assim um feixe de luz de alta intensidade passa através do monocromador para a seleção de um comprimento de onda de excitação eficientemente absorvido pelo fluoróforo, normalmente 295nm. O feixe de luz de excitação então passa pela cubeta no porta amostra. A luz emitida (fluorescência) pela amostra passa através de um monocromador para análise do comprimento de onda e depois vai para o tubo fotomultiplicador, que é um detector fotossensível. Programas de computador varrem os comprimentos de ondas detectados automaticamente, e mostram a intensidade de emissão como uma função do comprimento de onda da luz emitida.

Frequentemente os espectros são mostrados como intensidade de fluorescência em relação ao comprimento de onda.

O espectro de emissão da CBHII mostrou um máximo de emissão de fluorescência no comprimento de onda de 333 nm (pH5,0) após excitação a 295 nm (figura 27).

Figura 27 - Espectro de emissão de fluorescência da CBHII no comprimento de onda de excitação de 295nm variando o pH de 2 a 10.

Sabendo-se que os máximos de emissão dos resíduos de triptofano são obtidos quando exposto ao solvente (350nm), e que os resíduos internalizados em regiões centrais hidrofóbicas das proteínas têm um máximo de emissão baixo (308nm), podemos concluir, com base no espectro de emissão de fluorescência na Figura 8, que em pH5 os resíduos de triptofano estão parcialmente expostos ao solvente. Com a mudança de pH para aos extremos, pode-se observar o deslocamento dos máximos de emissão da curva para comprimentos de onda maiores, mostrando que houve modificação/perda da estrutura, corroborando com o espectro de CD, mostrado na Figura 25. Nesse espectro observa-se claramente o deslocamento dos máximos de emissão da curva nos pHs 2 e 10, com máximos de emissão de fluorescência de 337 e 336 nm, respectivamente. Além disso, percebe-se diminuição do rendimento quântico da fluorescência para pHs 2, 3 e 10. Isto ocorre devido ao fato de nestes pHs, os fluoróforos intrínsecos expostos ao solvente sofrerem colisões com outras moléculas da solução presentes no solvente (*quenchers*), causando perda de energia no fluoróforo e diminuindo assim, o rendimento quântico final.

4.7 Alinhamento das sequências de CBHI e CBHII de *Trichoderma harzianum*

Análise da sequência da CBHII sugeriu que, assim como a maioria as celulasas de fungos, a CBHII é formada por dois domínios diferentes, um menor de ligação à celulose (CBM) e um catalítico maior, possuindo entre os domínios um longo *linker* contendo 47 aminoácidos. A sequência primária da proteína, e as regiões correspondentes ao CBM, *linker* e domínio catalítico, estão representadas na figura 28.

```

MVVGILATLATLATLAASVPLEERQSCSSVWGQCGGQNWAGPFCCASGSTCVYSNDYYSQCL
PGAASSSSSTRASSTTSRVSSATSTRSSASTPPPASSTTPAPPVGSGTATYSGNPFAGVTPW
ANSFYASEVSTLAIPSLTGAMATAAAAVAKVPSFMWLDTLDKTPLMSSTLSDIRAANKAGGN
YAGQFVVYDLPDRDCAAAASNGEYSIADGGVDKYKNYIDTIRGIVTTFSQVRIILLVIEPDSL
ANLVTNLATPKCSNAQSAYLECINYAITQLNLPNVAMYLDAAGHAGWLGWPANQDPAAQLFAN
VYKNASSPRAVRGLATNVANYNAWNITTPPSYTQGNVYNEKLYIHAIGPLLANHGWSNAFF
ITDQGLGKQPTGQLEWGNWCNAVGTGFGIRPSANTGDSLLDSFVWVKPGGECGTSNSSAPR
FDYHCASADALQPAPQAGSWFQAYFVQLLTNANPSFL

```

Figura 28 - Sequência primária da proteína celobiohidrolase II de *T.harzianum*. Em verde, possível peptídeo sinal (predito em SignalP - <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>); em vermelho, sequência peptídica correspondente ao CBM; em azul, sequência do *linker*; e em preto sequência referente ao domínio catalítico.

A sequência da CBHI de *T.harzianum* mostrou uma região de 22 resíduos de aminoácidos correspondente ao *linker*, (figura 29). Comparando as sequências de CBHI e CBHII, verificou-se que a região coberta pelo *linker* em CBHII é o dobro da região da CBHI.

