UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

VIVIANE ISABEL SERPA

Produção e caracterização de proteínas do complexo celulolítico de *Trichoderma harzianum,* envolvidas na hidrólise enzimática da biomassa

> São Carlos 2012

VIVIANE ISABEL SERPA

Produção e caracterização de proteínas do complexo celulolítico de *Trichoderma harzianum,* envolvidas na hidrólise enzimática da biomassa

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

Área de concentração :Física Aplicada Opção: Física Biomolecular Orientador: Prof. Dr. Igor Polikarpov.

Versão Corrigida (Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

> São Carlos 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)

Serpa, Viviane Produção e caracterização de proteínas do complexo celulolítico de Trichoderma harzianum, envolvidas na hidrólise enzimática da biomassa / Viviane Serpa; orientador Igor Polikarpov - versão corrigida -- São Carlos, 2012. 166 p. Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2012. 1. Celulose. 2. Trichoderma. 3. Expressão heteróloga. 4. Etanol. 5. Enzimas. I. Polikarpov, Igor, orient. II. Título.

O meu doutoramento, como todas as conquistas da minha vída, eu dedico aqueles que dão asas a minha imaginação: meus amados país, **Gentíl e Fátíma Serpa**

AGRADECIMENTOS

Aos meus país, por todo incentivo e apoio em tudo que precisei durante todos esses anos, à minha irmã por ser minha fã incentivadora e ao Cris por ser meu amor;

Ao Prof. Igor pela orientação, mas, principalmente, pelas oportunidades que me apresentou e por ter me preparado e me treinado para, a partir de agora, pode seguir minha carreira sozinha, com competência e segurança;

À FAPESP por ter financiado meus estudos e o projeto de pesquisa;

A María Santos e a Fer Batísta (mãe da píntíco) por terem me recebido tão bem em 2008 e terem me auxiliado nas mínhas primeiras tarefas com tanta paciência e dedicação. À Dani pela amizade e por todo apoio a quem acabava de chegar e precisava de muita ajuda e até de uma casa pra morar.

Ao Prof. Nei Pereira Jr. e ao Roberto Maeda, pela generosidade em dividir comigo seu precioso tempo para que eu pudesse aprender sobre as enzimas e os fungos filamentosos. Ao Roberto eu agradeço também pela bonita amizade que construímos e por ser essa pessoa incrivel que eu tanto admiro;

Ao grupo da Universidade Concordia, em Montreal, em especial ao Prof. Adrian Tsang, por ter me aceito no seu laboratório e me permitido viver uma experiência fantástica e aprender muito;

A Renatínha Alves por ter sído a melhor iniciação científica de todos os tempos, pelo apoio incondicional à tudo que precisei e por ter se dedicado integralmente ao nosso projeto. Sem ela, definitivamente, minha tese não seria a mesma;

A essas pessoas maravilhosas que encontrei por aqui e que carregarei no meu coração pra onde quer que eu vá: Ana (minha best roomate); Fran (parceira de projeto que muito tem me ajudado para que a tese ficasse pronta a tempo); Malu (aquela que eu posso contar pra tudo e qqr coisa); Flávio morenão (pela ajuda computacional e por ter me salvado em tantos momentos difíceis); Lis (pela parceria e ajuda no projeto de expressão em niger); Marísa (pela parceria no grupo dos fungos) e a Vanessa (pela dedicação e ajuda com nosso projeto sobre as endos). O mais importante foi saber que vcs sempre estariam alí, prontos pro que der e vier. Eternamente grata!

À sala 14 por ter sído tão divertida e acolhedora, pelas risadas, choros e trocas de conselhos e experiências.

Aos técnicos, secretários e às funcionárias da biblioteca por toda ajuda durante meu doutorado, em tudo que precisei; e eu precisei muito!

Ao IFSC pela estrutura para que o projeto fosse desenvolvído;

Ao Jorge, por operar milagres na minha vida;

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para que eu trilhasse esse caminho...

...Meus mais sinceros agradecimentos!!

"Let yourself be carried away by the delicate desires of your heart" (autor desconhecido)

RESUMO

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

Celulases têm atraído muito interesse nos últimos anos devido a sua habilidade na bioconversão de material lignocelulolítico em glucose, a qual pode, então, ser convertida a etanol por fermentação. O complexo celulolítico capaz de degradar a celulose consiste de várias enzimas (principalmente celulases e β-glucosidases) e proteínas auxiliadoras, que atuam em sinergismo para eficientemente hidrolizar a biomassa. Nesse estudo, investigou-se a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-acúcar pré-tratado utilizando enzimas produzidas por T. harzianum e enzima comerial. O rendimento de hidrólise foi avaliado quanto a diferentes níveis de deslignificação de biomassa, graus de cristalinidade da celulose, composição dos coquetéis enzimáticos e adição de BSA. Estudos de difração de raios-X mostraram que a cristalinidade da lignocelulose não é um fator determinante na recalcitrância ao ataque enzimático. Além disso, a adição de BSA não teve qualquer efeito no rendimento da hidrólise. O mais eficiente coquetel enzimático foi obtido misturando o preparado comercial com o produzido pelo T. harzianum (rendimento acima de 97%). Esse desempenho está, provavelmente, relacionado com níveis adequados de β -glucosidases e xilanases no coquetel. Devido a essa eficiente atividade celulolítica, o fungo T. harzianum tem um grande potencial em aplicação para hidrólise de biomassa. A celobiohidrolase I, uma exoglucanase, é a principal enzima secretada por esse fungo (cerca de 60% do total) e nesse estudo ela foi expressa em bioreator, purificada por cromatografia de troca iônica seguida de gel filtração e caracterizada bioquímica, biofísica e estruturalmente. Conforme confirmado por SAXS, tanto a CBHI inteira quanto seu domínio catalítico, obtido por digestão parcial com papaína, são monoméricos em solução e apresentam distância máxima (Dmax) de 110 e 60 Å, e raio de giro (Rg) de 20 e 27Å, respectivamente. Os resultados indicam que o linker é flexível em solução e confirmam o formato de girino da enzima. A CBHI possui atividade máxima em pH 5.0 e temperatura de 50°C, com atividade específica contra Avicel[®] e pNPC de 0.28 and 1.53 U/mg, respectivamente. Outras celulases de interesse foram também expressas para caracterização, no entanto, para essas, foi utilizado o sistema de expressão heteróloga em Aspergillus niger ou Pichia pastoris. O domínio catalítico da endoglucanase I de T. harzianum foi expresso em A. niger. A proteína tem atividade específica contra CMC de 15,8 U/mg e pH e temperatura ótima de 3 e 50°C, respectivamente. A proteína é estável nessas condições em até 3 dias de incubação (dados de ensaios de atividade residual). Estudos biofísicos de deslocamento térmico e dicroísmo circular apresentaram alguns parâmetros de estabilidade de estrutura terciária e secundária, respectivamente. A proteína perde estrutura terciária regular, em pH 5, em torno de 30°C mas sua estrutura secundária é desordenada somente em pH 9 (quando a 25°C). Experimentos de dicroísmo circular também indicaram a composição de estrutura secundária do domínio catalítico da EGLI de 6% de α-hélice e 42% de folhas- β .

Palavras-chave: Celulases; Trichoderma; hidrólise de biomassa; expressão heteróloga.

ABSTRACT

SERPA, V.I. Production and Characterization of proteins from the cellulolytic cocktail of *Trichoderma harzianum*, involved in enzymatic hydrolysis of biomass. 2012. 166p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

Cellulases have attracted an outstanding interest in the recent years because of its ability in the bioconversion of cellulose-containing raw materials into glucose, which can then be converted into ethanol by fermentation. The cellulase complex able to degrade cellulose consists of several enzymes (mainly cellulases and β-glucosidases) and auxiliary proteins, which act in synergism to efficiently solubilize the biomass. In this study, we investigated the enzymatic hydrolysis of pretreated sugarcane bagasse using crude enzyme extracts produced by Trichoderma harzianum as well as from the extract in combination with a commercial cocktail. The influence of different levels of biomass delignification, degree of crystallinity of lignicellulose, composition of enzymatic activities and BSA on enzymatic hydrolvsis vields was evaluated. Our X-ray diffraction studies showed that crystallinity of lignocellulose is not a key determinant of its recalcitrance toward enzymatic hydrolysis. In fact, under the experimental conditions, an increase in crystallinity of lignocellulosic samples resulted in increased glucose release by enzymatic hydrolysis. Furthermore, under the same conditions, the addition of BSA had no significant effect on enzymatic hydrolysis. The most efficient enzyme blends were obtained by mixing a commercial enzymatic cocktail with T. harzianum cellulase preparations (above 97%). Increased hydrolytic efficiencies appeared to correlate with having an adequate level of both *B*-glucosidase and xylanase activities in the blends. Due to its elevated cellulolytic activity, the filamentous fungus T. harzianum has a considerable potential in biomass hydrolysis applications. The cellobiohydrolase I, an exoglucanase, is the main enzyme secreted by this fungus (about 60% of total) and in this study we have expressed, purified and performed an initial biochemical, biophysical and structural characterization. As confirmed by small angle X-ray scattering (SAXS) both full-length CBHI and its catalytic core domain (CCD), obtained by partial digestion with papain, are monomeric in solution and they have Dmax of 110 and 60 Å, and Rg of 20 and 27 Å, respectively. The results indicate that the linker is flexible in solution and confirmed the tadpole shape of the enzyme. CBHI displays maximum activity at pH 5.0 and temperature of 50 °C, with specific activities against Avicel[®] and pNPC of 0.28 and 1.53 U/mg, respectively. Other celulases were also expressed, however, for them we have used the heterologous expression system in Aspergillus niger and Pichia pastoris. The catalytic domain of endoglucanase I from T. harzianum was expressed in A. niger and partially characterized. The protein has specific activity against CMC of 15.8 U/mg and optimum pH and temperature of 3 and 50°C, respectively. The protein is stable in these conditions until 3 days of incubation. Biophysical studies of termal shift and circular dichroism (CD) assays have showed some parameters of stability of tertiary and secondary structure of the protein. It loses regulary terciary structure in pH 5 around 30°C but the secondary structure is desordened only in pH 9 at 25°C. CD experiments also indicated the secondary structure compsition of the catalytic domain of EGLI: 6% de α -helices and 42% de β -sheet.

Key words: Cellulases; Trichoderma; Biomass hydrolysis; heterologous expression.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA DISPOSIÇÃO DAS MOLÉCULAS DE CELULOSE E HEMICELULOSE NA PAREDE
CELULAR DAS PLANTAS E APRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DA CELULOSE (FONTE: WWW.GENOMICS.ENERGY.ORG) 33
FIGURA 2 – ESTRUTURA DA HEMICELULOSE XILANO FORMADA POR POLÍMEROS DE D-XILOPIRANOSIL UNIDOS POR LIGAÇÕES
GLICOSÍDICAS B (1-4)
Figura 3 – Apresentação da estrutura da celulose. 1) O dissacarídeo celobiose e 2) Seu epímero C4, o
LACOTSIDE ⁹
FIGURA 4 - ESQUEMA REPRESENTANDO AS CELULASES E B-GLUCOSIDASES INTERAGINDO COM AS FIBRAS DE CELULOSE E
oligômeros. Detalhes destacam as regiões amorfas e cristalinas da celulose. Figura produzida pela Dr.
Daniela Trivella
FIGURA 5 – ESTRUTURA DA CELULASE COM SEUS DOIS DOMÍNIOS UNIDOS PELA REGIÃO LIGADORA (LINKER). NO ESQUEMA,O
DOMÍNIO CATALÍTICO INTERAGE COM UMA FIBRA DA MOLÉCULA DE CELULOSE E OS SÍTOS DE GLICOSILAÇÃO SÃO
APRESENTADOS
FIGURA 6 – MODELO DE AÇÃO DO AFROUXAMENTO DA PAREDE CELULAR PELAS EXPANSINAS. MICROFIBRILAS DE CELULOSE
SÃO CONECTADAS UMAS ÀS OUTRAS POR GLICANOS (FITAS AMARELAS E VERMELHAS) QUE PRENDEM AS SUPERFÍCIES
das microfibrilas de celulose umas as outras. Acredita-se que a proteína expansina (em azul) (a)
DISSOCIE AS LIGAÇÕES ENTRE OS POLISSACARÍDEOS SOBRE O ESTRESSE MECÂNICO DE TURGOR E DESLOQUE OS PONTOS
DE ADESÃO DOS POLÍMEROS (B E C) ³⁵
FIGURA 7 - MODELO SIMPLIFICADO DA PAREDE CELULAR DAS PLANTAS E SEU AFROUXAMENTO REALIZADO PELAS
expansinas. a-Expansinas (EXPA) trabalham nos xiloglucanos enquanto as b-expansinas (EXPA)
ATUAM SOBRE GLICANOS DIFERENTES. EXLA E EXLB SÃO PROTEÍNAS COMO EXPANSINAS, TAMBÉM SECRETADAS PELA
PAREDE CELULAR ³⁷
Figura 8 - Esquema do gene da swolenina de <i>T. reesei</i> com a sequência sinal (SS), o domínio de ligação a
CELULOSE (CBD), O LINKER E O DOMÍNIO TIPO EXPANSINA ²⁰
FIGURA 9 – ESQUEMA REPRESENTANDO O EVENTO DE SECREÇÃO DAS PROTEÍNAS PELA REGIÃO APICAL DA HIFA DE FUNGOS
FILAMENTOSOS
FIGURA 10 – FIGURA ILUSTRANDO A GLICOSILAÇÃO DAS PROTEÍNAS. (A) O PROCESSO DE GLICOSILAÇÃO DA PROTEÍNA
ACONTECE NO INTERIOR DA CÉLULA E DEPOIS OCORRE SUA EXPORTAÇÃO PARA O MEIO EXTRACELULAR E (B) OS TIPOS
DE AÇÚCARES PRESENTES NOS SÍTIOS DE GLICOSILAÇÃO
FIGURA 11 – PRODUÇÃO DE PROTOPLASTO A PARTIR DO MICÉLIO DE FUNGOS FILAMENTOSOS
FIGURA 12 – VETOR PPIC9K UTILIZADO PARA EXPRESSÃO DO GENE DA SWOLENINA EM P. PASTORIS
FIGURA 13 – DESENHOS APRESENTADOS PELO CDD APÓS ANÁLISE DAS SEQUÊNCIA E DELIMITAÇÃO DOS DOMÍNIOS PARA
ESTRATÉGIAS DE CLONAGEM. A) CBHI; B) CBHII; C) EGLI E D) EGLII
FIGURA 14 - VETOR DE DESTINO ANIP7G ESQUEMATIZADO PARA AMBAS PLATAFORMAS DE CLONAGEM: (A) <i>GATEWAY</i> ®
com os sítios <i>att</i> e (B) LIC com o sítio LIC de ligação. Os sítios de corte para as enzimas de restrição são
APONTADOS, BEM COMO A REGIÃO DO MARCADOR PYR ${ m G}$ e do promotor ${ m G}$ la80
FIGURA 15 – ESQUEMA DEMONSTRANDO OS PASSOS DE CLONAGEM PELA PLATAFORMA GATEWAY® A PARTIR DO VETOR DE
ENTRADA E DO PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE, AMBOS COM AS CAUDAS <i>ATT</i> ATÉ A INSERÇÃO AO VETOR DE
EXPRESSÃO
FIGURA 16 - ESQUEMA DO VETOR DE ENTRADA PDONR201 UTILIZADO NA PRIMEIRA RECOMBINAÇÃO (BP) DA CLONAGEM
por Gateway®. Esse vetor permite a transferência do gene para qualquer outro vetor de expressão
Gateway® (recombinação LR)
FIGURA 17 – ESQUEMA DEMONSTRANDO AS EXTREMIDADES COESIVAS CONSTRUÍDAS PELA T4 DNA POLIMERASE DE
ACORDO COM ESTRATÉGIA DO PROCEDIMENTO DE CLONAGEM POR LIC (<i>Ligation Independent Cloning</i>)
FIGURA 18 – IMAGEM DO BIOREATOR (NEW BRUNSWICK SCIETIFIC) COM 7 DIAS DE CULTURA DE <i>T. HARZIANUM</i> EM MEIO DE
CULTIVO COM AVICEL®
FIGURA 19 - GRÁFICO DA CINÉTICA DE PRODUÇÃO DAS ENZIMAS, POR <i>T. HARZIANUM,</i> DE 7 DIAS MONITORADOS A CADA 24
HORAS, PARA ATIVIDADES DE BETA-GLICOSIDASE, CMCASE E FPASE, ALÉM DA CONCENTRAÇÃO PROTEICA
FIGURA 20 – APARÊNCIA DA AMOSTRA DE BAGAÇO APÓS TRATAMENTO ALCALINO COM 4% DE NAOH E LIBERAÇÃO DA
LIGNINA PARA A FRAÇÃO SOLÚVEL
FIGURA 21 – IMAGEM DE BAGAÇO SECANDO EM ESTUFA COM CIRCULAÇÃO INTERNA DE AR A 60°C. AMOSTRA PRONTA (PRÉ-
TRATADA J PARA OS ENSAIOS DE HIDROLISE ENZIMÁTICA
FIGURA 22 – DIFRATOGRAMA EXPERIMENTAL (PONTOS) E MODELADO (LINHA FINA) DO BAGAÇO PRÉ-TRATADO COM NAOH
4%. US DIFRATOGRAMA DE RECONSTRUÇÃO ISOTROPICA (LINHA AZUL), BACKGROUND (ÁREA CINZA) E
CONTRIBUIÇÃO DO CAPILAR (LINHA PRETA GROSSA) SÃO TAMBÉM APRESENTADOS
FIGURA 23 – IMAGENS DOS FRASCOS DE ENSAIOS DE HIDROLISE. U FRASCO DA ESQUERDA, NAS DUAS FOTOGRAFIAS, CONSISTE
NO FRASCO DO CONTROLE NEGATIVO, OU SEJA, SEM A ADIÇAO DE ENZIMAS E CONSEQUENTEMENTE SEM APARÊNCIA DE