A figura 31 mostra a sequência de aminoácidos da CBHI com a região do *linker* destacado em azul, e o CBM em vermelho.


```

EQVCTQQAETHPPLTWQKCTASGCTPQQGSVVLNANRWRWTHDTKSTTNCYDGNTWSSTLCPDDA
TCAKNCCLDGANYSPTYGVTTSGDALTLQFVTASNVGSRLYLMANDSTYQEFTLGNEFSFDVD
VSQLPCLNGALYFVSMADGGQSKYPGNAAGAKYGTGYCDSQCPRDLKFINGQANVEGWEPSS
NNANTGVGGHGGSCSEMDIWEANSISEALTPHPCETVGQTMCSGDSCGGTYSNDRYGGTCDPDG
CDWNPYRLGNTSFYGPSSFALDTTKKLTVVTFATDGSISRYYVQNGVKFQQPNAQVGSYSGN
TINTDYCAAQTAFFGTSFTDKGGLAQINKAFQGGMVLVMSLWDDYAVNMLWLDSTYPTNATAS
TPGAKRGSCSTSSGVPAQVEAQSPNSKVIYSNIRFGPIGSTGGNTGSNPPGTSTTRAPPSSTGS
SPTATQTHYQCGGTGWTGPTRCASGYTCQVLNPFYSQCL

```

Figura 29 - Sequência da CBHI de *T. harzianum*. Em vermelho, sequência peptídica correspondente ao CBM; em azul, sequência do *linker*; e em preto sequência referente ao domínio catalítico.

Outra diferença entre as duas celobiohidrolases é a posição do C-terminal, que na *ThCBHII* fica no domínio catalítico e na *ThCBHI* no domínio de ligação a celulose. Essa diferença de posição torna impossível alinhar as sequências das proteínas de forma intacta, com os dois domínios.

Figura 30: Representação dos domínios conservados da CBHI e CBHII de *T. harzianum*.

4.8 SAXS

SAXS tem se mostrado uma poderosa ferramenta na análise estrutural de macromoléculas. Estudos de enzimas em solução podem ser realizados, permitindo a sua visualização tridimensional ou a de complexos formados entre elas ou com seus substratos. Uma ligeira mudança na posição relativa dos domínios, ou subunidades, pode ser visualizada próximo ao estado nativo, utilizando SAXS. A determinação da estrutura terciária e

quaternária de proteínas em solução é um importante passo para completa caracterização da amostra em estudo. A interpretação de dados de SAXS permite a análise da estrutura global de proteínas a baixo resolução, que pode ter seu tamanho variável entre poucos kDa e muitos MDa. A determinação direta do envelope molecular, a predição de estruturas quaternárias em oligômeros, a verificação de transições conformacionais que ocorrem por interação com ligantes, assim como, a visualização de processos de enovelamento e desenovelamento proteico⁶⁸ podem ser realizadas⁶⁹.

Em um experimento de SAXS, ondas eletromagnéticas associadas aos raios-X incidentes provocam oscilações dos elétrons dos átomos componentes da amostra irradiada. Quando a energia dos fótons incidentes é bem diferente da energia de ligação dos elétrons, estes elétrons comportam-se, então, como se fossem livres. As partículas livres carregadas oscilantes produzem ondas espalhadas em todas as direções coerentes com a onda incidente. A intensidade $I(q)$ produzida por um sistema monodisperso diluído de macromoléculas em solução é proporcional a amplitude de espalhamento da macromolécula, promediada para todas as orientações. No caso de espalhamento de partículas em solução, a amostra é isotrópica, podendo as partículas assumir todas as orientações possíveis em relação ao feixe incidente. Assim, temos acesso experimental somente a média esférica para orientações da macromolécula⁷⁰.

4.8.1 SAXS de CBHII de *T. harzianum*

Um parâmetro estrutural interessante utilizado na análise de mudanças conformacionais de macromoléculas em solução é o raio de giro (R_g). O R_g é definido como sendo a raiz quadrada da distância quadrática média r entre os elétrons da partícula e o centro de massa eletrônico do objeto espalhador. O valor de R_g pode ser obtido a partir da curva de espalhamento a baixos q_s . O R_g é um parâmetro útil na investigação de proteínas em solução que sofrem variações conformacionais em função de, por exemplo, mudanças nas condições da solução. Um aumento ou diminuição do R_g pode indicar uma mudança nas posições relativas entre os átomos ou domínios que compõe a macromolécula.