matéria hidrolisado. O frasco da direita recebeu 25 FPU/g de substrato e apresenta aspecto líquido
DE DEGRADAÇÃO DA FRAÇÃO INSOLÚVEL DO BAGAÇO PRÉ-TRATADO
FIGURA 24 – GRAFICO DE HIDROLISE ENZIMATICA DO BAGAÇO PRE-TRATADO COM 4% DE NAOH. COMPARAÇÃO DE
EFICIENCIAS DE HIDROLISE PARA ENZIMAS PRODUZIDAS PELO <i>T. HARZIANUM</i> (1), COMERCIAL MULTIFECT® E UMA
MISTURA EQUILIBRADA DE AMBOS (MI J. FUI TAMBEM AVALIADA A PERFORMANCE DO COQUETEL COMERCIAL COM A
METADE DU CARREGAMENTO ENZIMATICO DOS DEMAIS (M12,5)
FIGURA 25 – GELOBIOSE LIDERADA DURANTE AS TO HURAS DE HIDROLISE
DE RSA NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELIULICNINA. A HIDRÓLISE FOLREALIZADA POR LIM PREDARADO ENZIMÁTICO
COMPOSTO POR ENZIMAS PRODUZIDAS PELOS FUNGOS <i>T. HARZIANUM</i> E <i>PENICULJUM FUNICULOSUM</i> E O COMERCIAL
MULTIFECT® EM QUANTIDADES PARA GARANTIR QUE CADA UM CONTRIBUÍSSE COM 8.3 FPU/G SUBSTRATO EM UM
TOTAL DE 25 FPU/G
FIGURA 27 - GEL 2D DO EXTRATO EXTRACELULAR DO <i>T. HARZIANUM</i> COM AS DUAS PROTEÍNAS, CBHI E SWOLENINA,
IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA, APÓS ANÁLISE NO PROGRAMA MASCOT COM BANCO DE DADOS DO
NCBI
FIGURA 28 - CROMATOGRAMA DA CORRIDA DE PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA CBHI A PARTIR DO EXTRATO TOTAL DO T.
<i>harzianum</i> em coluna de troca aniônica Q-sepharose $16/10$. Numeração nos picos corresponde às
FRAÇÕES ANALISADAS EM SDS-PAGE A SEGUIR106
Figura 29 – SDS-PAGE com a frações coletadas na coluna de troca aniôica (acima). Amostras 3 e 4,
correspondentes à proteína CBHI, foram misturadas e concentradas para próximo passo de
PURIFICAÇÃO106
FIGURA 30 - GEL NATIVO DE 8-25% DE ACRILAMIDA COM DIFERENTES DILUIÇÕES (2, 4, 8 E 16x) DE UMA ALÍQUOTA DE 6,5
MG/ML DA PROTEÍNA CBHI INTEIRA (FIGURA DA ESQUERDA) E DO DOMÍNIO CATALÍTICO, OBTIDO POR DIGESTÃO
PARCIAL POR PAPAINAS (GEL DA DIREITA). PADRAO DE MASSA MOLECULAR (6/, 140 E 232 KDA)10/
FIGURA 31 - SEQUENCIA DA PROTEINA L'EMI DE 1. HARZIANUM COM A SEQUENCIA DE PEPTIDEOS IDENTIFICADOS POR
ESPECTROMETRIA DE MASSA DETACADOS EM NEGRITO
FIGURA 52 – ANALISE DA CLIVAGEM PARCIAL DA CDITI POR PAPAINA. UM DUMINIO DE CERCA DE 50 KDA (1) E OUTRO DE ADDOVIMADAMENTE 16 k Da (2) cão analisados em SDS-DACE 108
FICURA 33 - Coáfico de subedeície de desonsta (esoliedda) e coáfico de contodno (dideita) indicando eauxas
IDEAIS DE TEMPERATURA E PH NA ATIVIDADE DA ENZIMA CBHI COM SUBSTRATO AVICEL 110
FIGURA 34 - COMPARAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS INTEIRAS DA CBH1 DE <i>T. HARZIANUM</i> E DE <i>T. REESEI</i> . ALINHAMENTO FOI
REALIZADO COM O PROGRAMA CLUSTALW ¹²⁰ E COM ESPRIPT ¹²¹ 112
FIGURA 35 - CURVA DE ESPALHAMENTO EXPERIMENTAL DA CBH1 DE <i>T. HARZIANUM</i> . A) CURVAS DE ESPALHAMENTO
EXPERIMENTAL DEPOIS DA CONSTANTE DE POROD SUBSTRAÍDA PARA A CEL7A (CÍRCULOS ABERTOS COM BARRAS DE
ERRO) E O DOMÍNIO CATALÍTICO (CÍRCULOS FECHADOS COM BARRAS DE ERRO). INSERÇÃO CONTÉM PLOT DE GUINIER.
B) Função de distribuição de distância para a proteína e o domínio catalítico, os mesmos símbolos
FORAM USADOS
FIGURA 36 – CURVAS DE ESPALHAMENTO DE RAIOS-X E PROCEDIMENTO DE AJUSTE. A) CURVAS DE ESPALHAMENTO DE
SAXS PARA DOMÍNIO CATALÍTICO DA CE7A (CÍRCULOS ESCUROS COM BARRAS DE ERRO), CURVAS SIMULADAS
correspondentes ao DAM (linha tracejada) e da estrutura modelada por homologia. B) Curvas de
SAXS PARA A PROTEINA INTEIRA (CIRCULOS ABERTOS COM BARRAS DE ERRO). CURVAS SIMULADAS
CORRESPONDENTES AO DAM (LINHA TRACEJADA) E MODELO DE CORPO RIGIDO (LINHA SOLIDA)
FIGURA 37 – MODELOS DE SAXS. A) I RES POSIÇÕES ORTOGONAIS DO ENVELOPE <i>AB INITIO</i> PARA DOMINIO CATALITICO,
UBTIDU PUR DAMMIN (ESFERAS SUMBREADAS), SUBREPUSTAS A ESTRUTURA CRISTALOGRAFICA DU DUMINIU
CATALITICO DA COMI MODELADA POR HOMOLOGIA (DESENHOJ. DJI RES POSIÇÕES ORTOGONAIS DO ENVELOPE DE
SAAS AB INITIO PARA A COTTI INTEIRA, OBTIDA POR GASBOR (ESPERAS SOMBREADAS), SOBREPOSTAS AO MODELO DE
FIGURA 38 - FRACMENTO DE DNA DE 1500 PRAMPI JEICADO A PARTIR DE RIRI JOTECA DE CDNA DE T REESEJ 117
FIGURA 39 - TESTE DE DIGESTÃO POR ENZIMAS DE RESTRICÃO PARA CONFIRMAÇÃO DA INSERÇÃO DO FRAGMENTO NO VETOR
PPIC9K. 1) FRAGMENTO DE DNA COM TAMANHO CORRESPONDENTE AO TAMANHO DO VETOR PPIC9K LINEARIZADO
(9,3 kb); 2) FRAGMENTO DE DNA DE TAMANHO CORRESPONDENTE AO GENE DA SWOLENINA (1500 PB)
FIGURA 40 - GEL DE AGAROSE 0,8% COM 1) VETOR PPIC9k FECHADO; 2) VETOR PPIC9k LINEARIZADO (9,3 KB) E 3)
VETOR PPIC9k LINEARIZADO COM O GENE DA SWOLENINA (10,8 KB)
FIGURA 41 - SDS-PAGE 15% ACRILAMIDA COM SOBRENADANTE DO CULTIVO DE <i>P. PASTORIS</i> CONCENTRADO 10 VEZES.
Uma banda na região de 66 kDa indica expressão da proteín swolenina. Seta da esquerda indica banda
CORRESPONDENTE A PROTEÍNA SWOLENINA119
FIGURA 42 - SDS-PAGE COM PASSOS DA PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE. 1) MARCADOR DE MASSA
molecular; 2) fração injetada na coluna (extrato extracelular total); 3) Fração que não cola na
coluna (<i>flow trough</i>); 4) Lavagem sem imidazol; 5) Lavagem com 10 mM de imidazol; 6) Lavagem com

 100 mM de imidazol; 7) Eluição com 250 mM de imidazol. A seta da direita indica a banda com cerca de 66 kDa, provavelmente, a swolenina
FIGURA 44 – GEL COMPARATIVO ENTRE PRIMEIRA E SEGUNDA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES PARA CONFERÊNCIA DA ADIÇÃO DA
CAUDA DE CLONAGEM DA PLATAFORMA GATEWAY®
 FIGURA 46 – DIGESTÃO, COM BSRG1, DOS CLONES BP GERADOS NA PLATAFORMA GATEWAY® PARA CONFERÊNCIA DA INSERÇÃO DO GENE NO VETOR ANIP7G. 1) CONTROLE DO GENE DA CBHI PARA COMPARAÇÃO; 2) CBHI; 3) CBHII; 4) DOMÍNIO CATALÍTICO DA CBHI; 5) DOMÍNIO CATALÍTICO DA EGLI; 6) EGLI; 7) EGLII; 8) CONTROLE COM DICEETÃO DE VETOR VAZIO. SENDO LINEARIZADO SEM A LIBERAÇÃO DO CENE.
FIGURA 47 - DIGESTÃO, COM BSRG1, DOS CLONES LR GERADOS NA PLATAFORMA GATEWAY® PARA CONFERÊNCIA DA INSERÇÃO DO GENE NO VETOR ANIP7G. 1) DOMÍNIO CATALÍTICO DA CBHI; 2) DOMÍNIO CATALÍTICO DA EGLI; 3) EGLI; 4) EGLII; 5) CBHII; 6) CBHI E 7) CONTROLE COM DIGESTÃO DE VETOR VAZIO, SENDO LINEARIZADO SEM A LIBERAÇÃO DO GENE. EM CADA AMOSTRA É POSSÍVEL OBSERVAR, ALÉM DO GENE, O VETOR ANIP7G SENDO LINEARIZADO
FIGURA 48 – IMAGEM DE PLACA DE 24 POÇOS UTILIZADA NA SELEÇÃO DE COLÔNIAS POSITIVA (FOTO DA ESQUERDA) E DE FRASCO <i>ERLENMEYER</i> UTILIZADO PARA PRODUÇÃO EM MAIOR ESCALA (FOTO DA DIREITA). CULTURAS DE <i>A. NIGER</i> , NAS FOTOS, ESTÃO ESPORULANDO E COM 6 DIAS DE CULTIVO124
 FIGURA 49 - GEL DE POLIACRILAMIDA 15% COM ALÍQUOTAS DOS MEIOS DE CULTIVO COLETADOS COM 6 DIAS DE CRESCIMENTO. FORAM EXPRESSAS AS PROTEÍNAS: (1) CBHI; (2) EGLI; (3) EGLII; (4) CATEGLI; (5) CBHII E (6) CATCBHI. AS AMOSTRAS DESTACADAS COMO C REPRESENTAM O CONTROLE DO TOTAL DE PROTEÍNAS SECRETADO PELO <i>A. NIGER</i> QUANDO TRANSFORMADO COM VETOR ANIP7G SEM GENE INSERIDO (CONTROLE NEGATIVO)
FIGURA 51 - GEL DE POLIACRILAMIDA 15% COM AS FASES DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DA ENZIMA CBHII. DA ESQUERDA PARA A DIREITA FORAM APLICADAS AS AMOSTAS: (1) INJETADO (TOTAL); (2) MARCADOR DE PESO MOLECULAR: 66, 45, 39, 31, 20 E 12 KDA; (3) FRAÇÃO QUE NÃO LIGA A COLUNA (FT); (4, 5 E 6) 3 LAVAGENS COM 2 VC E (7, 8 E 9) 3 ELUIÇÕES COM 1 VC COM 150 MM DE IMIDAZOL.
FIGURA 52 - GEL DE POLIACRILAMIDA 15% COM AS FASES DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DA ENZIMA CBHII. DA ESQUERDA PARA A DIREITA FORAM APLICADAS AS AMOSTAS: (1) MARCADOR DE PESO MOLECULAR: 66, 45, 39, 31, 20 E 12 KDA; (2) INJETADO (TOTAL); (3) FRAÇÃO QUE NÃO LIGA A COLUNA (FT); (4, 5, 6 E 7) 4 LAVAGENS COM 2 VC E (8, 9 E 10) 3 ELUICÕES COM 1 VC COM 150 MM DE IMIDAZOL
FIGURA 53 - GEL DE POLIACRILAMIDA 15% COM A PURIFICAÇÃO DO DOMÍNIO CATALÍTICO DA EGLI EM COLUNA DE GEL FILTRAÇÃO. O TOTAL INJETADO NA COLUNA (2 E 3) E A FRAÇÃO COM O PICO CORRESPONDENTE A PROTEÍNA PURA (1) FORAM APLICADOS NO GEL. (4) MARCADOR DE MASSA MOLECULAR: 66, 45, 39, 31, 20 E 12 KDA127
FIGURA 54 – CROMATOGRAMA DE PURIFICAÇÃO EM COLUNA SUPERDEX 75 16/60. PICO PRINCIPAL CORRESPONDE À FRAÇÃO COM A PROTEÍNA PURA
FIGURA 55 – CROMATOGRAMA DE PURIFICAÇÃO EM COLUNA SUPERDEX 75 10/30. CALIBRAÇÃO DA COLUNA PERMITIU CÁLCULO DE MASSA MOLECULAR DA PROTEÍNA E INVESTIGAÇÃO DO ESTADO OLIGOMÉRICO NESSAS CONDIÇÕES. SETA A INDICA UMA POSSÍVEL FORMA DIMÉRICA DA PROTEÍNA
FIGURA 56 – SDS-PAGE (15% ACRILAMIDA) COM PROTEÍNA CATEGLI APRESENTANDO ALTO GRAU DE PUREZA
FIGURA 58 – PAINEL DE SUBSTRATOS TESTADOS QUANTO À HABILIDADE DA ENZIMA EM DEGRADAR A ESTRUTURA E LIBERAR
AÇUCAR REDUTOR
FIGURA 01 – ELETROFEROGRAMAS COM PERFIL DE DEGRADAÇÃO, PELA ENZIMA CATEGLI, DOS SUBSTRATOS CMC, B- GLUCANO E LIQUENANO (NA ORDEM DE CIMA PARA BAIXO), DEGRADADOS EM 15 MINUTOS OU 15 HORAS (ESQUERDA E DIREITA, RESPECTIVAMENTE)

FIGURA 62 – GRÁFICO COM RESULTADOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATEGLI FRENTE A DIFERENTES PHS E	
TEMPERATURA	133
FIGURA 63 – GRÁFICO APRESENTANDO A INFLUÊNCIA DO PH NA ATIVIDADE DA ENZIMA CATEGLI.	134
FIGURA 64 – ESPECTRO DE FLUORESCÊNCIA EMITIDA EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA EM ENSAIO DE DESLOCAMENTO	
térmica (termal shift). As temperaturas de <i>melting</i> (T _m), para cada pH estão indicadas	135
FIGURA 65 – ESPECTRO DE CD DO DOMÍNIO CATALÍTICO DA EGLI EM DIFERENTES PHS.	136

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - VALORES CODIFICADOS E REAIS PARA OS DIFERENTES TRATAMENTOS COMBINANDO TEMPERATURA E PH	71
TABELA 2 - OLIGONUCLEOTÍDEOS DESENHADOS PARA AMPLIFICAÇÃOO DOS GENES E TECNOLOGIA EMPREGADA NA	
CLONAGEM	79
TABELA 3 – Composição do bagaço de cana-de-açúcar e celulignina parcialmente deslignificada depois de	PRÉ-
TRATAMENTO ÁCIDO SEGUIDO DE PRÉ-TRATAMENTO COM NAOH 4%	97
TABELA 4 – GRAUS DE CRISTALINIDADE DEPOIS DE PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO SEGUIDO POR TRATAMENTO COM	
CONCENTRAÇÕES VARIÁVEIS DE NAOH (CALCULADO EM BASE SECA)	99
TABELA 5 - RENDIMENTO DE HIDRÓLISE (%) POR CELULASES DE TRICHODERMA HARZIANUM (T) E ENZIMA COMERCIAL	
Multifect (M). Concentração de sólidos 25 g/L (celulignina com 70 % celulose)	100
TABELA 6 – ATIVIDADES DE CELULASES QUANTIFICADAS NOS PREPARADOS ENZIMÁTICOS UTILIZADOS NOS TESTES DE	
HIDRÓLISE DA CELULIGNINA	102
TABELA 7 - RESPOSTA AOS TRATAMENTOS (VARIAÇÃO DE TEMPERATURA E PH)	109
TABELA 8 - ANOVA	110
TABELA 9 - PARÂMETROS ESTRUTURAIS DA CBH1 INTEIRA E DO DOMÍNIO CATALÍTICO DE <i>T. HARZIANUM</i> OBTIDOS POR	
SAXS	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFEX	Ammonia fiber explosion
ART	Açúcar redutor total
BSA	Albumina de soro bovino
CBH	Celobiohidrolase
CBM	Domínio de ligação a celulose
CCD	Domínio catalítico
CMC	Carboximetil celulose
DCCR	Delineamento Central Composto Rotacional
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNS	Ácido dinitrosalisílico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
DTT	Ditioteritol
EDTA	Ethilenediamine tetraacetic acid
EGL	Endoglucanases
ERAD	Degradação de Proteína associada ao RE
EtBr	Brometo de etídeo
FPLC	Cromatografia Líquida de Rápida Performance
FPU	Unidade de Papel Filtro
GH	Glicosil hidrolases
GlcNac	N-acetilgucosamina
GOD	Glicose oxidase
GRAS	Geralmente Reconhecido como Seguro
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Man	Manose
NREL	Laboratório de Energia Renovável dos EUA
PDA	Potato Dextrose Agar
PEG	Polietilenoglicol
PMF	Peptide Mass Fingerprinting
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
RE	Retículo endoplasmático
SAXS	Espalhamento de raios-X a baixo ângulo
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polycrylamide gel electrophoresis
tRNA	transfer RNA (ribonucleic acid)
UPR	Resposta de Proteína Desenovelada
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

graus Celsius
mililitro
rotações por minuto
minuto
horas
dalton
micrômetro
micromolar
nanômetro
cobre
comprimento de onda
angstrom
potencial hidrogeniônico

SUMÁRIO

<u>1</u> I	NTRODUÇÃO	31
1.1	ETANOL COMO BIOCOMBUSTÍVEL DE TRANSPORTE	31
1.1.1	ETANOL DE PRIMEIRA GERAÇÃO	32
1.1.2	E ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO	32
1.2	BIOMASSA	33
1.3	O BAGAÇO DA CANA COMO BIOMASSA PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL	36
1.4	PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	36
1.5	SACARIFICAÇÃO POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	37
1.6	FATOR HIDROLÍTICO DO COMPLEXO CELULOLÍTICO	38
1.6.1	ESTRUTURA E MECANISMO DE AÇÃO DAS CELULASES	40
1.7	FATOR NÃO HIDROLÍTICO DO COMPLEXO CELULOLÍTICO: PROTEÍNAS AUXILIADORAS - SWOLE	NINAS
10	41 Γρασταίο το προστρίνιας που ευνίζος εμιανένσος ει ενερινμάς	4 5
1.8	SECREÇAU DE PROTEINAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS E LEVEDURAS	45
1.9	GLICOSILAÇÃO	40
1.10	FUNGUS PRODU I URES DE CELULASES E PRU I EINAS AUXILIADURAS	40
1.10.	1 I RICHUDERMA HARZIANUM	48
1.11	INTRODUÇAO A EXPRESSAO HETEROLOGA	49
1.11.	.1 O GENERO ASPERGILLUS	53
<u>2</u> I	USTIFICATIVA	55
3 (DBIETIVOS	57
<u> </u>		
3.1	OBJETIVO GERAL	57
3.2	UBJETIVOS ESPECIFICOS	57
<u>4 M</u> /	ATERIAIS E MÉTODOS	59
4.10	Cultivo do fungo <i>T. harzianum</i> em estufas com agitação	59
4.20	CULTIVO DO FUNGO <i>T. HARZIANUM</i> EM BIOREATOR	59
4.3	ENSAIOS DE ATIVIDADES	60
4.3.1	QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCAR REDUTOR TOTAL COM ÁCIDO 3,5 DINITROSALICÍLICO (DNS)	60
4.3.2	QUANTIFICAÇÃO DE GLUCOSE POR KIT DE GLICOSE OXIDASE (GOD)	61
4.3.3	ENSAIO DE ATIVIDADE DE ATIVIDADE DE B-GLICOSIDASE	61
4.3.4	ENSAIO DE ATIVIDADE DE ENDOGLUCANASE	61
4.3.5	ENSAIO DE ATIVIDADE DE FPASE	62
4.3.6	ENSAIO DE ATIVIDADE DE EXOGLUCANASE OU AVICELASE	62
4.3.7	' ENSAIO DE ATIVIDADE DE XILANASE	62
4.4	PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	63
4.4.1	PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	63
4.4.2	ANÁLISE COMPOSICIONAL DO BAGAÇO IN NATURA E PRÉ-TRATADO	63
4.4.3	ANÁLISE DA CRISTALINIDADE DO BAGAÇO PRÉ-TRATADO	64
4.4.4	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM DIFERENTES PREPARADOS ENZIMÁTICOS	65
4.4.5	ANÁLISE DOS AÇÚCARES LIBERADOS POR HPLC	66
4.4.6	ANÁLISE DO EFEITO DE BSA NA EFICIÊNCIA DE HIDRÓLISE	66
4.5	GEL BI-DIMENSIONAL PARA CARACTERIZAÇÃO DO SECRETOMA DE <i>T. HARZIANUM</i>	66
4.6	CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA EXO-1,4-B-D-GLUCANASE (CELOBIOHIDROLASE I - EC: 3.2.1.	91) DE
Т. НА	IRZINAUM	68
4.6.1	Purificação da CBHI	68
4.6.2	DIGESTÃO DA CBHI COM PAPAÍNA PARA SEPARAÇÃO DOS DOMÍNIOS CATALÍTICO E CBM	69
	,	