Para um sistema monodisperso e diluído, por exemplo, de proteínas em solução, a intensidade de espalhamento de raios X em função do vetor de espalhamento q , ($q=4\pi\sin\Theta/\lambda$), onde 2Θ é o ângulo de espalhamento entre o feixe incidente e espalhado pode também ser utilizada para o cálculo da função de distribuição de distâncias $p(r)$. Embora $I(q)$ versus q está relacionada com a forma da macromolécula, o perfil não é intuitivamente informativo, sendo necessária uma transformada inversa de Fourier para interpretar um perfil de espalhamento em termos da função de distribuição de distâncias $p(r)$. A função de distribuição de distâncias inclui toda a informação estrutural que é possível ser obtida a partir de uma curva de SAXS. A partir de uma análise da $p(r)$, podemos aferir sobre a forma da partícula espalhadora em solução (figura 31). Partículas globulares possuem uma $p(r)$ na forma de uma função gaussiana centro simétrica com um máximo em $D_{\max}/2$. Partículas alongadas possuem uma $p(r)$ com um máximo em menores distâncias. Partículas achatadas mostram um máximo mais alargado, também deslocando o máximo para distâncias menores que $D_{\max}/2$. $p(r)$ com um máximo deslocado para distâncias maiores que $D_{\max}/2$ é indicativa de cascas esféricas. Partículas formadas por duas subunidades bem separadas apresentam dois máximos, o primeiro correspondente às distâncias intra-subunidades e outro da separação entre as subunidades⁷¹.

Figura 31 - Padrões de espalhamentos e $p(r)$ característicos de objetos geométricos com o mesmo D_{max} . Figura extraída de Svergun⁷².

A curva de SAXS de CBHII de *T. harzianum*, assim como a curva de Guinier, onde é calculado o R_g é mostrada na Figura 32A. A função de distribuição de distâncias, $p(r)$, da CBHII de *T. harzianum* é alongada possuindo $D_{m\acute{a}x}$ de 125 Å. A $p(r)$ da ThCBHII não contém parte negativa no eixo das abscissas, o que indica ausência de efeitos de interferência, produzidas por correlações espaciais interpartículas (figura 32b). A sobreposição da curva experimental da CBHII com a curva resultante do modelo *ab initio* é mostrado na figura 32c. Abuja et.al. (1988)⁷³ em um dos primeiros estudos de SAXS de CBHII de *T. reesei*, mostrou um modelo que, embora com a mesma forma de girino, apresentava valores muito diferentes do que vimos para ThCBHII, sendo encontrado para CBHII de *Trichoderma reesei* um $D_{m\acute{a}x}$

de 215 ± 5 Å. Uma pequena diferença já era esperada, visto que CBHII de *T. reesei* possui 9kDa a mais que a CBHII de *T. harzianum*. O Raio de giro (R_g) também se mostrou diferente, com uma diferença de aproximadamente 17 Å, sendo a CBHII de *T. harzianum* menor, com um R_g experimental de 35,80 Å. Segundo Receveur et. al. (2002)⁷⁴ essa diferença pode ser explicada em parte pela qualidade dos equipamentos disponíveis durante as medidas na década de 80.

Os parâmetros estruturais obtidos dos dados de SAXS e do modelo *ab initio* DAM são apresentados na Tabela 2.

continua

continuação

Figura 32 - Curva de espalhamento e $p(r)$. **A)** Curva de espalhamento de CBHII de *T.harzianum* ($\ln I(q)$ vs q) . O inserto contém o gráfico de Guinier ($\ln I(q)$ vs. q^2), o qual foi obtido o raio de giro. **B)** A função de distribuição de distancias para os dados experimentais de CBHII de *T.harzianum*. **C)** Curva de espalhamento ($\ln I(q)$ vs q) (em preto) e resultados do ajuste com modelo *ab initio* gerado pelo programa Dammin (em vermelho).

A partir de ambas as curvas de intensidade de espalhamento $I(q)$ e $p(r)$ pode-se construir *ab initio* um envelope tridimensional. O envelope de baixa resolução foi gerado pelo programa DAMMIN⁷². É possível calcular o espalhamento teórico desta estrutura, e compará-la com o obtido a partir da função experimental $I(q)$. Um bom acordo indicaria que o modelo

proposto é aceitável, o resultado desse ajuste pode ser visto na figura 32A. Alternativamente, pode-se propor um modelo estrutural da proteína, com base em estruturas cristalográficas, calcular a função $I(q)$ associada à mesma e compara-la com a obtida experimentalmente.

O modelo *ab initio* DAM claramente revela a presença de um lóbulo maior e um lóbulo menor conectados por um linker. Respeitando o alinhamento sequencial, identificamos estes lóbulos como sendo, respectivamente os domínios catalíticos e de ligação a celulose da CBHII. O resultado da sobreposição do DAM, com os domínios em alta resolução preditos por modelagem por homologia mostrou que, de fato a CBHII tem o formato estrutural em forma de ‘girino’, e desta forma a posição relativa dos domínios homólogos foi determinada, estando de acordo com outras celulasas de fungos (figura 33). Estudos realizados por Lee e Brown (1997)³⁶ com microscopia eletrônica de alta resolução para CBHI e CBHII de *T. reesei*, mostraram dados muito semelhantes ao conseguidos por SAXS, e com valores de D_{max} e R_g da TrCBHII de $134 \pm 26 \text{ \AA}$ e $44 \pm 3 \text{ \AA}$, respectivamente, sendo próximos dos dados de CBHII de *T.harzianum*.

Figura 33 - Envelope tridimensional da proteína CBHII. Modelo obtido com o programa Dammin (dummy átomos). Os domínios CBM e Core foram identificados no DAM e os domínios obtidos por homologia, catalítico e domínio de ligação a celulose (CBM) foram sobrepostos.

Infelizmente ainda não é possível cristalizar essas celulasas em sua forma intacta devido a flexibilidade que o *linker* proporciona. Essa mobilidade da cauda em proteínas com dois domínios pode estar diretamente relacionada com uma maior eficiência em degradar substratos insolúveis.

Tabela 2 - Parâmetros estruturais da CBHII de *T. harzianum* obtidos por SAXS.

	Experimental	DAM
R_g Guinier (Å)	35.80	-
R_g gnom (Å)	37.31 ± 0.14	37.86
D_{max} (Å)	125.00	126.20
Resolucao (Å)	20.94	-
χ	-	1.47
Resolução 2π/q _{max}		

Experimentos de SAXS demonstraram que a CBHII de *T. harzianum* está pura, monodispersa e monomérica em solução. Um modelo *ab initio* foi gerado a partir dos dados de SAXS, permitindo a visualização da posição relativa dos dois domínios, catalítico e de ligação a celulose.

4.8.2 Comparação entre as celobiohidrolases I e II de *T. harzianum*

Uma característica semelhante entre as duas celobiohidrolases é a sequencia na região do *linker*, rica em Serina e Treonina, aminoácidos com sítios de *O*-glicosilação e frequentemente glicosilados. Essa glicosilação tem demonstrado influenciar a função, a estrutura e até a estabilidade das proteínas, variando de acordo com as condições de cultivo e em diferentes organismos⁵⁷.

As curvas de espalhamento experimental com os ajustes no programa Gnom e as funções de distribuição de distancias, comparando a CBHI e CBHII são mostradas nas figuras 34A e 34B.

Figura 34 - Comparação entre as Curvas de espalhamento e $p(r)$ para CBHI e CBHII. **A)** Comparação das curvas de espalhamento experimental ($\ln I(q)$ vs q) de CBHI e CBHII de *T.harzianum* e resultados do ajuste com o programa Gnom. **B)** Comparação das $p(r)_s$ para os dados de CBHI e CBHII de *T.harzianum*.

Baseado na figura 34A, podemos verificar uma diferença nos fatores de forma $I(q)$ de CBHI e CBHII. Uma análise mais detalhada da função de distribuição de distâncias $p(r)$ das celobiohidrolases (figura 34B) mostra que CBHII é mais alongada que CBHI, com distâncias máximas (D_{max}) de 115 $\text{\AA}$ para CBHI e 125 $\text{\AA}$ para CBHII. Apesar da diferença nas distâncias máximas, podemos verificar que a frequência máxima de distâncias nas partículas são equivalentes, sugerindo que os domínios catalíticos de ambas as proteínas são similares.

Este aumento no D_{max} pode ser explicado pela diferença no tamanho do linker das celobiohidrolases, como falado anteriormente.