4.6.3	Eletroforese em gel nativo (em condições não desnaturantes)	69
4.6.4	DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE ATIVIDADE QUANTO AO PH E A TEMPERATURA POR	
DELIN	EAMENTO CENTRAL COMPOSTO ROTACIONAL (DCCR).	69
4.6.5	ESTUDOS DE ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO (SAXS)	71
4.6.5.	1 Condições dos experimentos	71
4.6.5.	2 Análise dos dados de SAXS	72
4.6.5.	3 Cálculo da massa molecular	72
465	4 Modelo ab initio	73
465	5 Modelagem nor Homologia dos domínios catalítico (CCD) e de ligação (CBM)	73
465	6 Modelo de corpo rígido	74
47	FYDDESSÃO HETEDÓLOCA	74
471	ΕΧΙ ΚΕΙΞΑΙΟ ΠΕΤΕΝΟΙΟΘΑ ΕΥΔΡΕΣΣΙΩ Η Η ΠΕΤΕΝΟΙΟΘΑ	74
<i>1</i> , <i>7</i> ,1	1. Clonagem do gene da swolenina de T. reesei em vetor de expressão para P. nastoris	75
л.7.1. Л 7 1	 2 Transformação de cálulas de P. nastoris 	75
4.7.1	2 Transformação de cultars de L. pastoris 2 Expressão de guelenino de T. recesoi em D. nectoris	75
4./.1.	A nólica da avarcação da gualanina da T. reasoi am D. nastoria	76
4./.1.	 Analise da expressão da swolenina de 1. recsei en r. pastoris Teste de numíficação nor promotografio do ofinidado do protoíno curregas 	70
4./.1.	S Teste de putiticação por cromatograna de anindade da proteina expressa	77
4.7.2	EXPRESSAU HETEROLOGA EM ASPERGILLOS NIGER	//
4.7.2.	Clonagem dos genes da CBHI, CBHII e EGLI (de 1. narzianum) e EGLII (de 1. reesei)	//
4./.2.	1.1 Plataforma de clonagem por Gateway®	80
4.7.2.	1.2 Preparo de bactéria competente e transformação do DNA	83
4.7.2.	1.3 Clonagem por LIC (Ligation Independent Cloning)	83
4.7.2.	2 Transformação dos clones em protoplasto de A. niger (cepa pyl1)	86
4.7.2.	2.1 Preparação do protoplasto	86
4.7.2.	2.2 Transformação do protoplasto de <i>A. niger</i>	87
4.7.2.	2.3 Teste de expressão dos transformantes selecionados	87
4.7.2.	3 Caracterização das proteínas expressas	88
4.7.2.	3.1 Produção das enzimas	88
4.7.2.	3.2 Purificação da enzima CBHII e do domínio catalítico da EGLI de T. harzianum e	da
EGLII	de T. reesei	89
4.7.2.	4 Caracterização do domínio catalítico da EGLI (catEGLI), uma Cel5A de T. harzianum	89
4.7.2.	4.1 Teste de estabilidade – atividade residual	90
4.7.2.	4.2 Gel nativo	90
4.7.2.	4.3 Painel de substratos	90
4.7.2.	4.4 Eletroforese Capilar de Zona (CZE)	91
4.7.2.	4.5 Teste de temperatura e pH ótimos	92
4.7.2.	4.6 Experimento de Deslocamento Térmico (Thermal shift)	92
472	4.7 Ensaio de Dicroísmo Circular (CD)	93
		10
<u>5 R</u>	ESULTADOS	95
5.1	C INÉTICA DE PRODUCÃO DAS ENZIMAS PELO FUNGO T . <i>HARZIANUM</i>	95
52	ΕΧΡΕΡΙΜΕΝΤΟ DE ΗΙDΡΟΊ ISE ΕΝΖΙΜΑΣΤΑΔΟΤΟΝΟΟΤΗΜΑΔΑΝΟΝ	96
521	PRÉ-TRATAMENTO DO RACACO DE CANA-DE-ACÚCAR	96
522	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DO BACAÇO EL CANA DE AÇOCAR ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DO BACACO IN NATURA E DA CELULIONINA DARCIALMENTE DESLICULEIC	יי אחא
5.2.2	97	ЪЛ
523	ANÁLISE DA CRISTALINIDADE DAS AMOSTRAS. DE RACACO	98
524	HIDRÓLISE EN CRISTMENTICA DO BAGACO DE CANA-DE-ACIÍCAR POR DIFERENTES PREPARADOS	70
FN7IM		ga
575	ΤΕΩΤΕΣ ΠΕ ΗΙΠΡΛΊ ΙSE EM RACACOS COM DIEEDENTES CRAIIS DE DESI IONIEICAÇÃO	102
526	τεστέσ με πηλαθίσε εμί δαυάζου συμι στέκει τες υκαύς με μεσειυτικό και το το Γεριτό το RSA να ερισιρνοία το μπράι κε το Racaco com Diferentes Coalis το	102
DECL	ELET O DE DOM NA ELICIENCIA DE HIDROLISE DO DAGAÇO COM DIFERENTES URAUS DE CNIEICACÃO	102
L J DESPI	υπητισήμαυ Γει 2D δο έντρατο έντραςει μιας δε Τ. μαργιανιμά	103
5.5 E /	UEL 2D DU EATKATU EATKALELULAK DE T. HAKZIANUM	104 105
5.4	UAKAU I EKILAÇAU DA UDIT	102

5.4.1 PURIFICAÇÃO DA CEL7A (CBHI) DE <i>T. HARZIANUM</i>	105
5.4.2 GEL NATIVO DA PROTEÍNA CBHI DE <i>T. HARZIANUM</i>	106
5.4.3 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA	107
5.4.4 DELINEAMENTO CENTRAL COMPOSTO ROTACIONAL (DCCR)	108
5.4.5 ESTUDOS DE ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO (SAXS)	111
5.4.5.1 Análise de dados de SAXS revelam uma conformação semiestendida da Cel7A	111
5.4.5.2 Forma molecular ab initio da Cel7A e as posições relativas dos seus domínios	113
5.5 EXPRESSÃO HETERÓLOGA	116
5.5.1 EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM <i>PICHIA PASTORIS</i>	116
5.5.1.1 Amplificação da região codificadora do gene da swolenina de T. reesei	116
5.5.1.2 Clonagem do gene da swolenina de T. reesei em vetor de expressão pPIC9k de Pichia	
pastoris 117	
5.5.1.3 Preparo do DNA para transformação em P. pastoris	118
5.5.1.4 Teste de expressão heteróloga da proteína swolenina de T. reesei em P. pastoris GS115	119
5.5.1.5 Teste de purificação por cromatografia de afinidade da proteína expressa	120
5.5.2 EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM ASPERGILLUS NIGER	120
5.5.2.1 Amplificação dos genes	120
5.5.2.2 Clonagem dos genes no vetor Anip7G	122
5.5.2.3 Testes de expressão das enzimas por A. niger	123
5.5.2.4 Caracterização inicial das enzimas expressas	124
5.5.2.4.1 Confirmação da identidade por espectrometria de massa	124
5.5.2.4.2 Purificação das enzimas CBHII, EGLII e o domínio catalítico da EGLI	126
5.5.2.5 Caracterização do domínio catalítico da EGLI de T. harzianum	127
5.5.2.5.1 Gel nativo	129
5.5.2.5.2 Painel de substratos	130
5.5.2.5.3 Eletroforese Capilar de Zona (CZE)	131
5.5.2.5.4 Temperatura e pH ótimos	133
5.5.2.5.5 Teste de estabilidade – atividade residual	134
5.5.2.5.6 Experimento de Deslocamente Térmico (Thermal shift)	134
5.5.2.5.7 Ensaio de Dicroísmo Circular (CD)	135
<u>6</u> <u>DISCUSSÃO</u>	<u>137</u>
7 <u>CONCLUSÕES</u>	147
REFERÊNCIAS*	<u>151</u>

1 INTRODUÇÃO

Fontes de energia de hidrocarbonetos como carvão, petróleo e gás natural representam uma limitada e não renovável fonte de abastecimento. Nesse contexto, o aumento da população mundial juntamente com o aumento por subsídios básicos, como alimentos e eletricidade, têm tomado dimensões cada vez mais preocupantes. Contudo, estudos que buscam um melhor aproveitamento de biomassas para suprir tais necessidades tornam-se urgentes e necessários¹.

1.1 Etanol como biocombustível de transporte

O etanol é um exemplo de como sistemas biológicos têm tido sua eficiência significativamente aumentada². Ele surgiu como biocombustível alternativo e como grande produto biotecnológico, pela diminuição da dependência do óleo, a redução de custos, a criação de empregos na área rural e a redução da poluição do ar. Segundo informações da GRFA (*Global Renewable Fuels Alliance*) cerca de 23,4 bilhões de galões (88,7 bilhões de Litros) foram produzidos em 2011 no mundo, o que substituiu a necessidade por 1 milhão de barris de óleo cru por dia (http://www.globalrfa.org). Só no Brasil, a demanda por etanol, em 2010, foi de 25 bilhões de Litros (http://www.newenergyfinance.com).

O etanol é utilizado em motores de combustão como substituinte ou aditivo ao petróleo. Quando utilizado como aditivo ele aumenta a taxa de octano no combustível, reduzindo ou eliminando a necessidade por octano tóxico e aumentando a disponibilidade de aditivos como benzeno. Embora o etanol possua um conteúdo volumétrico de cerca de 2/3 do petróleo, sua mais alta eficiência de combustão leva a uma eficiência volumétrica de cerca de 78-80% do petróleo. Vale aqui ressaltar que mais de 80% dos carros produzidos no Brasil, hoje, são combustível flex, ou seja, capazes de operar qualquer mistura de petróleo e etanol até uma concentração de 100% de etanol, o que fortalece o aumento na demanda por esse combustível. Ainda, hoje a gasolina utilizada nos carros no Brasil contém 20% de etanol (http://www.newenergyfinance.com). O etanol pode ser produzido sinteticamente do petróleo ou por conversão de biomassa pela fermentação. Esta geralmente se dá em três passos: a formação de uma solução de açúcares fermentáveis, a fermentação desses açúcares a etanol e a separação e purificação do etanol, geralmente por destilação ³.

1.1.1 Etanol de primeira geração

O etanol considerado de primeira geração é produzido, principalmente, de matéria prima baseada em amido tais como milho e trigo, ou no açúcar de cana-de-açúcar e melaço. Amido e sucrose são, nesses casos, hidrolisados a monômeros de hexose, os quais são facilmente fermentados a etanol por organismos de fermentação convencionais (http://www.iea.org/).

Contudo, através de estimativas da demanda global por combustíveis de transporte, acredita-se que de 2011 a 2030, será adicionado mais 10% de etanol à gasolina (além dos 20% utilizados hoje), o que será suprido pelo etanol de segunda geração (http://www.newenergyfinance.com).

1.1.2 Etanol de segunda geração

Combustíveis de segunda geração utilizam materiais lignocelulósicos de baixo valor econômico e normalmente produzidos ou existentes em mais altas quantidades que as requeridas no local de produção, como os provenientes de resíduos agroindustriais ou das plantações dedicadas à produção de etanol. Biomassa lignocelulósica compreende, normalmente, polímeros de celulose (34-47%), hemicelulose (24-29%) e lignina (18-28%) (cálculo em base seca). Ambos celulose e hemicelulose podem ser pré-tratados e hidrolisados a açúcares fermentescíveis.

1.2 Biomassa

O entendimento da conversão de biomassa a etanol depende do conhecimento da complexidade química e estrutural desses três principais polímeros que compõem a parede celular das plantas: lignina, celulose e hemicelulose (Figura 1).



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

A lignina é um polímero amorfo natural composto de unidades de olignol fenilpropano com substituições hidroxil e carbonil. Há três principais unidades de fenilpropano que são o p-hidroxifenil, o guaiacil e o siringil, os quais diferem na substituição do metil do anel aromático. A estrutura da lignina que é extraída da biomassa é dependende tanto do tipo da planta quanto do processo usado na deslignificação⁴.

Em um material lignocelulósico a lignina é covalentemente ligada à celulose e hemicelulose e sua função primária é promover o suporte estrutural da planta. Uma característica é não possuir moléculas de açúcar mas, sim, envolver as moléculas de açúcar da celulose e

hemicelulose, tornando-as de difícil acesso. Esse polímero promove à parede celular da planta uma alta resistência à degradação, criando um desafio a essa matéria prima quanto ao seu uso como substrato para a produção de biocombustível ⁵.

A hemicelulose é também composta por longas cadeias de moléculas de açúcar, mas contém, principalmente, pentoses (açúcar de 5 carbonos). A composição de açúcar da hemicelulose pode variar dependendo do tipo da planta e normalmente é ramificado e com menor grau de polimerização em relação à celulose. A hemicelulose não é cristalina e por isso é de muito mais fácil digestibilidade que a celulose. Xilano (Figura 2) é a mais abundante das hemiceluloses, ele compreende uma estrutura linear de resíduos de D-xilopiranose unidos por ligações glicosídicas β (1-4), nos quais, dependendo da origem, podem apresentar ramificações de resíduos como acetil, arabinosil e gliconosil⁶.



Figura 2 – Estrutura da hemicelulose xilano formada por polímeros de D-xilopiranosil unidos por ligações glicosídicas β (1-4).

Há um grande interesse na hidrólise enzimática do xilano devido às possíveis aplicações na produção de químicos e combustíveis e na manufatura do papel. Como a pentose compreende uma alta porcentagem dos açúcares disponíveis, a habilidade de fermentá-los a etanol é importante tanto para a eficiência quanto para a economia do processo. Recentemente, microrganismos específicos têm sido geneticamente modificados para fermentar açúcar de cinco carbonos a etanol com relativa alta eficiência⁷.

A celulose (**Figura 3**), por sua vez, consiste no mais abundante e renovável polímero da Terra e tem sido utilizada pelos homens há séculos. Ela corresponde de um terço a metade do tecido das plantas e é constantemente ressintetizada pela fotossíntese, a partir de dióxido de carbono e água, com uma biossíntese anual estimada em 10^{11} toneladas ⁸. A celulose é formada

por moléculas de glicose como as do amido, porém tem uma configuração diferente. A celulose é um homopolímero linear formado por unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas β (1-4). Existem diferenças estereoquímicas entre os resíduos de glicose adjacentes, de forma que a unidade de repetição da fibra de celulose é formada pela união de duas moléculas de glicose, uma na forma alfa e outra na forma beta, constituindo o dissacarídeo chamado celobiose (**Figura 3**)⁹.



Figura 3 – Apresentação da estrutura da celulose. 1) O dissacarídeo celobiose e 2) Seu epímero C4, o lacotside⁹.

Dependendo do grau de ligações de hidrogênio dentro e entre as moléculas de celulose, esse polissacarídeo pode ser encontrado na forma cristalina ou paracristalina (amorfa). Essa biomassa lignocelulósica representa uma potencial fonte renovável de açúcares para fermentação à biocombustíveis e outros biomateriais de interesse. No entanto, seu enorme potencial como fonte renovável de energia foi reconhecido somente depois que enzimas que o degradam, as celulases, foram identificadas¹⁰.

Várias tecnologias têm sido desenvolvidas nos últimos 80 anos para permitir que esse processo de conversão ocorra e agora o objetivo está em tornar tal processo custo competitivo no mercado mundial atual¹¹, considerando o rendimento teórico obtido de etanol a partir de biomassa fica em torno de 270-300 L/t de matéria-prima (base seca)¹².

1.3 O Bagaço da cana como biomassa para a produção de etanol

Brasil e Índia dominam a produção mundial de cana-de-açúcar, crescida nas regiões tropicais e subtropicais de todo o globo. A principal aplicação da cana-de-açúcar no mundo é a produção de açúcar cristal para consumo humano. No entanto, em vários países, como no Brasil, uma parte da plantação é destinada à produção de etanol, ou, ainda, o melaço, produto da produção de açúcar, também é utilizado para produção de etanol. No caso de etanol de segunda geração o bagaço é também reutilizado para um maior aproveitamento da biomassa e também destinado à produção de etanol além da queima para geração de energia elétrica. É possível gerar aproximadamente 280 litros de álcool a partir de uma tonelada de bagaço de cana com as tecnologias atuais¹³.

1.4 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

Para que o processo de hidrólise enzimática ocorra é necessário que a enzima tenha acesso às moléculas a serem hidrolizadas. Para isso alguns pré-tratamentos são exigidos, com o objetivo de aumentar a porosidade do material, desestruturar a estrutura cristalina da lignocelulose, diminuir a recalcitrância ao ataque enzimático e remover a lignina, expondo as moléculas de celulose e hemicelulose¹⁰.

Diferentes tecnologias de pré-tratamento já foram estabelecidas e muitas ainda estão em desenvolvimento. O pré-tratamento pode ser químico, físico ou biológico, ou, ainda, uma combinação entre os três. Pré-tratamento químico normalmente consiste em utilização de ácido (concentrado ou diluído), alta ou baixa temperatura para remoção preferencial da fração de hemicelulose seguido de tratamento alcalino para dissolver parcialmente a fração de lignina. O tratamento alcalino é capaz, por si só, de remover ambos lignina e hemicelulose, e, ainda, os produtos da degradação têm menor impacto inibitório ao processo de fermentação em relação ao tratamento ácido. Outra vantagem do tratamento alcalino é, pelo fato de ser menos corrosivo, exigir equipamentos, como os reatores, de materiais significativamente mais baratos. No entanto,
o custo da soda cáustica, levando tudo em consideração, é ainda cerca de 4x mais alto que o do ácido, tornando o processo inviável economicamente¹⁴.

Outro processo químico bastante comentado é o organossolve, que utiliza etanol aquoso em altas temperaturas para dissolver a lignina e representa um método de baixo custo em relação ao alcalino¹⁵. Além desses processos químicos, entre outros, existe o pré-tratamento físico de explosão a vapor, que consiste em aquecer a biomassa úmida sob pressão, para manter a água dentro das fibras na fase líquida, e então despressurizar rapidamente para promover uma explosão do material, hidrolisando a hemicelulose mas não interferindo na estrutura da lignina. Isso pode ser feito na presença de ácido (catalisada por ácido) ou na ausência (autohidrólise)¹⁶. O processo de explosão realizado na presença de amônia (AFEX – *ammonia fibre explosion*) também pode ser uma escolha e nesse caso não hidrolisa a hemicelulose nem solubiliza a lignina, mas apenas promove uma mudança na estrutura da biomassa¹⁶.

1.5 Sacarificação por hidrólise enzimática

Há três tipos básicos de produção de açúcar fermentescível a partir da biomassa: hidrólise ácida, hidrólise enzimática e termoquímica. Na hidrólise enzimática as enzimas apresentam uma função crítica na conversão de resíduo lignocelulósico em combustíveis e químicos, mas o alto custo dessas proteínas representa uma barreira significativa à comercialização. Tal custo consiste, basicamente, na grande quantidade de enzima necessária. Significativos esforços têm sido despendidos nos últimos anos com o objetivo de reduzir custos focando no melhoramento de enzimas conhecidas, na identificação de enzimas novas e na criação de misturas adequadas de enzimas para selecionados substratos pré-tratados (www.novozyme.com).

A função de enzimas em muitos processos é conhecida desde a antiguidade. Sua existência está associada com a história da Grécia Antiga onde se usavam enzimas de microrganismos na produção de álcool e queijos. Com o aprofundamento no conhecimento dessas enzimas e dos métodos de expressá-las e purificá-las, o número de aplicações tem aumentado fortemente¹⁷. Os maiores consumidores deste mercado são as indústrias de

detergentes, alimentos e rações, papel e celulose, química fina e fármacos, seguidas de perto pela indústria têxtil e de manufatura de couros¹⁸.

Apesar do alto custo da utilização de enzimas, suas vantagens em diversos campos são tão valiosas que uma variada gama de indústrias as utiliza em seus processos, movimentando, anualmente, um mercado de aproximadamente U\$ 1,5 bilhões¹⁹. Entre as vantagens de um processo enzimático estão a sua alta eficiência, o fato de as condições do processo não requerem materiais de alto custo e a relativa baixa energia necessária¹⁷.

De acordo com teorias a respeito do mecanismo de hidrólise da celulose por complexos celulolíticos de diferentes microrganismos, existem dois componentes responsáveis pelo trabalho de liberar os açúcares fermentescíveis das microfibrilas da celulose. O componente 1 (C1) é chamado fator "swolen" ou fator não hidrolítico e seria o responsável por tornar o substrato mais acessível ao compontente Cx, ou fator hidrolítico²⁰. Este, por sua vez, é composto pelas celulases, que degradam a celulose à glicose²¹.

Essas enzimas pertencem a classe das glicosil hidrolases-GH (EC: 3.2.1.-) e clivam ligações glicosídicas. Uma classificação bastante utilizada para GHs é baseada na similaridade das sequências de aminoácidos e em análises de sítios hidrofóbicos e separa essas enzimas em 112 famílias de glicosil hidrolases (http://www.cazy.org/)^{22; 23}

1.6 Fator hidrolítico do complexo celulolítico

A bioconversão de celulose a açúcares solúveis e glicose é catalizada por um grupo de glicosil hidrolases chamadas celulases e β-glucosidases.