A partir dos dados de SAXS, análises de flexibilidade da proteína em estudo também podem ser realizadas. A respeito da flexibilidade das proteínas, Porod notou que para partículas globulares, os dados de espalhamento apresentados no gráfico de Kratky, com $I(q) \cdot q^2$ vs q , poderia fornecer uma área definida, conhecida como invariante. Em outras palavras, nos obtemos um gráfico com a forma de gaussiana com um máximo bem definido, seguido por um decaimento tendendo à zero. A medida que aumentamos a flexibilidade da proteína ou adicionamos regiões móveis, como *linkers* e *loops* nós temos uma diminuição na área definida pela gaussiana, assim como teremos uma elevação na linha de base a altos q_s (figura 35)⁷⁵.

Figura 35 - Gráfico Kratky de dados de espalhamento ilustrando mudanças no comportamento para uma partícula esférica. Estrutura esférica (esfera cinza), curva mostrada em preto; parcialmente enovelada (esfera cinza com região desenovelada em preto), curva mostrada em cinza; e uma partícula completamente desenovelada (região desenovelada em preto), com alto grau de flexibilidade, curva mostrada em vermelho. (Rambo 2011).

Para uma partícula esférica, como uma proteína de domínio globular, a curva é descrita por um pico inicial bem definido seguido por uma linha de base próxima de zero. O perfil para esse tipo de partícula é mostrada pela curva em preto na figura 35. Proteínas formadas por um domínio parcialmente desenovelado, ou adicionado de uma região flexível, apresenta uma curva com um pico definido, mas com uma elevada linha de base, na figura 35 esse perfil está representado pela curva em cinza. Em partículas totalmente desenoveladas, a curva perde a forma gaussiana e a linha de base é extremamente elevada, como é mostrada pela curva em vermelho na figura 35.

Uma análise da flexibilidade das celobiohidrolases pode ser realizada a partir do gráfico de Kratky. Na figura 36, podemos verificar uma diminuição na área definida pela gaussiana e um aumento na linha de base a altos q_s , demonstrando assim que CBHII é mais flexível que CBHI.

Figura 36 - Gráfico de Kratky. Comparação dos perfis de Kratky para CBH1 e CBH2 de *T.harzianum*

Estudos realizados por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) por Lee et. al., mostraram uma possível conformação helicoidal para o *linker* dessas celobiohidrolases. Com base na figura 33, a distância estimada entre os resíduos C-terminal do CBM e N-terminal do domínio catalítico, possui valor aproximado de 51Å. Levando em conta que para cada resíduo de aminoácidos soma-se aproximadamente 3Å no peptídeo estendido, em uma cadeia de 47 aminoácidos, que é o caso do *linker* da CBHII, seria esperado para o peptídeo estendido aproximadamente 141Å. Sendo assim o modelo apresentado vai de acordo com o sugerido Lee et.al. (1997)³⁶ quando sugere uma cauda helicoidal para essas proteínas.

REFERÊNCIAS

- 1 SALLA, D. A. **Análise energética de sistemas de produção de etanol de mandioca, cana-de-açúcar e milho.** 2008. 168 (Doutorado). Ciências Agrônômicas Universidade Estadual Paulista
- 2 LEITE, R. C.; CORTEZ, L. A. B. **O Etanol Combustível no Brasil.** 2009.
- 3 TEIXEIRA, A., p. <http://www.brasil-biofuels.com.br/swf/index.htm>, 2008. Acesso em: 26/10/2011.
- 4 CENSUS BUREAU, U. S. World population information. **Internacional Data Base**, p. <http://www.census.gov/population/international/data/idb/worldpopgraph.php>, 2011. Acesso em: 04/04/2012.
- 5 BASTOS, V. D. **Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias.** BNDS Setorial, p.5-38. 2007
- 6 SAHA, B. C. **Lignocellulose biodegradation and applications in biotechnology.** American Chemical Society. 889: 2-34 p. 2004.
- 7 DEMAİN, A.; NEWCOMB, M.; WU, J. Cellulase, clostridia, and ethanol. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 1, p. 124-+, MAR 2005 2005. ISSN 1092-2172.
- 8 SUN, J. et al. Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. **Polymer Degradation and Stability**, v. 84, n. 2, p. 331-339, MAY 2004 2004. ISSN 0141-3910.
- 9 BHAT, M.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 15, n. 3-4, p. 583-620, 1997 1997. ISSN 0734-9750.
- 10 LYND, L. et al. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology (vol 66, pg 506, 2002). **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 4, p. 739-739, DEC 2002 2002. ISSN 1092-2172.
- 11 DELMER, D.; AMOR, Y. CELLULOSE BIOSYNTHESIS. **Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 987-1000, JUL 1995 1995. ISSN 1040-4651.
- 12 BADGER, P. C. **Ethanol From Cellulose: A General Review.** Reprinted from: Trends in new crops and new uses. 2002.

13 ZÚÑIGA, U. F. R. **Desenvolvimento de um bioprocesso para produção de celulasas específicas na cadeia produtiva do etanol de segunda geração**. 2010. (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo

14 SAXENA, R.; ADHIKARI, D.; GOYAL, H. Biomass-based energy fuel through biochemical routes: A review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 1, p. 156-167, JAN 2009 2009. ISSN 1364-0321.

15 RAMOS, L. P. **Aproveitamento integral de resíduos agrícolas e agroindustriais**. Centro de Pesquisa em Química Aplicada UFPR 2001.

16 PEREIRA JR., N. **Biomassas residuais de composição lignocelulósica para a produção de etanol e o contexto de refinaria** 2007.

17 SILVA, N. L. C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. 2010. (Mestrado). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro

18 BEGUIN, P. Molecular-biology of cellulose degradation. **Annual Review of Microbiology**, v. 44, p. 219-248, 1990 1990. ISSN 0066-4227.

19 CASTRO, A. M. Produção, propriedades e aplicações de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello, PETRÓLEO BRASILEIRO S.A.**, *Quim. Nova*, v. 33, n. 1, p. 8, 2010.

20 CASTRO, A. M. D. **Produção e propriedades de fungos filamentosos, obtidas a partir de Celulignina de bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**. 2006. 212 (Mestrado). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro

21 CANILHA, L. et al. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de "desconstrução" da fibra vegetal. **Revista Analytica**, n. 44, p. 48-63, dez2009/jan2010.

22 RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6ª.

23 ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. Introductory Mycology. In: (Ed.). 4. New York: John Wiley Sons, Inc., 1996.

24 MENDONZA, D. P. G. **Variações do secretoma de *Trichoderma harzianum* em resposta a diferentes fontes de carbono**. 2009. (Mestrado). Biologia Celular, Universidade de Brasília

25 DEACON, J. The nature and practice of biological-control of plant-pathogens - cook,rj, baker,kf. **Nature**, v. 309, n. 5970, p. 732-732, 1984 1984. ISSN 0028-0836.

26 PAPAVIZAS, G. C. Trichoderma and Gliocládium: biology ecology, and potencial por biological control. **Annual Review of Phytopathology**, v. 23, p. 23-54, 1985.

27 WINDHAM, M.; ELAD, Y.; BAKER, R. A MECHANISM FOR INCREASED PLANT-GROWTH INDUCED BY TRICHODERMA SPP. **Phytopathology**, v. 76, n. 5, p. 518-521, MAY 1986 1986. ISSN 0031-949X.

28 PERES, E.; MELO, I. S. Variabilidade entre isolados de *Trichoderma harzianum*. I- aspectos citológicos. **Sci. agri.**, v. 52, p. 56-59, 1995.

29 SCHAFFNER, D. W.; TOLEDO, R. T. Cellulase production by *Trichoderma reesei* when cultured on xylose-based media supplemented with sorbose. **Biotechnol Bioeng**, v. 37, n. 1, p. 12-6, Jan 1991. ISSN 0006-3592. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18597302> >.

30 HENRISSAT, B. A classification of glycosil hydrolases based on amino-acid-sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 280, p. 309-316, 1991. ISSN 0264-6021.

31 TAO, Y. et al. Purification and Properties of Endoglucanase from a Sugar Cane Bagasse Hydrolyzing Strain, *Aspergillus glaucus* XC9. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 10, p. 6126-6130, MAY 26 2010 2010. ISSN 0021-8561.

32 BEGUIN, P.; LEMAIRE, M. The cellulosome: An exocellular, multiprotein complex specialized in cellulose degradation. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, n. 3, p. 201-236, 1996 1996. ISSN 1040-9238.

33 RYU, D.; MANDELS, M. CELLULASES - BIOSYNTHESIS AND APPLICATIONS. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 2, n. 2, p. 91-102, 1980 1980. ISSN 0141-0229.