Celulases podem ser divididas em duas categorias: exocelulases e endoglucanases. As exoglucanases podem ser de dois tipos : 1,4- β -D-glucana-glucanohidrolases - E.C.3.2.1.74 e 1,4- β -D-glucana-celobiohidrolases - E.C.3.2.1.91 - CBHs, que hidrolisam a fibra de celulose das extremidades redutora ou não redutora para o centro da fibra. As endoglucanases (1,4- β -D-glucana-4-glucanohidrolases - E.C.3.2.1.4 – EGL) hidrolisam aleatoriamente as ligações no interior da cadeia e essas duas classes de celulases reduzem as fibras de celulose até celodextrinas na fração líquida, com grau de polimerização de até 6 glucoses (solúvel). Há, ainda, a terceira

classe envolvida na hidrólise da celulose, são as beta-glicosidases (E.C. 3.2.1.21), componentes do complexo celulolítico que hidrolisam as moléculas de celobiose e celodextrinas à glicose (**Figura 4**)²⁴. Endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidases exibem considerável grau de sinergismo, propriedade que confere uma maior eficiência de ação quando as enzimas atuam em conjunto em relação a quando estão separadas. Entre endoglucanases e exoglucanases existe o mais estudado tipo de sinergismo e o importante para hidrólise da celulose cristalina. Contudo, outros tipos de ação complementar também ocorrem, como entre duas endoglucanases ou entre exocelulases e β -glucosidases, entre outros^{25; 26; 27}.

As exocelulases (celobiohidrolases e glucanohidrolases), podem ser de dois tipos: as que removem uma molécula de glicose ou celobiose da extremidade da cadeia e se desassociam da fibra de celulose para adsorverem em outro local e as que hidrolisam processivamente a mesma cadeia. Do ponto de vista prático, as enzimas processivas são as mais interessantes pelo fato de apresentarem um maior potencial de realizarem a hidrólise mais rapidamente ²⁸. Dentre as celobiohidrolases há dois tipos: as enzimas do tipo I (CBH I – GH7A) hidrolisam terminais redutores, enquanto que as do tipo II (CBH II – GH6A

(celobiose).



Figura 4 - Esquema representando as celulases e β-glucosidases interagindo com as fibras de celulose e oligômeros. Detalhes destacam as regiões amorfas e cristalinas da celulose. Figura produzida pela Dr. Daniela Trivella.

O complexo de celulases é um sistema de enzimas induzível. Apesar de os microrganismos estudados até hoje terem produzido mais altos níveis de celulase quando crescidos em meio com celulose, a expressão do sistema celulolítico também se dá pela presença de celobiose, lactose ou sefarose no meio de cultura, para alguns fungos. Compostos sintéticos como palmitato e ésteres de dissacarídeos e tiocelobiose também têm demonstrado atuar como indutores da produção de celulases. Dessa forma há uma considerável variação no nível de transcrição e no tipo de genes de celulases que serão transcritos dependendo da fonte de carbono usada para o crescimento²⁹. Por outro lado, a repressão catabólica de carbono é um dos mecanismos regulatórios conhecidos para controlar a produção de celulase em fungos e bactérias. Nesse caso o produto final da hidrólise de celulose interage com uma proteína celular para formar um complexo que impedirá a transcrição do gene relacionado à celulase ³⁰.

1.6.1 Estrutura e mecanismo de ação das celulases

Estudos de proteólise parcial da celobiohidrolase I (CBHI) de *T. reesei* demonstraram um padrão morfológico, encontrado na grande maioria das celulases, composta de dois distintos, mas conectados, domínios, sendo o C-terminal um módulo de ligação à celulose (CBM), e um segundo, N-terminal, um domínio catalítico (CCD), o qual é responsável pela quebra enzimática dos substratos³¹ (**Figura 5**). Esses domínios são unidos por um peptídeo flexível, O-glicosilado e rico em prolinas, serinas e treoninas. Tem sido demonstrado que a atividade enzimática é prejudicada quando o linker é reduzido ou deletado, sugerindo que o comprimento do linker é importante para garantir flexibilidade e ação independente desses dois domínios ³².

Um dos modelos que descrevem o mecanismo de ação da enzima sobre a celulose indica que a celobiohidrolase adsorve na fibra de celulose e translada sobre esta em um movimento típico de lagartas, com o CBM (de menor massa) sendo puxado pelo domínio catalítico a cada ciclo de hidrólise, e fazendo com que o conjunto se movimente cerca de uma unidade de celobiose adiante. A função do CBM, de acordo com esse modelo, seria aumentar a concentração de enzimas no substrato insolúvel facilitando o processo de adsorção da enzima à fibra³³.



Figura 5 – Estrutura da celulase com seus dois domínios unidos pela região ligadora (linker). No esquema,o domínio catalítico interage com uma fibra da molécula de celulose e os sítos de glicosilação são apresentados.

O mecanismo de ação para todas as celulases envolve doação parcial de próton pelo grupo ácido carboxílico da enzima. A hidrólise ocorre com retenção ou inversão da configuração do carbono anomérico, dependendo da natureza do núcleofilo. Se o nucleófilo é um grupo carboxilato da enzima, então um mecanismo de duplo deslocamento ocorre³⁴.

1.7 Fator não hidrolítico do complexo celulolítico: proteínas auxiliadoras - swoleninas

As células vegetais secretam um tipo de proteínas chamadas expansinas durante o seu crescimento, as quais desassociam a rede de polissacarídeos da parede celular permitindo a extensão da célula. Acreditava-se que o mecanismo de extensão da parede celular ocorria devido a hidrólise da matriz celular, porém, a descoberta das expansinas revelou um outro mecanismo de expansão, o qual se dá por deslocamento do local de adesão entre as microfibrilas de celulose e os demais polissacarídeos da parede permitindo o relaxamento ou a tensão desses glicanos e aumentando, assim, as distâncias entre as microfibrilas³⁵ (**Figura 6**). Todo esse trabalho é realizado, basicamente, dissociando as ligações de hidrogênio existentes entre a celulose ou entre a celulose e outros polissacarídeos da parede celular, sem hidrolisá-los³⁶ (**Figura 7**).

Foi observado que algumas expansinas são funcionais durante o amadurecimento das frutas, o que indica uma possível ação auxiliadora das enzimas que hidrolisam os polímeros da parede celular e sugere uma grande contribuição dessa família de proteína para uma completa eficiência de um coquetel para hidrólise da celulose.



Figura 6 – Modelo de ação do afrouxamento da parede celular pelas expansinas. Microfibrilas de celulose são conectadas umas às outras por glicanos (fitas amarelas e vermelhas) que prendem as superfícies das microfibrilas de celulose umas as outras. Acredita-se que a proteína expansina (em azul) (a) dissocie as ligações entre os polissacarídeos sobre o estresse mecânico de turgor e desloque os pontos de adesão dos polímeros (b e c)³⁵.



Figura 7 - Modelo simplificado da parede celular das plantas e seu afrouxamento realizado pelas expansinas. α-Expansinas (EXPA) trabalham nos xiloglucanos enquanto as β-expansinas (EXPA) atuam sobre glicanos diferentes. EXLA e EXLB são proteínas como expansinas, também secretadas pela parede celular³⁷.

Recentemente foram isolados genes de fungos filamentosos com similaridade com genes para expansinas de plantas²⁰. Existem, ainda, proteínas quimeras como a identificada para uma

bactéria gram positiva, a *Clavibacter michiganensis*. Ela consiste de uma endoglucanase associada a um domínio tipo expansina e foi identificada a partir de uma sequência de aminoácidos de CelA de *Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis e C. michiganensis ssp. Spedonicus*. Acredita-se que sua função esteja relacionada à interação com microfibrilas da celulose. Com base na sua similaridade, o domínio catalítico da CelA pode ser colocado na família A das celulases, também conhecida como GH 5³⁸. Um outro bom exemplo de construções como essa, que tiram vantagens do domínio expansina, é a quimera entre um domínio como expansina de uma proteína swolenina de *T. reesei* e a enzima feruloil esterase A de *Aspergillus niger* que rendeu um aumento de 50% na liberação de ácido ferúlico da lignocelulose³⁹.

Existem também proteínas hidrolíticas com função de expansinas, fortalecendo a ideia de importância dessa função em preparados enzimáticos para hidrólise da celulose. É o caso de uma enzima hidrolítica de *T. reesei* que é capaz de promover a extensão da parede celular de pepino. Essa proteína, a endo-1,4- β -glucanase (Cel12A), pertence a família GH12 e possui forte atividade de endoglucanase⁴⁰.

Em fungos do gênero *Trichoderma* como *T. reesei*²⁰, *T. pseudokoningi*⁴¹, *T. asperellum*⁴², entre outros, foram identificadas sequências de genes que codificam proteínas swoleninas, porém, além de nenhuma estrutura ter sido depositada nos bancos de dados até o momento, também não se têm muitos estudos de caracterização para essa família de proteínas e informações como mecanismo de ação e sinergismo entre swoleninas e celulases ainda não estão disponíveis.

A swolenina foi identificada pela primeira vez após ser isolada do fungo *T. reesei* em 1992. Pesquisadores demonstraram que a bioatividade da swolenina na fibra de celulose causa um dano parcial, com perda de estrutura e redução da intensidade similar ao efeito causado por tratamento do material celulolítico por ultrasom, ao passo que não é capaz de liberar açúcar redutor²⁰.

Acredita-se que essa proteína seja produzida principalmente por fungos com potencial fitopatogênico que produzem um coquetel de enzimas capaz de degradar a paredece celular das plantas e saprofíticos como espécies de *Trichoderma e Aspergillus*. Estudo aponta que a proteína swolenina aumenta a eficiência de colonização de raízes de plantas por espécie de *Trichoderma* e, ainda, indica que o CBM é indispensável para bioatividade da proteína pois ele estimula a resposta de defesa local na planta, indicando ser reconhecido como marcador molecular associado a microrganismo (MAMP) na interação planta-*Trichoderma⁴²*.

A organização estrutural da proteína inicia com uma sequência sinal típica terminada por dois ácidos glutâmicos, um domínio de ligação a celulose (CBM) altamente conservado entre celulases e segue com uma sequência de aminoácidos mais longa que a usualmente observada para celulases em geral (cerca de 50 resíduos) com muitos potenciais sítios de O-glicosilação (linker). A porção C-terminal possui duas inserções de sequências com homologia a expansinas de plantas (**Figura 8**), sendo que alinhamentos demonstram uma maior identidade com expansinas β (cerca de 25% de identidade)²⁰.

55		CBM		Linker		Homologia a expansina	
18	1	2	10	9	91 1	153 4	75

Figura 8 - Esquema do gene da swolenina de *T. reesei* com a sequência sinal (SS), o domínio de ligação a celulose (CBD), o linker e o domínio tipo expansina²⁰.

A swolenina também apresenta regiões similares a repetições fibronectinas tipo III (FnIII) de proteína titina de mamífero e essa é a primeira vez que uma sequência desse tipo é encontrada em proteína de fungos. A ausência de atividade catalítica da swolenina pode estar relacionada a ausência do ácido aspártico da posição 10, doador de prótons observado em celulases Cel45 e responsável pelo mecanismo de catálise por inversão, apesar de estar conservado em swoleninas o ácido aspártico da posição 304 que atua nas celulases como aceitador de prótons⁴¹.

A expressão do gene da swolenina é regulado por fontes de carbono da mesma maneira que celulases em hemicelulases e experimentos apontam a existência de outros genes que codificam para proteínas similares a expansinas no genoma de *T. reesei*^{20; 43}.

Outros estudos demonstram o sinergismo de swoleninas com celulases no processo de degradação de biomassa. Em uma mistura contendo 0.6 FPU de celulases e 300 µg de swolenina por grama de papel filtro houve aumento de cerca de 81,7% em rendimento de açúcar redutor liberado quando comparado a experimento controle sem swolenina⁴⁴. Logo, a adição da proteína swolenina em preparados enzimáticos para produção de etanol de segunda geração deve conferir aumento da eficiência e contribuir para redução dos custos de produção de um coquetel mais eficiente, porém, mais estudos de caracterização da proteína swolenina e de produção da mesma

se fazem necessários⁴⁴. No entanto, não é muito abundante a produção de swolenina pelos fungos filamentosos, estudos de Western Blot demonstram que o nível de produção de swolenina em culturas de *T. reesei* alcança cerca de 1 mg/L, o que está bastante distante do nível de produção das principais celulases secretadas por esse fungo²⁰. Por esse motivo a super expressão de forma heteróloga da proteína se faz necessária para todos os estudos bioquímicos, biofísicos e estruturais propostos nesse projeto. Por ser tratar de proteína com modificações pós-traducionais e possuir várias pontes dissulfeto, que estabilizam sua conformação, a produção da proteína precisa ser em sistemas eucariotos de expressão para que sua maquinaria seja reproduzida o mais fielmente possível as suas características nativas.

1.8 Secreção de proteínas por fungos filamentosos e leveduras

As celulases e proteínas auxiliadoras, como as swoleninas, que são secretadas da célula, conservam uma sequência peptídica na porção aminoterminal, chamada sequência sinal, que notifica ao sistema de secreção que aquela é uma proteína extracelular. A via secretória de fungos é esquematizada na **Figura 9**. As proteínas marcadas com a sequência sinal entram no retículo endoplasmático (RE), em uma forma estendida, onde serão enoveladas e sofrerão as modificações pós traducionais previstas como glicosilação, formação de pontes dissulfeto, fosforilação e montagem das subunidades.

Do RE as proteínas seguem nas vesículas de transporte para o complexo golgiense para que mais modificações como glicosilação tardia e proteólise para processamento de peptídeos possam ocorrer. Finalmente, as proteínas são novamente envolvidas por vesículas secretórias e direcionadas à membrana plasmática para serem exportadas da célula ^{45; 46}.

Para se obter um mais alto rendimento das proteínas recombinantes secretadas há a alternativa de fusioná-las com proteínas homólogas facilmente exportadas, chamadas proteínas carreadoras. Pesquisadores da empresa Genencor desenvolveram a tecnologia fusionando quimosina bovina com a glucoamilase, uma proteína nativa altamente secretada por *A. niger*⁴⁷. Porém, mais estudos estão sendo realizados para verificar os reais efeitos dessa fusão na fisiologia do fungo e na eficiência do processo de secreção da proteína heteróloga⁴⁸.

Como a secreção da proteína ocorre na região apical ou subapical da hifa fúngica polarizada é possível imaginar que quanto maior a superfície dessa região no micélio do fungo, maior a eficiência de secreção que poderá ser alcançada. Estudos de mutagênese para alteração na morfologia do micélio culminam com a produção de cepas hiper-ramificadas com micélio disperso e hifas mais curtas, para agilizar a exocitose^{49; 50}.

Esse processo de secreção de uma proteína confere o maior obstáculo enfrentado por todo o sistema de produção, maturação e exportação de uma proteína para o meio extracelular. Isso se deve ao fato de que somente proteínas em perfeito estado de modificação pós traducional e funcionalidade são translocadas para o complexo de Golgi ao invés de serem mantidas RE para degradação. Qualquer alteração observada nesse aparato, causada, por exemplo, pelo alto fluxo de proteínas, leva ao estresse do RE e todo o sistema de secreção a uma situação de caos. A célula exibe uma série de mecanismos de resposta para resolver essa situação como a Resposta a Proteína Desenovelada (UPR), que reconhece proteínas com incorreto enovelamento e desencadeia a expressão de uma série de outras proteínas para auxiliar no processo e a Degradação de Proteína associada ao RE (ERAD), que degrada as proteínas que não conseguiram atingir a conformação correta^{45; 50}.



Figura 9 – Esquema representando o evento de secreção das proteínas pela região apical da hifa de fungos filamentosos.

1.9 Glicosilação

A glicosilação, modificação pós-traducional bastante encontrada em celulases, tem a função de, além de promover e manter o correto enovelamento, também informar as condições da proteína para o controle de qualidade da célula, evitando que a mesma seja degradada. Fungo filamentoso tem a habilidade de glicosilar as proteínas de maneira equilibrada, geralmente comparado com células de mamíferos, secretando as glicoproteínas com reduzida manosilação (GlcNac2Man5), ao passo que células de levedura costumam adicionar mais unidades de açúcar às proteínas que o usual ⁵¹.

Em geral, a glicosilação está relacionada à secreção de enzimas celulolíticas, promovendo suficiente separação espacial entre domínio catalítico e CBM e protegendo o linker da clivagem proteolítica^{32; 52; 53}. Ela também pode estar relacionada a alguns parâmetros bioquímicos como pH e temperatura de atividade ótima da enzima. Em estudo sobre efeitos de glicosilação em β -xilosidase, foi observado que quando deglicosilada a enzima apresentou melhor performance de hidrólise em mais alto pH e mais baixa temperatura que quando regularmente glicosilada⁵⁴.

Estudos de Hui e colaboradores, de espectrometria de massa em celobiodrolases e endoglucanases, reportam a grande heterogeneidade observada tanto em N quanto em O-glicosilação, podendo ser encontradas muitas glicoformas da mesma proteína. O trabalho também informa que a glicosilação contribui com 12-24% da massa molecular total da proteína em estudo ⁵³.

As celulases são, normalmente, N-glicosiladas no domínio catalítico, em sítios específicos e conservados entre as famílias, com simples resíduos de N-acetilglucosamina, com ramificação de manose. Já a o linker entre os domínios possui vários resídos de treonina com unidades de manose (diferentes graus de polimerização) e sítios de serina com simples moléculas de manose⁵⁵ (Figura 10).



Figura 10 – Figura ilustrando a glicosilação das proteínas. (a) O processo de glicosilação da proteína acontece no interior da célula e depois ocorre sua exportação para o meio extracelular e (b) os tipos de açúcares presentes nos sítios de glicosilação.

1.10 Fungos produtores de celulases e proteínas auxiliadoras

Nos últimos 30 anos muitas pesquisas que levaram à produção de etanol a partir da celulose focaram em sistemas fúngicos (principalmente *Trichoderma reesei*) para a quebra da celulose em açúcares no processo de sacarificação, acoplada ao processo de fermentação por leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*)⁵⁶.

O sistema celulolítico de *T. reesei (Hypocrea jecorina*), o mais bem investigado produtor de enzimas celulases, é composto de oito endoglucanases, duas celobiohidrolases e sete β -glucosidases, entre mais de 20 proteínas do complexo no total⁵⁷. As celulases são a principal fração de proteínas extracelulares produzidas por esse fungo: CBHI representa mais de 50%, CBHII cerca de 20% e as três principais endoglucanases, EGLI, EGLII e EGLIII representam cerca de 15, 10 e 1% do total de proteínas secretadas, respectivamente^{58; 59}.

1.10.1 Trichoderma harzianum

O gênero *Trichoderma* inclui fungos cosmopolitas capazes de colonizar diferentes substratos e com diversas condições ambientais. Um dos mais significativos 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. A atividade de controle biológico, fortemente característico desse fungo, depende da versatilidade metabólica e do potencial secretor, os quais são responsáveis pela produção de uma grande quantidade de enzimas hidrolíticas envolvidas na degradação da parede celular⁶⁰.

Mais recentemente formas teleomórficas *Hypocrea lixi* de *T. harzianum* foram identificadas através da análise do DNA⁶¹. Do ponto de vista aplicado estas pesquisas abrem novas perspectivas de melhoramento, sobretudo no caso de *T. harzianum*, largamente utilizado como agente de biocontrole na agricultura⁶².

Na área industrial algumas espécies de *Trichoderma* têm sido largamente utilizadas na produção de celulases e, de modo geral, isolados de *T. harzianum* têm tido destaque nestas formulações⁶³.

Recentemente, uma cepa IOC 3844 do fungo filamentoso do gênero *T. harzianum* foi estudada no laboratório do Prof. Dr. Nei Pereira Jr. (EQ/UFRJ), com o qual o nosso grupo possui colaboração ativa. *T. harzianum* IOC 3844 foi identificado como um forte e rápido produtor de endoglucanases, atingindo 6358 UI.L⁻¹ de atividade em apenas 72 horas. Essa elevada produtividade volumétrica de expressão de celulases deste isolado, alcançando 3 a 5 UI.L⁻¹.h⁻¹ é comparável com a atividade celulolítica volumétrica do fungo *T. reesei*²¹, o qual atualmente é a principal fonte de preparados enzimáticos utilizados no processamento de biomassa. Ainda, os elevados valores de produção de endoglucanases, alcançados por *T. harzianum* IOC 3844, destacam-se perante os obtidos para todas as demais linhagens, chegando a ser cerca de 60 vezes maiores em relação a cepas tradicionas de *T. reesei* (dados obtidos em ensaios preliminarese no laboratório). Essa cepa foi a escolhida para os estudos desse projeto, tanto para produção homóloga de proteínas a serem caracterizadas quanto para clonagem de genes de interesse para expressão heteróloga em *A. niger* ou *P. pastoris*.