34 LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-+, Sep 2002. ISSN 1092-2172.

35 PALONEN, H.; TENKANEN, M.; LINDE, M. Dynamic Interaction of *Trichoderma reesei* Cellobiohydrolases Cel6A and Cel7A and Cellulose at Equilibrium and during Hydrolysis **Applied and environmental microbiology**, v. 65, p. 5229-5233, 1999.

- 36 LEE, H. J.; BROWN JR, M. A comparative structural characterization of two cellobiohydrolases from *Trichoderma reesei*: a high resolution electron microscopy study **Journal of Biotechnology**, v. 57, p. 127-136, 1997.
- 37 NEIVA, M. **Expressão em *Escherichia coli* de Quitinase (E.C.3.2.1.14) de *Chromobacterium violaceum***. 2005. (Mestrado). Biologia Tropical e Recursos Naturais, Universidade Federal do Amazonas - UFAM
- 38 KOIVULA, A. et al. The Active Site of Cellobiohydrolase Cel6A from *Trichoderma reesei*: The Roles of Aspartic Acids D221 and D175. **American Chemical Society**, v. 124, p. 10015-10024, 2002.
- 39 VARROT, A. et al. Structural Basis for Ligand Binding and Processivity in Cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens* **Structure**, v. 11, p. 855-864, 2003.
- 40 KOIVULAA, A. et al. Tryptophan 272: an essential determinant of crystalline cellulose degradation by *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase Cel6A **FEBS Letters**, v. 429, p. 341-346, 1998.
- 41 BHAT, M. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 5, p. 355-383, AUG 2000 2000. ISSN 0734-9750.
- 42 MENEZES, C. R.; SILVA, I. S.; DURRANT, L. R. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulolíticas **Estudos Tecnológicos**, v. 5, p. 68-78, 2009. ISSN 1808-7310.
- 43 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, JUN 2009 2009. ISSN 0556-3321.
- 44 JORGENSEN, H.; KRISTENSEN, J.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr**, v. 1, n. 2, p. 119-134, OCT 2007 2007. ISSN 1932-104X.
- 45 MANDELS, M.; WEBER, J. PRODUCTION OF CELLULASES. **Advances in Chemistry Series**, n. 95, p. 391-&, 1969. ISSN 0065-2393.
- 46 LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-&, 1970. ISSN 0028-0836.

- 47 SHEVCHENKO, A. et al. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. **Anal Chem**, v. 68, n. 5, p. 850-8, Mar 1996. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8779443> >.
- 48 WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Methods for measuring cellulase activities. **Methods in Enzymology**, v. 160, p. 87-112, 1988. ISSN 0076-6879.
- 49 KRATKY, G. **Small-angle X-ray Scattering**. p.515 p. 1982
- 50 SVERGUN, D. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. **Journal of Applied Crystallography**, v. 25, p. 495-503, AUG 1 1992 1992. ISSN 0021-8898.
- 51 ROUVINEN, J. et al. 3-Dimensional structure of cellobiohydrolase-ii from *Trichoderma reesei*. **Science**, v. 249, n. 4967, p. 380-386, 1990. ISSN 0036-8075.
- 52 KRAULIS, P. J. et al. Determination of the 3-dimensional solutions structure of the C-terminal domain of cellobiohydrolase-I from *Trichoderma reesei* - a study using nuclear magnetic resonance and hybrid distance geometry dynamical simulated annealing. **Biochemistry**, v. 28, n. 18, p. 7241-7257, 1989. ISSN 0006-2960.
- 53 SCHWEDE, T. et al. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3381-3385, JUL 1 2003 2003. ISSN 0305-1048.
- 54 SVERGUN, D.; BARBERATO, C.; KOCH, M. H. J. CRY SOL - A program to evaluate x-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. **Journal of Applied Crystallography**, v. 28, p. 768-773, Dec 1 1995. ISSN 0021-8898.
- 55 KONAREV, P. V. P., M. V.SVERGUN, D. I. *MASSHA* - a graphics system for rigid-body modelling of macromolecular complexes against solution scattering data. **Journal of Applied Crystallography**, v. 34, p. 527-532, 2001.
- 56 JÄGER, G. et al. Practical screening of purified cellobiohydrolases and endoglucanases with α -cellulose and specification of hydrodynamics. **Biotechnol Biofuels**, v. 3, p. 18, 2010. ISSN 1754-6834. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20718965> >.
- 57 STALS, I. et al. Factors influencing glycosylation of *Trichoderma reesei* cellulases. I: Postsecretorial changes of the O- and N-glycosylation pattern of Cel7A. **Glycobiology**, v. 14, n. 8, p. 713-724, 2004. ISSN 0959-6658.

58 BOER, H.; TEERI, T. T.; KOIVULA, A. Characterization of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase Cel7A secreted from *Pichia pastoris* using two different promoters. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 69, n. 5, p. 486-494, Sep 2000. ISSN 0006-3592.

59 FAGERSTAM, L. G.; PETTERSSON, L. G. The 1.4-beta-glucan cellobiohydrolases of *trichoderma-reesei* QM-9414 - a new type of cellulolytic synergism. **Febs Letters**, v. 119, n. 1, p. 97-100, 1980. ISSN 0014-5793.

60 FERREIRA, C. R. et al. **Princípios e aplicações da espectrometria de massas em produção animal. II Simpósio de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal**. Embrapa Pecuária Sudeste-São Carlos-SP-Brasil 2009.

61 GUILFOILE, P. et al. Cloning and sequencing of a cellobiohydrolase gene from *Trichoderma harzianum* FP108. **Journal of the Minnesota Academy of Science**, v. 64, n. (1), p. 18-22, 1999.

62 BOMMARIUS, A. S. et al. Cellulase kinetics as a function of cellulose pretreatment. **Metabolic Engineering**, v. 10, n. 6, p. 370-381, 2008. ISSN 1096-7176.

63 HUI, J. P. M.; WHITE, T. C.; THIBAUT, P. Identification of glycan structure and glycosylation sites in cellobiohydrolase II and endoglucanases I and II from *Trichoderma reesei*. **Glycobiology**, v. 12, n. 12, p. 837-849, Dec 2002. ISSN 0959-6658.

64 ROSSETO, F. R. **Caracterização Bioquímica, Biofísica e Estrutural da Principal Endoglucanase Secretada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC33913**. 2011. 92 (mestrado). Física Biomolecular, Universidade de São Paulo

65 KELLY, S. M.; PRICE, N. C. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. **Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1338, n. 2, p. 161-185, Apr 4 1997. ISSN 0167-4838.

66 FASMAN, G. D. **Circular dichroism and conformational analyses of biomolecules**. New York: Plenum, 1996.

67 LAKOWICZ, J. R.; MALIWAL, B. P. Oxygen quenching and fluorescence depolarization of tyrosine residues in proteins. **Biophysical Journal**, v. 41, n. 2, p. A220-A220, 1983. ISSN 0006-3495.

68 SVERGUN, D. I.; KOCH, M. H. J. Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution. **Reports on Progress in Physics**, v. 66, n. 10, p. 1735-1782, Oct 2003. ISSN 0034-4885.

69 SVERGUN, D. I. et al. New developments in direct shape determination from small-angle scattering .2. Uniqueness. **Acta Crystallographica Section A**, v. 52, p. 419-426, May 1 1996. ISSN 0108-7673.

70 FIGUEIRA, A. C. M. **Oligomerização, estruturas à baixa resolução, ligação ao DNA e ao ligante dos receptores de hormônios tireoidianos**. 2008. 190 (Doutorado). Universidade de São Paulo

71 OLIVEIRA NETO, M. D. **Espalhamento de raios X a baixo ângulo aplicado ao estudo estrutural de proteínas**. 2008. 153 (Doutorado). Universidade de São Paulo

72 SVERGUN, D. I. Restoring Low Resolution Structure of Biological Macromolecules from Solution Scattering Using Simulated Annealing **Biophysica**, v. 76, p. 2879 –2886, 1999.

73 ABUJA, P. M. et al. Domain structure of cellobiohydrolase II as studied by small angle X-ray scattering: close resemblance to cellobiohydrolase I. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 156, n. 1, p. 180-5, Oct 1988. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3178831> >.

74 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, OCT 25 2002 2002. ISSN 0021-9258.

75 RAMBO, R. P.; TAINER, J. A. Characterizing flexible and intrinsically unstructured biological macromolecules by SAS using the Porod-Debye law. **Biopolymers**, v. 95, n. 8, p. 559-71, Aug 2011. ISSN 0006-3525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21509745> >.