1.11 Introdução à expressão heteróloga

Nesse trabalho, conforme dito anteriormente, além da expressão das proteínas de forma homóloga, pelo próprio *T. harzianum*, realizou-se, também, a expressão heteróloga das proteínas de interesse expressas em baixas concentrações, a fim de produzi-las em quantidades suficientes para purificação e ensaios de caracterização. Foram utilizados dois diferentes sistemas de produção: a levedura *Pichia pastoris* e o fungo filamentoso *Aspergillus niger*. É facilmente notável, ao longo desse trabalho, que o fungo filamentoso atendeu melhor às expectativas de produção e é sobre ele que que será abordado resumidamente a seguir.

Fungo filamentoso possui uma incomparável capacidade de secreção de metabólitos, ácidos orgânicos e enzimas em relação a outros sistemas de expressão eucarióticos como leveduras, algas ou células de insetos⁵⁰. A expressão heteróloga de proteínas, por exemplo, pode alcançar níveis de g/L. Além disso, possuem toda a maquinaria celular para as modificações póstraducionais como células de mamífero, ausente nas bactérias, enquanto dividem com os procariotos a qualidade de serem mais facilmente cultivados⁶⁴.

A transformação (inserção do DNA) no fungo filamentoso é dificultada pela presença da parede celular de quitina e extremamente mais difícil que em leveduras e bactérias. Entre os métodos existentes, como biolística⁶⁵, eletroporação⁶⁶ e transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*⁶⁷, o método baseado na liberação de protoplastos pela ação de enzimas que degradam a parede celular, de hifas ou conidióforos, tem sido o mais empregado (**Figura 11**). Os preparados enzimáticos utilizados são compostos por uma complexa mistura de enzimas hidrolíticas, constituídas principalmente por 1,3-glucanases e chitinases. Os protoplastos liberados, devem ser estabilizados osmoticamente e, para isso, são manipulados e armazenados em soluções como NaCl, sucrose, ou sorbitol, entre outras.

O protoplasto nada mais é que toda a região interna da célula, constituída pela membrana citoplasmática, pelo citoplasma e pelo núcleo. As células nesta condição, ou seja, desprovidas de parede celular, podem ser manipuladas como células animais e bacterianas, conservando as potencialidades da célula completa do fungo. O processo de transformação finaliza com a junção do DNA ao protoplasto na presença de polietilenoglicol (PEG), cloreto de cálcio e outros aditivos^{68; 69; 70}.



Figura 11 - Produção de protoplasto a partir do micélio de fungos filamentosos.

Embora vários plasmídeos, moléculas de DNA de replicação autônoma, tenham sido construídos para expressão de proteínas em fungo filamentoso, nenhum deles é capaz de se manter estável dentro da célula por vários ciclos de produção. Isso graças às hifas cenocíticas, que podem apresentar uma grande porção de núcleos sem o plasmídeo, devido à liberdade com que citoplasma e núcleo podem se mover entre os compartimentos celulares, tolerando um número de núcleos não transformados crescer em meio seletivo. Isso geraria uma perda significativa do vetor de expressão ao longo dos ciclos de divisão celular. Logo, diferentemente do que ocorre com bactérias e leveduras, microrganismos unicelular, nos quais os marcadores de seleção garantem a manutenção do plasmídeo para sobrevivência da célula, os fungos filamentosos necessitam que o vetor de expressão seja integrado ao DNA cromossomal⁷¹.

Análise do DNA cromossomal dos transformantes demonstra que, em geral, três diferentes modos de integração podem ocorrer: por recombinação homóloga, com frequência variável entre as espécies, sendo observado em *A. nidulans* em até 80% dos casos⁷²; integração ectópica, por recombinação não homóloga⁷³ ou substituição do gene, o que é favorecido quando o DNA transformante é linear⁷⁴. A ocorrência de determinado evento de integração é altamente

variável e depende da espécie a ser transformada, da técnica empregada para a transformação e da conformação do DNA (circular ou linear)⁷⁵.

Em *Aspergillus sp.* a integração genômica do DNA transformante ocorre tanto nos sítios não homólogos (ectópicos) quanto em regiões homólogas, em uma situação bem intermediária entre a recombinação quase que exclusivamente homóloga das leveduras e o oposto realizado em células de mamíferos.

O promotor sob o qual o gene de interesse será inserido pode ser induzível ou constitutivo. Um grande benefício apresentado pelo promotor sob indução (regulação do gene a nível transcricional), baseia-se no controle rigoroso do momento em que a proteína deve ser expressa, o que permite um aumento na biomassa fúngica e evita que proteínas potencialmente tóxicas para o microrganismo sejam produzidas antes da hora.

Muitos promotores induzíveis têm sido desenvolvidos para essa proposta, sendo o promotor do gene da glucoamilase A de *A. niger*, de longe, um dos mais utilizados. Esse gene codifica enzima que catalisa a hidrólise do amido, tendo, portanto, sua expressão induzida quando na presença de amido ou maltose.

Uma vez integrado o DNA de interesse no genoma, é preciso que o protoplasto seja regenerado, selecionado e avaliado quanto a sua capacidade em, de fato, expressar a proteína. Três diferentes tipos de marcadores selecionáveis podem ser usados para essa proposta: genes que codificam o tRNA supressor⁷⁶, marcadores auxotróficos⁷⁷ e marcadores de seleção dominante⁷⁸.

As células transformadas são, então, cultivadas em meio seletivo para o crescimento dos transformantes heterocarióticos e, devido aos conídios serem uninucleados na maioria das espécies de *Aspergilus*, é possível obter cepas homocarióticas a partir de uma reseleção da progênie⁶⁴.

O gargalo do experimento de expressão heteróloga concentra-se no estágio póstranscricional, na via secretória, com os problemas enfrentados pelas proteínas para que alcancem a membrana plasmática e sejam secretadas da célula. Entre as causas desse contratempo, a glicosilação merece destaque devido à dificuldade de se obter a N e O-glicosilação corretamente no RE, tendo como consequência a degradação da proteína⁵⁰. Uma vez expressa, processada e secretada, a enzima ainda enfrenta outro entrave no processo de produção que consiste na degradação da mesma por proteases presentes no meio extracelular. Embora existam vários esforços para a produção de cepas deficientes na produção e secreção de proteases, há um certo nível residual de expressão dessas proteínas que, dependendo das condições, pode conferir um prejuízo enorme no rendimento da proteína heteróloga⁵¹.

1.11.1 O gênero Aspergillus

Fungos do gênero *Aspergillus* possuem uma enorme flexibilidade nutricional e metabólica e são capazes de habitar diferentes ambientes com as mais variadas condições de pH, temperatura e osmolaridade como solo, ambientes internos, material em decomposição ou, ainda, viver como parasitas de outros organismos. Além dessa reconhecida característica de fácil cultivo, fungos do gênero *Aspergillus* são classificados como "Geralmente Reconhecido como Seguro" (GRAS), devido ao seu uso seguro a longo prazo na indústria alimentícia, o que reforça suas vantagens como fábrica celular na indústria biotecnológica⁵⁰.

Outra vantagem apresentada por fungos do gênero *Aspergillus*, na produção de proteínas recombinantes, consiste na sua capacidade de glicosilar proteínas de forma eficiente sem apresentar o problema da hiperglicosilação observado em outros sistemas fúngicos de expressão^{50; 51}.

Várias espécies de *Aspergillus* têm seus genomas sequenciados como *A. nidulans*⁷⁹, *A. niger*⁸⁰, *A. oryzae*⁸¹ e *A. fumigatus*⁸², entre outros, facilitando os trabalhos de manipulação genética desses microrganismos e permitindo uma compreensão mais detalhada dos mecanismos que envolvem a produção de proteínas nessas fábricas celulares^{80; 83; 84}. Os detalhes desses estudos podem ser encontrados no website de *Aspergillus* (http://www.aspergillus.org.uk), um recurso que reúne diversas informações sobre o gênero, acesso aos genomas disponíveis, imagens, literatura relacionada, entre outras informações.

O trabalho aqui apresentado abordará a produção das principais enzimas celulases e proteínas auxiliadoras do complexo celulolítico de *T. harzianum*, tanto em sistema homólogo quanto heterólogo de expressão. Após cada forma de produção será apresentada a caracterização do preparado enzimático como um todo, frente a hidrólise do bagaço de cana-açúcar, bem como

de duas proteínas purificadas, quanto a parâmetros bioquímicos, biofísicos e estruturais: a CBHI (expressão homóloga) e o domínio catalítico da EGLI (expressão heteróloga).

2 JUSTIFICATIVA

A exploração indiscriminada dos recursos naturais estabelece uma clara tendência de esgotamento de recursos, levando, em um curto espaço de tempo, à falta de elementos essenciais para a subsistência humana, especialmente os combustíveis. Além disso, o excesso de gás carbônico, advindo da queima de combustíveis fósseis, tem agravado seriamente a questão do aquecimento global. Com isso, a procura por biocombustíveis tem se tornado de extrema importância também para o meio ambiente. Insere-se, nesse contexto, com grande potencial, o uso do bioetanol como fonte renovável de energia. Contudo, a quantidade de álcool necessária para suprir a demanda, cada vez maior, cria a necessidade de pesquisas por novas formas de obtenção dos biocombustíveis. A conversão enzimática de resíduos agroindustriais, materiais lignocelulósicos, como cascas de cereais, bagaço de cana e resíduos da indústria madeireira tem ganhado destaque nessa busca por alternativas aos problemas gerados pelos combustíveis fósseis. Os materiais lignocelulósicos são considerados as mais abundantes fontes renováveis na Terra e parece claro que essa biomassa (primária e residual) será, num futuro próximo, a principal fonte de recursos para a obtenção de energia.

Com isso, o entendimento e consequente melhoramento da atividade de microrganismos capazes de degradar a celulose e a hemicelulose à moléculas de açúcares fermentáveis a etanol tem assumido papel essencial nas pesquisas relacionadas aos biocombustíveis.

O fungo *T. harzianum* apresenta potencial atividade celulolítica, contudo, pouco se sabe sobre a composição molecular do complexo celulolítico do fungo, nem quantas enzimas fazem parte do complexo, tão pouco suas características moleculares. Tendo em vista a alta atividade celulolítica deste fungo filamentoso, demonstrada recentemente no laboratório do Prof. Nei Pereira Jr. (EQ/UFRJ), torna-se importante a compreensão dos mecanismos moleculares de ação envolvidos nessa atividade bem como a caracterização das enzimas desse complexo celulolítico, a fim de poder contribuir com mais conhecimento a cerca do processo de hidrólise enzimática da biomassa.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho consiste na produção e na caracterização bioquímica, molecular e estrutural de proteínas do complexo celulotítico do fungo filamentoso *Trichoderma harzianum* (cepa IOC 3844).

3.2 Objetivos específicos

- **4** Caracterizar a cinética de produção de enzimas celulolíticas pelo *T. harzianum;*
- Estudar diferentes formas de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar e caracterizar sua composição e propriedades;
- Analisar a performance do preparado enzimático produzido pelo *T. harzianum*, em comparação com coquetel comercial, frente à hidrólise do bagaço pré-tratado;
- Produzir, purificar e caracterizar bioquímica, biofísica e estruturalmente a proteína CBHI de *T. harzianum;*
- Expressar de forma heteróloga, em *P. pastoris* ou *A. niger*, as proteínas majoritárias do coquetel celulolítico de *T. harzianum* (CBHI, CBHII, EGLI) *e T. reesei* (EGLII), bem como a proteína auxiliadora swolenina;
- **4** Caracterizar bioquímica e biofisicamente o domínio catalítico da EGLI de *T. harzianum*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultivo do fungo T. harzianum em estufas com agitação

O isolado do fungo filamentoso *T. harzianum*, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Nei Pereira Jr. (EQ/UFRJ), foi mantido por meio de repiques periódicos em meio ágar de batata e dextrose, o PDA (*Potato Dextrose Agar*), e crescidos a 25°C até esporulação (5-7 dias). Os esporos foram coletados em solução salina (0,9 % de NaCl), contados em *Câmara de Neubauer* e estocados a 4°C até a sua utilização. Os experimentos de tratamento e caracterização do bagaço de cana-de-açúcar, bem como de hidrólise enzimática desse pré-tratado, foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Nei Pereira Jr, sob a supervisão do Dr. Roberto Maeda.

O processo de fermentação se deu de duas maneiras dependendo da escala de produção necessária: em frascos agitados em estufa ou em bioreatores. Para alcançar uma biomassa satisfatória para a indução das proteínas fez-se um pré-inoculo com 10⁶ esporos/ mL de meio Mandels ⁸⁵ com glicose como fonte de carbono. O pré inoculo (100 mL) foi crescido a 30°C por 48 hrs sob agitação de 150 rpm e com glicose (10 g/L) como fonte de carbono. Em seguida fez-se um inóculo 5% (v/v) para 400 mL do mesmo meio de cultivo alterando somente a fonte de carbono, a qual passou a ser celulose microcristalina (Avicel®) (10 g/L). O volume útil dos frascos utilizados foi considerado até 1/5 do volume total dos mesmos, para permitir boa aeração. O cultivo foi mantido nas mesmas condições descritas para o pré inóculo por até 72 hrs, quando foi centrifugado por 9000 rpm (SLA-3000) por 20 min.

4.2 Cultivo do fungo T. harzianum em bioreator

As enzimas celulases também foram expressas por fermentação submersa de *T. harzianum* em bioreator Bioflo 110 de 7,5 L (New Brunswick), nas mesmas condições descritas para produção em frascos agitados. O pré inóculo deu-se em frascos agitados a 150

rpm em estufa em frascos *erlenmeyers* com volume total de 1000 mL e mantido por 48 horas a 30°C. A fermentação deu-se, após inóculo de 5% (v/v) em volume de 5 L por 96 hs, quando o extrato bruto foi centrifugado a 9000 rpm (SLA-3000) por 20 min. O uso de biorreatores permitiu um maior controle dos parâmetros como de pH, pela adição de NaOH ou HCl, da oxigenação, por agitação com impelidor (rpm) e injeção de ar comprido e da temperatura, com banho térmico.

O meio extracelular, separado por centrifugação, proveniente da estufa com agitação ou dos reatores, foi filtrado em sistema de filtração tangencial – Hollow fiber (Amersham Biosciences). Após completa separação de qualquer resto celular por filtração em cartucho de microfiltração (CFP) 0,22µm, o extrato proteico bruto foi concentrado cerca de 20x no mesmo sistema com cartucho de utrafiltração (UFP) de corte de 10000 Da.

4.3 Ensaios de atividades

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1µM de açúcar redutor (glucose equivalente) por minuto.

Para o cálculo das atividades, foi utilizada a seguinte equação:

$$Atividade(UI / mL) = \frac{[] \ acúcares \ (g/L) \times 10^6}{180} \times \frac{1}{1000} \times \frac{1}{t \ (\min \)} \times \frac{Vt \ (mL)}{ve \ (mL)} \times Fd$$

Onde:

t = tempo de reação
Vt = volume total de meio reacional
Ve = volume de enzima empregado no ensaio

Fd = fator de diluição do extrato enzimático

4.3.1 Quantificação de açúcar redutor total com ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS)

Para quantificar a concentração de açúcar redutor total (ART) liberado nos experimentos de hidrólise e ensaios de atividade enzimática foi utilizado o teste colorimétrico com ácido 3,5-dinitrosalicílico⁸⁶ com curva padrão de glucose (0,1 a 1g/L).

4.3.2 Quantificação de glucose por kit de glicose oxidase (GOD)

Para esse ensaio foi utilizado kit comercial com glicose oxidase (GOD) como reagente de quantificação de glicose e padrão de concentração de glicose conhecida do próprio kit para comparação dos resultados. As absorbâncias das amostras são lidas em espectrofotômetro a 505 nm. O produto da reação entre ácido e açúcar, formado a 95°C em 15 minutos, foi medido em espectrofotômetro a 540 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.3.3 Ensaio de atividade de atividade de β-glicosidase

O extrato enzimático foi incubado com solução de celobiose 2% em tampão citrato de sódio 50 mM pH 5.0. A reação ocorreu a 50°C por 15 min seguido de adição de GOD, um kit comercial de glicose oxidase para quantificação de glicose, e reação a 37°C por 15 min. As soluções tiveram suas absorbâncias medidas a 505nm. Cada análise foi realizada em triplicata ⁸⁷.

4.3.4 Ensaio de atividade de endoglucanase

A determinação da atividade de endoglucanase foi realizada incubando-se o extrato enzimático com solução de carboximetilcelulose sal de sódio (CMC) média viscosidade 1% em tampão citrato de sódio 50 mM pH 5.0 a 50°C por 15 min. A quantificação dos açúcares redutores totais foi obtida melo método DNS descrito acima no qual as amostras tiveram a absorbância medida a 540 nm. Cada análise foi realizada em triplicata ⁸⁷.

4.3.5 Ensaio de atividade de FPase

A atividade de FPase foi realizada incubando-se o extrato enzimático com 1 esfera de papel filtro Whatman nº1 de 7mm de diâmetro e tampão citrato de sódio 50 mM pH 5.0 em placa de 96 poços. A reação enzima e substrato deu-se a 50°C por 60 min. A quantificação de açúcares redutores totais foi feita pelo método de DNS. Os testes foram realizados em triplicata⁸⁷.

4.3.6 Ensaio de atividade de exoglucanase ou avicelase

A atividade de exoglucanase foi determinada adicionando-se o extrato enzimático uma suspensão de avicel 1% em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5.0. As amostras foram incubadas a 50°C por 120 min sob agitação suave e posteriormente centrifugadas para sedimentação das partículas não hidrolisadas. A quantificação do açúcar redutor total deu-se pelo método de DNS. Cada análise foi realizada em triplicata ⁸⁷.

4.3.7 Ensaio de atividade de xilanase

Os ensaios de xilanases foram realizados nas mesmas condições de pH e temperatura que para as celulases com o intuito de ser identificada a atividade real nas condições em que foi realizada a hidrólise enzimática. Para isso, 1% de xilose em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5.0 foi incubado com a solução enzimática a 50°C por 15 min. A quantificação do açúcar redutor total deu-se pelo método de DNS. Cada análise foi realizada em triplicata ⁸⁷.

4.4 Preparo e caracterização do bagaço de cana-de-açúcar

4.4.1 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

Como substrato foi utilizado bagaço de cana-de-açúcar, fornecido pela indústria sucroalcoleira Dedini S.A (Piracicaba, São Paulo). O bagaço foi tratado, primeiramente, com ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1%, em uma relação sólido:líquido de 1:2, a 121°C por 45 minutos, para uma remoção parcial das frações de hemicelulose e lignina. A porção sólida (rica em celulose) do tratamento foi separada em prensa hidráulica (2 toneladas aplicadas em uma área de 201 cm²) e lavado com água destilada em abundância.

Em seguida, o bagaço foi submetido a um tratamento alcalino com hidróxido de sódio (NaOH) em diferentes concentrações (0,1; 0,5; 1 e 4 % m/v), em uma relação sólido:líquido de 1:20 a 121°C por 30 minutos. A celulignina parcialmente deslignificada foi lavada com água destilada abundante até remoção total da lignina liberada e da base utilizada em uma peneira de aço inoxidável de malha de 0,5 mm e teve seu pH corrigido para 5,0 com HCl 2M. Para finalizar o processo, o bagaço pré-tratado foi armazenado em estufa com circulação de ar a 60°C para secagem ⁸⁸.

4.4.2 Análise composicional do bagaço in natura e pré-tratado

Para determinação da sua composição, as diferentes amostras de bagaço foram moídas, filtradas em peneira de malha de 0,5 mm e hidrolisadas com H₂SO₄ em dois passos de acordo com protocolo estabelecido pelo Laboratório de Energia renovável dos EUA (NREL)⁸⁹. Esse procedimento é realizado em duas etapas para facilitar a análise de lignina e carboidrato. O material insolúvel em ácido é determinado de modo gravimétrico. A lignina solúvel em ácido é determinada por espectroscopia no UV e os carboidratos hidrolisados pelo ácido à forma monomérica são analisados por HPLC.

4.4.3 Análise da cristalinidade do bagaço pré-tratado

A cristalinidade do material foi determinada através de método de difração de Raios-X recentemente desenvolvido por Driemeier e Calligaris ⁹⁰, com a participação e supervisão do Dr. Carlos Driemeier, no CTBE. A Difração foi feita a partir de um gerador de ânodo rotatório UltraX-18HF operado com radiação K α do Cu ($\lambda = 1,54$ Å) em amostras inseridas em capilares de vidro de 2 mm de diâmetro. Um detector de imagem Mar345 foi posicionado a uma distância de 120 mm da amostra. Os padrões de difração foram corrigidos quanto a absorção de raios-X. A calibração se deu com α -alumina e os padrões corrigidos foram modelados pelo método de Rietveld⁹¹ usando o programa MAUD⁹², a estrutura da celulose *I* β ⁹³ e uma descrição harmônica da orientação preferencial dos cristais.

A cristalinidade foi determinada usando a seguinte expressão:

Onde:

- Q[I] é uma função que integra I(S) s² ds no intervalo 0,11-0,50 Å⁻¹, com s = $2\sin\theta/\lambda$;
- *I*[°]_{cr} e *I*_{exp} são intensidades isotrópicas reconstruídas por Rietveld da difração e espalhamento total, respectivamente;
- *I*o é a intensidade espalhada do capilar vazio;
- T_{exp} e T_0 são as intensidades de raios-X transmitidas (em $2\theta = 0$) da amostra e do capilar vazio, respectivamente;
- O termo de correção x_m é o conteúdo da mistura em base seca determinado gravimetricamente depois de aquecimento a 105°C, até massa constante;
- ε_{inc} é o fator de espalhamento incoerente ⁹⁰ ($\varepsilon_{inc} = 0, 102$);
- As incertezas reportadas em Xcr consistem de dois principais componentes: (i) variabilidade (desvio padrão de ≈ 10%) em medidas de Q[I₀]/T₀ e (ii) incertezas em xm (≈1%). As incertezas reportadas não incluem possíveis viés sistemáticos introduzidos pelo método de cristalinidade, o qual é estimado estar abaixo de ± 5% ⁹⁰.

4.4.4 Hidrólise enzimática com diferentes preparados enzimáticos

Os seguintes coquetéis enzimáticos foram utilizados no experimento em questão:

- 1. M25 (Comercial Multifect) Genencor 25 FPU/g de substrato
- 2. M12,5 (Comercial Multifect® CX 10L) Genencor 12.5 FPU/g de substrato
- 3. T (Trichoderma harzianum) IFSC/USP 25 FPU/g de substrato
- 4. MT (Multifect a 12.5 FPU/g + T. *harzianum* a 12.5 FPU/g)

O experimento de hidrólise foi realizado com celulignina a uma concentração de 25g/L, em um volume final de reação de hidrólise de 50 mL (1,25g de bagaço) e em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5,0, sob constante agitação. O experimento foi realizado em duas repetições e as análises em duplicata. Foi feito um controle com bagaço e solução tampão sem preparado enzimático.

A suspensão de bagaço em tampão foi previamente autoclavada e todo procedimento realizado em fluxo laminar para evitar contaminação. Alíquotas de 1 mL foram coletadas a cada 3 horas (6 pontos) durante 18 horas para um acompanhamento da cinética de hidrólise do bagaço. As amostras foram centrifugadas a 12000 g por 1 minuto para separação do substrato insolúvel e da solução de enzimas e açúcar liberado. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C para posterior análise. Amostras foram enviadas para análise de glicose, celobiose e xilose, em coluna HPX87P em HPLC (seção 4.4.5).

O rendimento de hidrólise foi calculado conforme a equação:

$$RE = \frac{ART(g/L) \times 0.9}{Celulose(g/L)} \times 100$$

Onde:

- RE é o rendimento da hidrólise;
- ART é a concentração de açúcar redutor total liberado na reação de hidrólise;
- 0,9 é o fator de correção da falta da molécula de água nos resíduos de anidroglicose na estrutura da celulose;
- Celulose é a concentração de celulose na celugnina total.

4.4.5 Análise dos açúcares liberados por HPLC

Açúcares liberados nas reações de hidrólise foram quantificados em sistema de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC – *Waters* 2415) com coluna Aminex HPX87P (*Bio-Rad*) a 60°C com detector de índice de refração (*Waters*). A fase móvel foi água Milli-Q em fluxo de 0,6 mL/min. Glicose e celobiose foram utilizados como padrão.

4.4.6 Análise do efeito de BSA na eficiência de hidrólise

A Adição de BSA foi baseada em trabalho publicado por Yang e colaboradores, em 2006⁹⁴, que afirmaram ser possível aumentar a eficiência da hidrólise enzimática com a adição da proteína BSA ao bagaço antes da adição do coquetel enzimático.

Com o intuito de prevenir a adsorção irreversível das enzimas na fração de lignina existente nas diferentes amostras de bagaço pré-tratado foi adicionado BSA, na concentração de 1,5 g/L, 2 horas antes da adição do preparado enzimático. Nesse experimento o coquetel utilizado foi composto pelo comercial Multifect® e pelos produzidos pelo *P. funiculosum* e pelo *T. harzianum*, com uma atividade de FPase total de 18 FPU/g. Em paralelo foram realizados experimentos controles sem adição de BSA.

A cinética e o rendimento de hidrólise, bem como a análise por HPLC dos açúcares liberados, foram realizados da mesma maneira que descrito acima para os experimentos de hidrólise padrão.

Todos os experimentos de hidrólise enzimática foram repetidos 3 vezes e os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) em um nível de significância de 5%. O teste de Tukey foi aplicado para comparação das médias.

4.5 Gel bi-dimensional para caracterização do secretoma de T. harzianum

Géis 2D foram produzidos com o extrato extracelular de *T. harzianum* para identificação preliminar das proteínas que fazem parte do total de proteínas secretadas por esse fungo. Esse experimento permite a separação das proteínas em duas dimensões, uma de acordo com o ponto isoelétrico e outra em função de sua massa molecular. Dessa forma é possível observar no gel pontos de proteínas coradas (os spots), separadas umas das outras, e traçar um perfil do secretoma desse microrganismo. Uma análise mais detalhada, por espectrometria de massa, permite, ainda, a identificação de cada uma das proteínas, bem como o entendimento de quais existem em maior ou em menor quantidade naquele extrato.

A focalização isoelétrica (1^a dimensão – IEF) foi feita utilizando-se fita de 13cm com pH variando de 3 a 10 e para isso as amostras foram hidratadas por 12 horas na câmara de reidratação em equipamento Amersham-Bioscience. As fitas foram posteriormente reduzidas com ditiotreitol (DTT) 10 mM por 30 minutos a TA e alquiladas com iodoacetamida 100 mM por 30 minutos a TA em solução de equilíbrio (Urea 72,1g, Tris-HCl pH8.8 10ml, glicerol 87% 69 ml, SDS 4g, Bromofenol Blue 1% 400ul – para 200ml finais completados com água milli-Q). Após essa etapa as amostras (as fitas da primeira dimensão) foram colocadas em gel SDS-PAGE de concentração de 15% de acrilamida para corrida da 2ª dimensão (de acordo com a massa molecular). Após o gel ser corado com Coomassie Brilliant Blue G250 (CBB G250) em técnica compatível com espectrometria de massa, os spots de interesse foram recortados do gel, descoradas com metanol 50% (v/v) e ácido acético 5% (v/v), reidratadas com bicarbonato de amônio 50 mM e digeridas com tripsina (20 ng/µL) em uma relação proteína:tripsina de 100:1 por 15 horas a 37°C. Os peptídeos digeridos foram extraídos com acetonitrila 50% (v/v) e ácido fórmico 5% (v/v).

Os peptídeos extraídos foram enviados para análise em espectrômetro de massa ESI-QUAD-TOF (Micromass). Duas análises diferentes foram realizada: *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF), na qual os peptídeos têm suas massas determinadas, as sequências das proteínas são digeridas in situ (www.expasy.com.br) e as massas comparadas para confirmação da identidade ou MS/MS, na qual os peptídeos digeridos com tripsina são submetidos a uma nova fragmentação e os produtos são sequenciados para gerar um arquivo com dados que são comparados a um banco de dados e a identidade da proteína é revelada.

4.6 Caracterização da enzima exo-1,4-β-D-glucanase (celobiohidrolase I - EC: 3.2.1.91) de *T. harzinaum*

4.6.1 Purificação da CBHI

A enzima celobiohidrolase I (CBHI) foi purificada por técnicas de cromatografia líquida em equipamento FPLC (*Fast Performance Liquid Chromatography* – Amersham Bioscience).

A clarificação e concentração da amostra deu-se por precipitação com sulfato de amônio a 80% de saturação. Após precipitação, a amostra foi dessalinizada por troca de tampão em concentrador *vivaspin (Amersham Bioscience)* ou submetida à coluna *HiTrap Desalting*. O tampão utilizado foi Tris-HCl 50 mM, pH 7.0.

O segundo passo de purificação se deu com coluna de troca aniônica Q-sepharose HP 16/10. A proteína foi separada em tampão Tris 50 mM pH 7.0 e eluída em gradiente de 0 a 100% (em 5 volumes de coluna) do mesmo tampão de equilíbrio, adicionado de NaCl 1M. A remoção de traços de contaminantes deu-se por um terceiro passo de purificação em coluna de gel filtração Superdex 75 16/60 com tampão Tris 50 mM pH 7.0, NaCl 200 mM e glicerol 5%. As amostras foram concentradas e tiveram os tampões trocados em concentradores Vivaspin (Amersham-Bioscience).

A pureza da preparação protéica foi analisada por SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate* – *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) em gel de poliacrilamida 15%, sob condições desnaturantes⁹⁵. Como marcador de massa molecular foram utilizadas as seguintes proteínas de massa molecular conhecidas (kit Bio-Rad): soro albumina (66,2 kDa); ovoalbumina (45 kDa); anidrase carbônica (31 kDa); inibidor de tripsina (21,5 kDa); lisozima (14,4 kDa); aprotinina (6,5 kDa). Os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue R-250* e o conteúdo proteico determinado pelo método de *Bradford*⁹⁶, com albumina soro bovina como padrão.

4.6.2 Digestão da CBHI com papaína para separação dos domínios catalítico e CBM

A digestão foi realizada a temperatura ambiente (20°C) por 2 horas com uma relação proteína: papaína de 5:1 (w/w) em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,5. A separação do domínio catalítico deu-se por cromatografia de exclusão molecular em coluna superdex 75 10/30, com tampão tris 50 mM pH 7.0 e 200 mM de NaCl.

4.6.3 Eletroforese em gel nativo (em condições não desnaturantes)

Este gel foi usado para a verificação de possíveis monômeros, dímeros ou multímeros das enzimas em questão. Essa técnica permite a separação das proteínas baseada na diferença de cargas, massa molecular e conformação, enquanto mantém sua integridade conformacional e sua atividade biológica. A eletroforese foi feita com o sistema *Phast* (Amersham Biosciences) em gel não desnaturante com gradiente de 8-25% de acrilamida. Como marcador molecular foram utilizadas as seguintes proteínas de massa molecular conhecidas: tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), catalase (232 kDa), aldolase (140 kDa) e albumina (67 kDa).

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

Para determinar as faixas ideais de temperatura e pH nas quais a enzima CBHI apresenta atividade ótima foi realizado um Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) contendo 5 níveis para cada variável independente. Para isso foi feito um fatorial 2^2 com 4 ensaios (-1 e +1) adicionados de 4 pontos axiais (-1,44 e +1,44) e 3 pontos centrais (0), totalizando 11 experimentos, com uma distribuição ortogonal. As variáveis independentes (k = 2), ou seja os fatores analisados, foram baseados na literatura e consistem em temperatura

(30 a 70°C) e pH (3 a 7). Os valores codificados e reais das variáveis independentes são dados na **Tabela 1**. No total 11 experimentos foram realizados, sendo 22 experimentos para um fatorial completo mais 2x3 experimentos extras e três replicatas do ponto central para avaliar o erro puro. A variável dependente, ou resposta obtida (atividade de pNPG) foi ajustada a um modelo polinomial de segunda ordem conforme demonstrado abaixo:

$$Y = \beta_0 + \sum_j \beta_j x_j + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \sum_j \beta_{jj} x_j^2 + e$$

Onde:

- Y é a atividade de pNPG;
- B_o é o coeficiente constante;
- B_j, B_{jj} e B_{ij} são os coeficientes para o efeito linear, o quadrático e o de interação, respectivamente;
- x_i é a variável independente;
- ε é o erro.

Os dados dos experimentos foram interpretados pelo programa STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc.) com o objetivo de analisar a significância estatística dos coeficientes de regressão para as variáveis dependentes, a variância do ajuste do modelo (ANOVA) e gerar o gráfico de superfície de resposta tri-dimensional (SRM).

	Variáveis combina	adas	Variáveis codificadas		
Tratamento	Temperatura (°C)	pH	Temperatura (°C)	pН	
1	30	3	-1	-1	
2	30	7	-1	1	
3	70	3	1	-1	
4	70	7	1	1	
5	21,8	5	-1,44	0	
6	78,2	5	1,44	0	
7	50	2,18	0	-1,44	
8	50	7,82	0	1,44	
9	50	5	0	0	
10	50	5	0	0	
11	50	5	0	0	

Tabela 1 - Valores codificados e reais para os diferentes tratamentos combinando temperatura e pH

4.6.5 Estudos de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

Os estudos de espalhamento de raios-X a baixo ângulo foram utilizados para análises estruturais de baixa resolução de macromoléculas em solução. Foram obtidas informações sobre o estado de oligomerização da proteína. Esta ferramenta funciona bem em estudos moleculares de proteínas em solução e proporciona informações complementares às obtidas pela cristalografia de proteínas^{97; 98; 99}. Esses estudos foram realizados em colaboração com o Dr. Mario de Oliveira Neto do Instituto de Física da USP/São Carlos. As medidas de SAXS foram realizadas na linha SAXS 2 no LNLS, em Campinas-SP.

4.6.5.1 Condições dos experimentos

O Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) foi coletado para duas concentrações de CBH1, 4.5 e 9.0 mg/mL, e domínio catalítico (CORE), 3.5 e 7.0 mg/mL, na linha SAXS 2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrontron (LNLS, Campinas, Brasil). As amostras, em tampão Tris-HCl 50 mM, pH7, foram centrifugadas a 23500 g, a 4°C para remover qualquer agregado. Para as medidas foram utilizados comprimento de onda λ =0.148 nm, detector bidimensional CCD (MarResearch USA) e distância amostra-detector de 1193.4 mm, cobrindo uma transferência de q a magnitute do vetor-q e definido por $q = 4\pi \sin \theta / \lambda$ $(2\theta \text{ é o ângulo de espalhamento entre os feixes incidente e espalhado})$. As amostras foram colocadas em uma célula de 1 mm de espessura com janela de mica a 10°C. As curvas de espalhamento das soluções de proteínas 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. A 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 das soluções de proteína nas diferentes concentrações. Finalmente os padrões bidimensionais das diferentes concentrações de CBHI foram integrados em 20 usando o software Fit2D e as curvas construídas pela concentração de proteína.

4.6.5.2 Análise dos dados de SAXS

O raio de giro (R_g) é uma medida global do tamanho do complexo molecular e foi obtido por dois métodos distintos, utilizando a equação de Guinier $I(q) = I(0)e^{-\frac{1}{3}R_g^2q^2}$ e pelo método de Transformada Inversa de Fourier implementado no programa Gnom¹⁰⁰, onde também obteve-se a função de distribuição de distâncias p(r) e o $D_{máx}$ das proteínas.

4.6.5.3 Cálculo da massa molecular
A massa molecular foi calculada para as duas moléculas usando um novo procedimento implementado na webtool SAXSmoW⁹⁸. Esse procedimento para calcular a massa molecular e consequentemente o estado oligomérico da proteína não requer a intensidade da medida de SAXS em uma escala absoluta e não envolve uma comparação com outras curvas de SAXS determinadas de um padrão conhecido de proteínas.

4.6.5.4 Modelo ab initio

Modelos tridimensionais de átomos dummy (DAMs) foram obtidos *ab initio* a partir dos dados de SAXS utilizando os programas Dammin¹⁰¹ e Gasbor¹⁰¹. A determinação de forma *ab initio* foi realizada partindo de diferentes condições inicias, com o objetivo de reduzir a probabilidade de se inferir uma estrutura errônea . Este procedimento levou a resultados consistentes, conforme julgado pela similaridade estrutural dos modelos em um processo estável e consistente. O programa Crysol¹⁰² foi usado para gerar as curvas de espalhamento simuladas dos DAMs, bem como para determinação de R_g e D_{max}, e os parâmetros de discrepância (χ).

4.6.5.5 Modelagem por Homologia dos domínios catalítico (CCD) e de ligação (CBM)

As estruturas dos domínios catalítico e CBM foram preditas pelo programa de modelagem *Swiss Model Server*^{103; 104} usando como moldes as estruturas depositadas no *Protein Data Bank* (PDB) dos domínios da CBHI de *T. reesei*, o catalítico (PDB id: 2V3I) e o de ligação à celulose (PDB id: 1CBH), os quais têm 81.8 e 80,6% de identidade de sequência com os domínios da CBHI de *T. harzianum*, respectivamente.

4.6.5.6 Modelo de corpo rígido

A posição relativa dos domínios catalíticos e de ligação à celulose, construídos por homologia, foi determinada usando modelagem de corpo rígido contra os dados de SAXS. Até a presente data, devido a alta flexibilidade do "linker", não existem estruturas cristalográficas de CBHI contendo os dois domínios. O processo de minimização foi realizado utilizando o pacote Sasref¹⁰⁵. O refinamento de corpo rígido determinou as posições relativas e a orientações dos domínios de CBHI, permitindo um melhor posicionamento das estruturas dentro do modelo de átomos dummy (DAM). O programa Crysol¹⁰² foi usado para gerar as curvas de espalhamento simuladas do modelo de corpo rígido, bem como para determinação de R_g e D_{max}, e os parâmetros de discrepância (χ).. O modelo de corpo rígido e DAM foram automaticamente superpostos usando o programa SUPCOMB¹⁰⁶. Figuras da superposição dos modelos foram geradas com o programa PyMOL¹⁰⁷.

4.7 Expressão heteróloga

Para que as proteínas expressas em baixas concentrações pelos fungos pudessem ser produzidas em quantidades significativas para os testes de caracterização a que o projeto se propunha, foram feitos testes de expressão heteróloga. Os microrganismos escolhidos para essa próxima etapa foram a levedura *Pichia pastoris* e o fungo filamentoso *Aspergillus niger*.

4.7.1 Expressão heteróloga em Pichia pastoris

A estratégia de expressão da proteína swolenina utilizou, primeiramente, o sistema de expressão de leveduras e elegeu a *P. pastoris* para tal experimento pela sua bem conhecida capacidade de secreção de enzimas celulases.

As células de *P. pastoris* foram mantidas em estoques permanentes em meio YPD (extrato de levedura, peptona e glicose) com 30% de glicerol a -80°C. O cultivo da levedura deu-se a 28°C com os meios de cultivo adequados a cada fase do experimento.

4.7.1.1 Clonagem do gene da swolenina de *T. reesei* em vetor de expressão para *P. pastoris*

O gene da swolenina foi isolado de uma biblioteca de cDNA de *T. reesei* (produzida pelo Dr. José Ribamar dos Santos Ferreira Júnior) com os seguintes oligonucleotídeos: 5'CAT ATG AAT TGC GCA GCA TTA TTT GGC3' (FW) e 5'GCG GCC GCT CAA TTC TGG CTA AAC TGC ACA C3' (RV), os quais contêm sítios para as enzimas de restrição NDE e NOTI, respectivamente. O fragmento amplificado foi subclonado no vetor pET28a e a construção foi utilizada como DNA molde para uma segunda amplificação por PCR para recuperação da sequência de DNA da proteína em estudo adicionada da cauda de histidina do pET na porção aminoterminal do fragmento. Os oligonucleotídos utilizados foram: 5'AGACCTAGGATGGGCAGCAGCCATC3' (FW) e o reverso se manteve o mesmo da construção anterior. Esse oligonucleotídeo possui sítio para a enzima *AvrII*. O fragmento amplificado foi, então, subclonado no vetor Ppic9k (Figura 12) com a linearização do vetor sendo dada por *SacI*. Essa estratégia beneficia a formação do fenótipo His⁺Mut⁺ em GS115, pois permite a inserção do gene no AOX1 do genoma da levedura. O fator de secreção α -factor permite que a proteína seja secretada da célula.



Figura 12 - Vetor pPIC9K utilizado para expressão do gene da swolenina em P. pastoris.

4.7.1.2 Transformação de células de P. pastoris

O protocolo de transformação seguiu o proposto no manual da invitrogen para transformação por eletroporação (*Pichia Expression Kit Version F*), disponível online, em equipamento da BioRad. O método de seleção escolhido foi por placas com meio MD (YNB

1,34%, biotina $4x10^{-5}$ %, dextrose 2%, Agar 1,5%) para seleção de colônias transformadas por fenótipo *His*⁺. As duas linhagens de *P. Pastoris* utilizadas, GS115 e KM71, foram testadas, e cada uma foi transformada com o vetor pPIC9k possuindo o gene da swolenina ou vazio para controle do espectro de proteínas nativas (*background*) secretadas pela levedura.

4.7.1.3 Expressão da swolenina de T. reesei em P. pastoris

A estratégia de expressão adotada foi baseada no manual da *P. pastoris* disponível no site da *invitrogen*. Foram escolhidos os meios mínimos BMG (fosfato de potássio 100 mM pH 6.0, YNB 1,34%, biotina $4x10^{-5}$ %, glicerol 1%) para crescimento das células e BMM (fosfato de potássio 100 mM pH 6.0, YNB 1,34%, biotina $4x10^{-5}$ %, metanol 0,5%) para expressão da proteína.

A expressão se deu inoculando uma colônia isolada selecionada por His⁺ em 24 mL de meio BMG com crescimento a 28°C, 250 rpm até que uma DO_{600nm} de 2-6 fosse alcançada (aproximadamente 18 hrs) para que as células se encontrassem em fase log de crescimento. Nesse momento as células foram então centrifugadas a 1500 g por 5 minutos a temperatura ambiente e tiveram seus precipitados ressuspendidos em meio BMM para DO_{600nm} final de 1.0. A cultura permaneceu crescendo por 96 hrs nas mesmas condições e 0,5% de metanol foi adicionado a cada 24 hrs. Amostras de 1 mL foram retiradas diariamente para acompanhamento da expressão. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante e o precipitado foram congelados para futura análise. Aos sobrenadantes foram adicionados EDTA e PMSF na concentração de 1mM final para evitar degradação das proteínas por proteases nativas secretadas pela levedura.

4.7.1.4 Análise da expressão da swolenina de T. reesei em P. pastoris

O sobrenadante foi concentrado 10 vezes e a amostra concentrada foi aplicada em SDS-PAGE 10% de acrilamida. O gel foi corado com *Comassie Brilliant Blue R-250*.

4.7.1.5 Teste de purificação por cromatografia de afinidade da proteína expressa

A purificação se deu em cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) em coluna com cobalto (Clontech Laboratories). O tampão (A) consiste em Tris 50 mM, pH 7,0 com NaCl 150 mM. Após a interação da proteína, a coluna foi lavada com o mesmo tampão (A) adicionado de imidazol 10 mM. As eluições se deram por tampão A com 100 e com 250 mM de imidazol.

4.7.2 Expressão heteróloga em Aspergillus niger

O trabalho de clonagem e expressão das proteínas foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. Adrian Tsang, do Centro para Genômica Estrutural e Funcional (CSFG) da Universidade de Concórdia, em Montreal, Canadá.

4.7.2.1 Clonagem dos genes da CBHI, CBHII e EGLI (de *T. harzianum*) e EGLII (de *T. reesei*)

Para amplificação dos genes de interesse no estudo em questão foram desenhados oligonucleotídeos específicos de acordo com sequência gênica previamente estabelecida. Os oligonucleotídeos foram construídos de forma a flanquear as extremidades 5'e 3'do gene quando a proteína inteira era o produto de expressão requerido ou margeando domínios específicos, quando desejado. As proteínas escolhidas para o presente trabalho foram: Celobiohidrolase I (CBHI - Cel7A), Celobiohidrolase II (CBHII - Cel6A) e Endoglucanase I (EGLI - Cel 5A) do fungo *T. harzianum* e Endolgucanase II (EGLII – Cel7B) do fungo *T. reesei*. As três construções feitas para cada proteína foram: o gene inteiro (*full length*) e os dois domínios em separado – domínio core catalítico (CCD) e módulo de ligação à celulose (CBM). Para delimitação dos domínios foi utilizado o programa *Conserved Domain Database* (CDD)¹⁰⁸ (Figura 13). As 12 construções foram produzidas em plataforma *high throughput* de

clonagem utilizando as técnicas *Gateway*® ou LIC (*Ligation Independent Cloning*), conforme discutido mais adiante.



Figura 13 – Desenhos apresentados pelo CDD após análise das sequência e delimitação dos domínios para estratégias de clonagem. A) CBHI; B) CBHII; C) EGLI e D) EGLII

Para facilitar posterior processo de purificação dessas proteínas foi adicionada uma sequência extra de bases, que codificam uma sequência de 6 histidinas, na porção 3'de cada gene. Para futura remoção dessa cauda fez-se a inserção de uma sequência de bases sítio específica para clivagem pela proteína trombina. Para que ocorresse a secreção das proteínas expressas e fossem asseguradas todas as modificações pós traducionais necessárias, as construções foram feitas de modo a existir uma sequência gênica codificador de uma sequência sinal na porção 5' de cada gene. Às proteínas inteiras e aos seus domínios aminoterminal foram mantidas as sequências sinal próprias. No caso dos domínios carboxiterminal foi necessário adicionar uma sequência sinal na região 5' do gene. A adição se deu por inserção no oligonucleotídeo e a sequência escolhida consiste na sequência sinal da proteína da manase (ManA) de *Phanerochaete crysosporium* por ser já bastante utilizada pelo seu fácil reconhecimento pelo fungo *A. niger*:

3'ATGTTGAAAATCGGGTTCCTCGCTCTTGCATTTGCGCTCTCGCCGCTGGCGCAG GCTCAGMLKIGFLALAFALSPLAQAQ 5'.

A estratégia utilizada consiste na incorporação dessas sequências adicionais ao DNA através dos próprios oligonucleotídeos. Uma vez que o comprimento do oligo desenhado,

após adição de todas as caudas necessárias, tornou-se muito longo, foi escolhida a opção de se realizar a reação de amplificação no termociclador em duas etapas, com dois pares de oligonucleotídeos diferentes, para evitar possíveis complicações. Para as duas etapas de amplificação para a clonagem por *Gateway*® foram utilizados dois oligonucleotídeos reversos diferentes e um anverso, enquanto que o procedimento realizado por LIC exigiu dois pares diferentes devido a inserção, também, da sequência sinal. Como DNA moldes foram utilizadas bibliotecas de cDNA previamente obtidas para os fungos *T. harzianum* e *T. reesei*.

Os parâmetros utilizados para amplificação dos genes no termociclador foram: um primeiro passo de desnaturação a 95°C seguido por 30 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 65°C e 2 min a 72°C e finalizando a 72°C por 10 min. As duas reações de amplificação foram feitas pela enzima de alta fidelidade Phusion® DNA polimerase, em tampão apropriado seguindo manual e na presença de 250 μ M de dNTP, 2 mM de MgCl₂, 0,5 μ M de oligonucleotídeos, DNA molde e 3% de DMSO. As reações foram feitas em duas etapas, com a primeira servindo de DNA molde para a segunda, após conferência em gel de agarose 1%.

A **Tabela 2** apresenta os oligonucleotídeos das duas reações de amplificação desenhados para cada construção bem como a tecnologia empregada em cada clonagem.

GENE	OLIGONUCLEOTÍDEOS	TECNOLOGIA CLONAGEM
fCBHI	Fw1 GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGTATCGGAAGTTGGCCGTC Rv1 ATGATGATGATGATGATGGGATCCACGCGGAACCAGCAGGCACTGAGAGTAGAATG	Gateway®*
CatCBHI	Fw1 GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGTATCGGAAGTTGGCCGTC Rv1 ATGATGATGATGATGATGGGATCCACGCGGAACCAGAGTGCTGCCAATGGGTC	Gateway®*
CbmCBHI	Fw1 CTCGCTCTTGCATTTGCGCTCTCGCCGCTGGCGCAGGCTCAGACACACTACGGCCAG Rv1 ATGATGATGATGATGATGGGATCCACGCGGAACCAGCAGGCACTGAGAGTAGAATG	LIC**
fCBHII	Fw1 GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGGTTGTAGGCATTCTTGCGACTC Rv1 ATGATGATGATGATGATGGGATCCACGCGGAACCAGCAGGAATGACGGGTTC	Gateway®★
CatCBHII	Fw1 CTCGCTCTTGCATTTGCGCTCTCGCCGCTGGCGCAGGCTCAGGCCAATTCCTTTTAT Rv1 ATGATGATGATGATGATGGGATCCACGCGGAACCAGCAGGAATGACGGGTTC	LIC**
CbmCBHII	Fw1 GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGGTTGTAGGCATTCTTGCGACTC Rv1 ATGATGATGATGATGATGGGATCCACGCGGAACCAGAAGACACTGGGAGTAGTAG	Gateway®★
fEGLI	Fw1 GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGGCTCTCTCT	Gateway®★
CatEGLI	Fw1 GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGGCTCTCTCT	Gateway®*
cbmEGLI	Fw1 CTCGCTCTTGCATTTGCGCTCTCGCCGCTGGCGCAGGCTCAGCACTGGGGCCAGTGT Rv1ATGATGATGATGATGATGGGGATCCACGCGGAACCAGCTATAGGCATTGCGAGTAGTAATC	LIC**
fEGLII	Fw1 GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGAACAAGTCCGTGGCTCC Rv1 ATGATGATGATGATGATGGGATCCACGCGGAACCAGCTTTCTTGCGAGACACGAG	Gateway®*
CatEGLII	Fw1 CTCGCTCTTGCATTTGCGCTCTCGCCGCTGGCGCAGGCTCAGAACTACCCCGATGGC Rv1 ATGATGATGATGATGATGGGATCCACGCGGAACCAGCTTTCTTGCGAGACACGAG	LIC**
CDMEGLII	Fw1 GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGAACAAGTCCGTGGCTCC Rv1 ATGATGATGATGATGATGGGATCCACGCGGAACCAGCATTGCGCATAATAAGG	Gateway®*
*Rv2: GGGGA	ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCAATGATGATGATGATGATGGGATCCACGC	
**Fw2: TACT	TCCAATCCAATCCATTTGACGATATGTTGAAAATCGGGTTCCTCGCTCTTGCATTT	
**Rv2·TTAT(CCACTTCCAATCCATTGTCAATGATGATGATGATGATGGGATCCACGC	

Tabela 2 - Oligonucleotídeos desenhados para amplificação dos genes e tecnologia empregada na clonagem.

Após as duas reações de amplificação, os genes amplificados foram visualizados em gel de agarose 1%, corrido até 200V, corado com brometo de etídeo (EtBr) e comparados a marcador de DNA de 1kb. Em seguida foram preparados para ligação ao vetor de expressão de acordo com protocolo da técnica de clonagem empregada, detalhado a seguir.

O plasmídeo de expressão ANIp7G (**Figura 14**) foi construído a partir do vetor pUC18, conforme descrito no artigo de Storms e colaboradores em 2005^{109} . Ele se caracteriza por possuir os sítios inicial e terminal do promotor da glucoamilase de *A. niger* (glaA), sendo induzido por maltose ou amido; o marcador auxotrófico *pyrG*, que codifica a orotidina-5′-monofosfato carboxilase necessária para a síntese da uridina, promovendo prototrofia à cepa mutante auxotrófica para uracila, e os sítios de recombinação *att*P para a clonagem por Gateway®.



Figura 14 - Vetor de destino ANIp7G esquematizado para ambas plataformas de clonagem: (A) *Gateway*® com os sítios *att* e (B) LIC com o sítio LIC de ligação. Os sítios de corte para as enzimas de restrição são apontados, bem como a região do marcador pyrG e do promotor Gla.

4.7.2.1.1 Plataforma de clonagem por Gateway®

A tecnologia *Gateway*® é um método universal de clonagem baseado em propriedades de recombinação sítio-específicas do bacteriófago lambda¹¹⁰. Essa técnica permite, de modo rápido e altamente eficiente, integrar sequências de DNA em diferentes vetores, em uma

plataforma high throughput, facilitando a realização de testes de expressão de proteínas em múltiplos sistemas e a clonagem de diversos genes de uma só vez em um mesmo experimento¹¹¹. No sistema Gateway® os sítios de recombinação *att* originais foram modificados para aumentar a eficiência e especificadade da reação¹¹².

A recombinação ocorre entre sítios específicos de ligação (*att*achment – "*att*"), *att*B (bactéria) no gene de interesse e *att*P (*phago*) no vetor de entrada. Após a recombinação, os sítios *att*B e *att*P dão origem aos sítios *att*L e *att*R. O vetor de entrada clonado, agora com os sítios *att*L será recombinação irá reconfigurar os sítios *att*B e *att*P (**Figura 15**). Vale aqui ressaltar que qualquer plasmídeo de expressão, para diferentes organismos, pode ser convertido em um vetor para plataforma Gateway®, bem como um gene clonado em um plasmídeo de destino pode ser realocado para outros vetores de expressão somente fazendo seu retorno ao vetor de entrada e, então, uma nova recombinação LR permitirá que esse gene seja clonado em novos vetores de expressão. Apesar da recombinação ocorrer entre uma região homóloga de cerca de 15 pb, faz-se necessária a adição uma sequência extra em torno dessa região, a qual é requerida pelas proteínas de recombinação¹¹⁰. Para esse experimento foram adicionadas em todas as construções clonadas por *Gateway*® as seguintes caudas aos oligonucleotídeos:

Oligo Fw_ 5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT...(gene de interesse)3' Oligo Rv_ 5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT...(gene de interesse)3'



Figura 15 – Esquema demonstrando os passos de clonagem pela plataforma Gateway® a partir do vetor de entrada e do produto de amplificação do gene, ambos com as caudas *att* até a inserção ao vetor de expressão.

A clonagem se deu com o kit da Invitrogen®, contendo o vetor intermediário para a ligação BP (pDONR201 – Figura 16) e todas as enzimas necessárias para a recombinação. Os protocolos detalhados a partir de agora seguiram a recomendação do fabricante com alguns ajustes.



Figura 16 - Esquema do vetor de entrada pDONR201 utilizado na primeira recombinação (BP) da clonagem por Gateway®. Esse vetor permite a transferência do gene para qualquer outro vetor de expressão Gateway® (recombinação LR).

As reações de ligação dos genes amplificados com as caudas de recombinação *attB* ao vetor pDONR201, portador da cauda *att*P, foram realizadas em placas de 96 poços com cada reação compreendendo: 2 μ L do tampão de reação clonaseTM BP (5x); 0,5 μ L de enzima clonaseTM BP; 0,5 μ L de tampão TRIS-EDTA (TE), pH 8.0, e 1 μ L do produto *att*B-PCR. As reações foram mantidas a 25°C por 1 hora ou a temperatura ambiente por 15 horas, quando foram, então, transformadas em bactéria *Escherichia coli* DH5 α competente (seção 4.7.2.1.2) para a propagação de plasmídeo.

As colônias positivas para a seleção pelo antibiótico kanamicina (resistência conferida pelo vetor pDONR201) foram inoculadas em 1 mL de meio 2YT (1,6% de triptona, 0,5% de extrato de levedura e 0,5% de NaCl) em placas de 96 poços de 2 mL, cobertas com papel alumínio e cultivadas por 15 horas a 30°C sob agitação de 220 rpm. Os cultivos foram centrifugados a 4000 g e os plasmídeos purificados com kit Qiagen® conforme instruções do fabricante.

Para verificação das clonagens os plasmídeos foram digeridos com a enzima de restrição BrsGI (New England Biolabs) para liberação do inserto, quando este tivesse sido corretamente inserido no vetor. A reação se deu por adição de: 3 μ L da preparação de miniprep; 0,1 μ L de BSA (100x); 1 μ L do tampão 2 (10x); 0,1 μ L de *BsrGI* (10 U/ μ L) e 5,8

 μ L de água a 37°C por 1 hora. As reações foram analisadas em gel de agarose da mesma forma descrita acima.

Os vetores positivos foram encaminhados para a segunda etapa de clonagem, a recombinação LR. A reação foi composta por: 2 μ L do vetor de destino ANiP7G (30 ng/ μ L); 1 μ L do tampão clonaseTM LR; 0,5 μ L de enzima clonaseTM LR; 0,5 μ L de tampão TE pH8.0 e 1 μ L da preparação de miniprep do DNA de entrada (clone pDONR BP). A reação foi mantida por 25°C por 2 hrs. Ao término da reação a amostra foi tratada com *proteinase K* a 0,2 μ g/ μ L, por 10 min a 37°C para inativação das enzimas de recombinação.

Os plasmídeos, após novo processo de transformação e purificação, foram analisados quanto à correta inserção do gene no vetor ANip7G, da mesma forma que para a ligação BP ao pDONR201, ou seja, com digestão pela enzima de restrição *BsrGI*.

4.7.2.1.2 Preparo de bactéria competente e transformação do DNA

As bactérias foram preparadas para o recebimento do DNA exógeno pelo método de CaCl₂ (0,1 M). Nesse método as bactérias são submetidas a um tratamento em um meio hipotônico contendo cálcio que as torna competentes para a transformação do DNA plasmidial. As bactérias são preparadas a partir de uma cultura em fase exponencial de crescimento, através de sucessivas lavagens do precipitado de bactérias com uma solução de CaCl₂ e armazenadas a -80°C. A transformação foi feita a partir de choque térmico para inserção do DNA na célula.

4.7.2.1.3 Clonagem por LIC (Ligation Independent Cloning)

Essa técnica é baseada na propriedade de exonuclease no sentido 3'-5' da T4 DNA polimerase. A atividade exonuclease ocorre removendo um a um os nucleotídeos da extremidade 3'. Normalmente essa atividade é balanceada pela adição imediata de uma nova base, uma vez que a enzima possui também a atividade polimerase. Na presença das 4 bases

nitrogenadas a enzima mantém íntegra a sequência por adicionar uma nova base toda vez que uma é removida.

No entanto, na técnica de LIC esse balanço é desregulado propositadamente, de forma que faltem algumas bases e a atividade de exonuclease da enzima seja favorecida criando um terminal coesivo no DNA. Ou seja, se a sequência adicionada ao DNA, através dos oligonucleotídeos, possuir um resíduo de guanina somente no décimo nucleotídeo a partir do terminal 3' e a molécula for tratada com T4 DNA polimerase somente na presença de dGTP, significa que ela removerá todos os nucleotídeos e só finalizará a atividade de exonuclease quando chegar ao décimo resíduo. Geralmente são desenhados oligonucleotídeos para amplificação de vetor e do gene que gerem extremidades que permitam a enzima criar terminais complementares e coesivos de 15-20 nucleotídeos. E devido às diferenças entre as extremidades, a ligação é unidirecional.

Essa complementaridade oferece ligações de hidrogênio, que apesar de não formarem as ligações covalentes do esqueleto fosfodiéster, são estáveis o suficiente para serem transformadas nas bactérias e reparadas posteriormente por ligases da célula hospedeira¹¹³.

No presente trabalho o vetor ANiP7G e os genes de interesse (conforme já apresentado na **Tabela 1**) foram amplificados com oligonucleotídeos contendo a seguintes caudas LIC:

Vetor: Anverso_5'AAATATTGGAAGTGGATAACCTGCAGGTCCGCGAATATTCCG(vetor)3' Reverso_5'AAATATTGGATTGGAAGTACATGCAAGCTTGGCACTGGC(vetor)3' Genes: Anverso_5'-TACTTCCAATCCAATCCATTTGACGATATG(gene) -3' Reverso_5'-TTATCCACTTCCAATCCATTTGTCA(gene)-3'

Enquanto a amplificação dos genes está descrita na seção anterior, a amplificação do vetor, que ocorreu nas mesma condições, deu-se com a seguinte reação no termociclador: 98°C por dois minutos, seguido por 35 ciclos de 98°C por 10 segundos e 68°C por 4 minutos, com adição de 10 segundos a cada ciclo e finalizando com 70°C por 10 minutos. A análise do produto de amplificação se deu por gel de agarose conforme descrito acima. Ao término da reação são adicionados 2µL da enzima DPN1 (*New England Biolab*) para degradação da

fração de vetor circular presente na amostra para evitar problemas de falso positivo após ligação do vetor e transformação bacteriana. A reação se deu por 15 horas a 37°C e 20 minutos a -80°C.

O vetor e os genes amplificados, foram, em seguida, purificados do gel e tratados com T4 DNA polimerase na presença de somente dGTP (no caso do vetor) ou dCTP (para os genes). A purificação se deu por aplicação de gel de agarose preparativo de DNA, o recorte das bandas do gel e purificação com kit Quiagen® de acordo com instruções do fabricante. A etapa de purificação é extremamente importante, uma vez que exclui da amostra de DNA qualquer resquício de outros nucleotídeos que possam interferir no trabalho da T4 DNA polimerase. O tratamento com a T4, após a limpeza da amostra, deu-se com 500 ng do vetor ou 200 ng do inserto, tampão NEB 2 (1x), 2,5 mM de dGTP, 0,15 U/µL da enzima T4 e 4 mM de DTT em 20 µL final completados com água. A reação foi mantida a 22°C por 30 minutos e depois a 75°C por 20 minutos para parar a reação.

A ligação do inserto ao vetor foi feita reagindo os dois de forma equimolar em, no máximo, 8 μ L, por 30 minutos a temperatura ambiente. O esquema da ligação pelas extremidades coesivas pode ser observado na **Figura 17**, a seguir:



Figura 17 – Esquema demonstrando as extremidades coesivas construídas pela T4 DNA polimerase de acordo com estratégia do procedimento de clonagem por LIC (*Ligation Independent Cloning*).

Os clones ligados foram, agora, submetidos à transformação bacteriana e purificação dos plasmídeos da mesma forma que descrito para a plataforma Gateway® e encaminhados para posterior conferência da inserção do gene no plasmídeo. Na plataforma de clonagem por

LIC, a análise dos clones positivos é feita por amplificação dos genes pelos oligonucleotídeos específicos (**Tabela 2**), utilizando os clones recém formados como DNA molde. As reações são feitas conforme já descrito e o DNA é visualizado em gel de agarose também da mesma maneira.

4.7.2.2 Transformação dos clones em protoplasto de A. niger (cepa py11)

4.7.2.2.1 Preparação do protoplasto

Protoplastos foram preparados a partir da digestão enzimática da parede celular do micélio jovem. Para isso foi feito um inóculo contendo $2x10^6$ esporos/mL em 200 mL de meio CM (meio completo) líquido, em erlenmeyers de 1000 mL. Incubado em estufa com agitação a 100 rpm, 30°C, por cerca de 16 horas. No dia seguinte, a cultura foi filtrada a vácuo utilizando-se membrana de filtração miracloth® (Merck). O micélio foi filtrado e lavado com solução de MgSO₄ 0,6 M, com 3 volumes em relação ao conteúdo inicial. O micélio obtido, seco, foi transferido para frascos previamente pesados e calcular o peso do filtrado. Utilizar 5 mL da solução osmótica OM (NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄ 32 mM e MgSO₄.7H₂O 1,2 M) para cada 1 grama de micélio para diluir a enzima VinoTaste Pro (Novozymes), em uma relação de 250 mg de coquetel para cada 1 grama de micélio. Enzima e protoplasto foram incubados em estufa a 30°C, sob agitação de 100 rpm, por algumas horas (3-6 horas), até que o grau de digestão da parede celular fosse satisfatório e a quantidade de protoplasto obtida fosse grande o suficiente (espera-se concentração acima de 1×10^7 protoplastos/mL depois de 4-5 horas de digestão). O grau de protoplastização foi monitorado a cada 1 hora retirando pequena amostra para análise em lâmina em microscópio. Geralmente, cerca de 70-80% do micélio é protoplastizado após 3 horas. A mistura foi filtrada a vácuo, novamente utilizando a membrana de filtração miracloth®. Num tubo falcon de 50 mL foram adicionados volumes iguais de solução TB (Sorbitol 0,6 M e Tris-HCl 100 Mm, pH 7,5) e a mistura de protoplasto filtrado. A amostra foi centrifugada a 3750 rpm, 4°C, por 20 minutos. A camada intermediária (amarela) foi coletada com uma pipeta Pasteur e transferida para outro tubo

falcon. O pellet foi lavado com solução SC (Sorbitol 1M e CaCl₂ 66,2 mM) gelada até completar o volume de 40-45 mL do tubo, seguido de homogeneização suave. A amostra foi centrifugada a 3750 rpm, 4°C, por 5 minutos e teve o sobrenadante descartado. Em seguida foi ressuspendido em 2 mL de solução SC para realizar a contagem em Câmara de *Neubauer*. Após os cálculos os protoplastos foram diluídos em solução SC de forma que fique uma concentração final de cerca de 5×10^7 protoplastos/mL.

4.7.2.2.2 Transformação do protoplasto de A. niger

O processo de transformação do protoplasto com o vetor carregando o gene de interesse para integração ao genoma do *A. niger*, inicia com a mistura de 200 μ L de protoplasto (1 x 10⁷/ mL) com 10 μ L de DNA (5 – 10 μ g), 100 μ l de PEG 4000 20% (em 1 M de Tris-HCL, pH 7.5 com 1M de NaCl₂) e 20 μ L de 0,4 M de ATA (*aurintricarboxylic acid* - previne degradação do DNA) por 10 minutos a temperatura ambiente (TA). Em seguida são adicionados 1,5 mL de PEG 4000 60% (em 1 M de Tris-HCL, pH 7.5 com 1M de NaCl₂) e mantido por 20 minutos a TA. São adicionados, então, 5 mL de 1,2M de sorbitol e centrifugados por 10 min a 3750 rpm TA. Em todos os passos é realizada homogeneização por inversão com cuidado para preservar integridade do protoplasto.

Após centrifugação, o sobrenadante é descartado e o precipitado ressuspendido para 1 mL de volume final com Meio de Regeneração Seletivo (SRM - 34 % de sucrose, 70,6 mM de NaNO₃, 6,7 mM de KCl, 11,1 mM de KH₂PO₄, 0,2 mM de KOH, 2 mM de MgSO₄.7H₂O e elementos traço) e distribuído em 3 placas de petri com meio SRM com 1,5% de ágar, em volumes iguais, plaqueado e mantido em estufa húmida a 30°C por cerca de 4-6 dias.

A cepa *A. niger py11* possui marcador de seleção pyrG, sendo auxotrófico para uracila, logo o meio seletivo (SRM) permite o crescimento somente das células que tiveram o DNA do vetor integrado ao seu genoma e com isso adquiriram a capacidade de produzir uracila.

4.7.2.2.3 Teste de expressão dos transformantes selecionados

As colônias selecionadas crescidas após 4-6 dias foram testadas quanto a sua capacidade de expressão do gene específico. Cada colônia foi inoculada individualmente em 1 mL de meio MMJ (meio mínimo com 15% de maltose) e placas de 24 poços foram utilizadas para os testes. As placas permaneceram em cultura estacionária por 7 dias a 30°C. Géis de SDS-PAGE, 15% de acrilamida, foram utilizados para o monitoramento do secretado pelas culturas entre 5 e 7 dias de cultivo. Os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue* R-250 e descorados com ácido acético 10%.

Todo o precedimento de clonagem foi realizado para as proteínas swoleninas, de *T. harzianum* e *T. reesei*, tanto a proteína inteira quanto o domínio expansina e o CBM em separado, da mesma forma que as demais celulases.

4.7.2.3 Caracterização das proteínas expressas

4.7.2.3.1 Produção das enzimas

As colônias identificadas como positivas nos testes de expressão foram repicadas para nova placa SRM e mantidas em estufa a 30°C por 6 dias. Os esporos produzidos em cada placa foram coletados em 12 mL de solução salina (0,5% NaCl) e contados em câmara de Neubauer. $2x10^6$ esporos/mL foram inoculados em meio MMJ em frascos *erlenmeyers* e mantidos em cultura estacionária em estufa a 30°C por 6 dias.

As culturas foram, ao final de 6 dias, filtradas em papel filtro e concentradas por precipitação com sulfato de amônio a 80% de saturação por 12 horas. A amostra foi, então, centrifugada a 9000 rpm por 40 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado de proteína resolubilizado em tampão adequado ao próximo passo de purificação.

As sete proteínas produzidas foram encaminhadas aos ensaios de purificação por cromatografia de afinidade, uma vez que possuem cauda de histidina fusionada na porção carboxi-terminal. Para isso foi necessário dessalinizar as amostras em coluna de gel filtração da mesma forma que descrito para purificação da CBHI de *T. harzianum*.

4.7.2.3.2 Purificação da enzima CBHII e do domínio catalítico da EGLI de T. *harzianum* e da EGLII de T. *reesei*

As enzimas CBHII e EGLII foram purificadas por cromatografia de afinidade em metal imobilizado (IMAC), em coluna de cobalto (TALON - Clontech) sendo eluídas da coluna com 150 mM de imidazol em tampão de equilíbrio (fosfato de sódio 50 mM, pH 7.0, 300 mM de NaCl). As lavagens da fração ligada não especificamente se deram em 5 vezes de 2VC (volumes de coluna) com tampão de equilíbrio e as eluições foram feitas em 3 passos de 1 VC. O domínio catalítico da EGLI foi purificado por precipitação com sulfato de amônio seguido por cromatografia de exclusão molecular, conforme descrito a seguir.

Os estudos com as enzimas EGLII e CBHII estão em estágio inicial de caracterização. Por hora foi estabelecido protocolo de purificação, conforme descrito acima e teste de atividade para confirmar que além de produzida e purificada a enzima estava ativa. Os estudos de caracterização biofísica, bioquímica e estrutural estão sendo realizados por outros alunos do grupo de Biotecnologia Molecular sob a mesma orientação.

4.7.2.4 Caracterização do domínio catalítico da EGLI (catEGLI), uma Cel5A de T. harzianum

O domínio catalítico da EGI de *T. harzianum*, expresso em *A. niger*, de acordo com seção 4.7.2, foi purificado por precipitação com sulfato de amônio seguido por gel filtração. O extrato extracelular do fungo *A. niger* após os 5 dias (120 horas) de cultivo apresentou-se bastante limpo em termos de proteínas nativas (*background*) consideradas contaminantes no processo de purificação da proteína alvo. Esse perfil sugeriu um processo de purificação simples e em poucas etapas a fim de se evitar perdas no rendimento da proteína. Para isso a proteína foi precipitada com sulfato de amônio a 80% de saturação por 15 horas. Em seguida foi aplicada a coluna Superdex 75 16/60 em sistema *Äkta Purifier* (GE Healthcare®) em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5.0 com 150 mM de NaCl.

Para confirmação da homogeneidade da proteína após o processo de purificação, e averiguação da existência de possíveis contaminantes, ela foi submetida à experimento de

SDS-PAGE corado com nitrato de prata (AgNO₃)¹¹⁴ para maior sensibilidade do método de visualização. Após a confirmação do alto grau de pureza é que a proteína foi encaminhada para os ensaios de caracterização.

A proteína pura foi aplicada em gel filtração analítica Superdex 75 10/30 (*GE Healthcare*) a um fluxo de 0,5 mL/min com tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5.0. A coluna, calibrada com proteínas de massa molecular conhecidas e nas mesmas condições que a proteína em estudo, serviu para conferência da massa molecular exata e do estado oligomérico da enzima nessas condições.

A caracterização inicial da proteína deu-se no sentido de confirmar seu perfil de ação de endoglucanase e identificar alguns parâmetros de atividade, condições ótimas e estabilidade.

4.7.2.4.1 Teste de estabilidade – atividade residual

Para verificação da estabilidade da proteína a mesma foi incubada a 50°C, em pH 3, e alíquotas foram retiradas de tempo em tempo para análise de sua atividade contra CMC 1%.

4.7.2.4.2 Gel nativo

Para caracterização do estado oligomérico da proteína foi realizado experimento de eletroforese em condições nativas. O ensaio se deu da mesma forma que descrito anteriormente, na caracterização da CBHI (seção 4.6.3).

4.7.2.4.3 Painel de substratos

Após confirmação da identidade e integridade da enzima, por teste contra CMC 1% foi realizado teste de atividade da enzima a 2 μ M, contra painel com ampla variedade de

substratos, para identificação das moléculas que a enzima catEGLI é capaz de quebrar. Foram testados os seguintes substratos: arabinano de centeio e do trigo, arabinano não ramificado, arabinoalactano do lariço, xilano de madeira de faia e de aveia, xiloglucano, β -glucano, galactomanano, laminarina, carboximetilcelulose, lignocelulose, sigmacel, glucomanano konjac, avicel, liquenano, polpa de bagaço, β -manano, locuste e 4-nitrofenil- β -D-galactopiranoside (pNPG), todos a 1%, e em pH 5.0 (pH ótimo das endoglucanases), com tampão citrato de sódio 50 mM. Os substratos com resultado positivo serviram de base para o próximo experimento, o de eletroforese capilar.

4.7.2.4.4 Eletroforese Capilar de Zona (CZE)

Experimentos de eletroforese capilar de zona (CE) foram utilizados para traçar o perfil de degradação dos substratos e conhecer os produtos liberados pela catEGLI. Os experimentos foram realizados sob a orientação do Dr. Fábio Squina, no CTBE. Nessa técnica analítica, os açúcares, provenientes da hidrólise enzimática, são submetidos a um campo elétrico e sua separação se dá de acordo com os diferentes graus de mobilidade. As moléculas a serem analisadas são marcadas com sonda fluorescente permitindo assim a sua detecção. Uma análise comparativa com padrões conhecidos permite caracterizar alguns parâmetros do mecanismo de ação da enzima sobre o substrato. As reações enzimáticas foram realizadas de acordo com experimento de teste de atividade padrão já descrito anteriormente.

Para esse experimento duas estratégias foram utilizadas: na primeira o substrato marcado com o 8-aminopireno-1,3,6-ácido trisulfonico (APTS) é submetido à hidrólise pela enzima e os produtos já marcados são analisados; e na segunda o produto da digestão de substratos mais complexos e com maior grau de polimerização são submetidos à marcação e então analisados.

Os substratos utilizados foram: celulose com pequenos graus de polimerização (C4, C5 e C6), celulose amorfa (CMC), β -glucano e liquenano. Foram realizadas hidrolises parciais e totais com esses substratos, variando para isso o tempo em que enzima e substrato marcados com 1pM de APTS ficaram incubados a 50°C.

A análise dos produtos de quebra dos substratos 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 oligossacarídeos. As condições de eletroforese foram 15kV/70-100µA utilizando 100mM fosfato de sódio (pH2.5) como tampão de corrida e temperatura controlada a 20°C. O capilar foi lavado com 1M NaOH seguido pela corrida do tampão para prevenir contaminações. Os substratos marcados com APTS foram excitados a 488nm e a emissão foi coletada através de um filtro de 520nm⁵².

4.7.2.4.5 Teste de temperatura e pH ótimos

Para identificar as condições ótimas de catálise da enzima foram realizados testes enzimáticos em diferentes pHs e temperaturas. Os diferentes pHs e temperaturas testados foram pHs 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 e temperaturas 78,1; 75; 70,3; 64,3; 59,9; 56,8; 55; 49,1; 45,3; 39,3; 34,8 e 31,7°C. A variação de temperatura foi conseguida em equipamento de termociclador, da Bio-Rad, com controle de temperatura das canaletas individual. O tampão utilizado para a variação de pH foi o acetato/borato/fosfato 40 mM e as reações enzimáticas foram realizadas de acordo com experimento de teste de atividade padrão já descrito anteriormente (seção 4.3).

4.7.2.4.6 Experimento de Deslocamento Térmico (Thermal shift)

Com o intuito de monitorar a estabilidade da proteína frente a diferentes pHs e temperaturas foi realizado experimento de deslocamento térmico ou thermal shift. O experimento foi realizado em um equipamento de PCR em tempo real Rotor Gene 6 (Cobertt). A proteína pura na concentração final de 0,1 mg/mL foi incubada com os diferentes ligantes a serem testados. A sonda *SYPRO orange* (Invitrgen) foi diluída no mesmo tampão da amostra de proteína eluída da purificação por gel filtração e depois adicionada a solução contendo

proteína e ligante, resultando em uma diluição de 1:2000. Logo após a adição da sonda foram realizadas as medidas, que para a detecção da fluorescência a excitação ocorreu a 473 nm e a emissão a 570 nm. As amostras foram aquecidas passando por um intervalo de temperaturas iniciado em 25°C e terminava em 90°C. Todas as medidas foram feitas em triplicata para cada molécula testada. A análise das curvas de desnaturação da proteína e obtenção do valor de T_m para posterior comparação foram obtidos utilizando o programa Origin 8.6 (OriginLab) e a planilha Excel *DSF analysis tool* (ftp://ftp.sgc.ox.ac.uk/pub/biophysics).

Essa técnica biofísica, baseada no fenômeno de fluorescência, conta com um marcador fluorescente, nesse caso o Sypro® Orange (Invitrogen), sensível às condições do ambiente em que está inserido. O ensaio funciona com o monitoramento das mudanças de sinal emitidas pelo marcador enquanto a proteína vai se desenovelando e variando o ambiente ao qual o marcador está ligado. O marcador se liga às regiões hidrofóbicas da proteína e quando esta encontra-se perfeitamente enovelada, sem regiões hidrofóbicas expostas, o marcador fica exposto ao solvente, sem sinal de fluorescência. Com aumento de temperatura ou pH desfavorável à estabilidade da proteína, esta começa a desenovelar, com a consequente interação da sonda com as regiões hidrofóbicas e a emissão de sinal fluorescente .

4.7.2.4.7 Ensaio de Dicroísmo Circular (CD)

Um ensaio de dicroísmo circular foi realizado para caracterização da estrutura secundária da proteína. A proteína foi incubada em tampão acetato /borato/fosfato 40 mM, nos pHs 3, 4, 5, 7, 8 e 9. Espectros de UV distante foram medidos utilizando cubeta de quartzo de 0,1 cm a 25°C com a proteína a uma concentração de 5 μ M, em espectropolarímetro Jasco J-720 (Jasco Co.). Os espectros foram coletados entre 195-250 nm pelo sinal médio de 8 espectros. O instrumento foi ajustado para escanear a uma velocidade de 100 nm/min e resolução de 1 nm. O branco do tampão foi deduzido do espectro da amostra para resultar no espectro da proteína.

5 **RESULTADOS**

5.1 Cinética de produção das enzimas pelo fungo T. harzianum

O fungo foi cultivado em biorreator para produção das enzimas sob controle de temperatura, pH, aeração e agitação (Figura 18). A expressão do complexo celulolítico foi acompanhada por medidas de quantificação proteica e atividades de Beta-glicosidase, de CMCase e FPase para pontos coletados a cada 24 hrs, iniciando em 48 hrs, durante 7 dias de crescimento (Figura 19). O total de proteínas secretadas pelo fungo foi de 300 – 400 µg/mL.



Figura 18 – Imagem do bioreator (New Brunswick Scietific) com 7 dias de cultura de *T. harzianum* em meio de cultivo com Avicel®.





5.2 Experimento de hidrólise enzimática

5.2.1 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço, após ser triturado e peneirado para padronização das fibras, foi submetido a tratamento ácido para remoção parcial de lignina e hemicelulose, seguido de tratamento alcalino para separação parcial da lignina (**Figura 20**). As amostras de celulignina tratadas foram secadas a 60°C em estufa com circulação interna de ar e a forma do bagaço pré-tratado pronto para os experimentos de hidrólise pode ser observada na **Figura 21**.



Figura 20 – Aparência da amostra de bagaço após tratamento alcalino com 4% de NaOH e liberação da lignina para a fração solúvel.



Figura 21 – Imagem de bagaço secando em estufa com circulação interna de ar a 60°C. Amostra pronta (pré-tratada) para os ensaios de hidrólise enzimática.

5.2.2 Análise da composição do bagaço in natura e da celulignina parcialmente deslignificada

A Tabela 3 apresenta a composição das amostras de bagaço, in natura e pré-tratado com NaOH 4%, utilizadas nos experimentos de hidrólise. A soma de todos os componentes ($95.5 \pm 4,3\%$ e $97,0 \pm 3,4\%$ para bagaço e celulignina, respectivamente) resultou em próximo de 100%, levando em conta erro experimental e os extrativos parcialmente não contabilizados. Os resultados fortemente sugerem que o pré-tratamento foi eficiente em reduzir, de forma significativa, as frações de hemicelulose e lignina, enquanto aumentou o conteúdo relativo de celulose de 34, 1 % para 68%.

Tabela 3 – Composição do bagaço de cana-de-açúcar e celulignina parcialmente deslignificada depois de prétratamento ácido seguido de pré-tratamento com NaOH 4%.

Componentes	Bagaço de cana-de-açúcar (% w/w)	Celulignina parcialmente deslignificada (% w/w)
Celulose	34.1 ± 1.2	68.0 ± 1.3
Hemicelulose	29.6 ± 1.4	12.2 ± 0.9
Lignina	19.4 ± 0.4	9.3 ± 0.6
Cinzas	7.9 ± 1.1	3.5 ± 0.4
Umidade	4.4 ± 0.1	4.0 ± 0.2
Total:	95.5 ± 4.3	97.0± 3.4

5.2.3 Análise da cristalinidade das amostras de bagaço

A cristalinidade das amostras de bagaço foi investigada por método baseado em difração de raios-X e reconstrução das intensidades isotrópicas pelo método de Rietveld. A Figura 22 mostra os difratogramas meridional ($\eta = 0^{\circ}$) e equatorial ($\eta = 90^{\circ}$) do material pré-tratado com 4% de NaOH, representando a variabilidade observada entre 63 porções da área coberta pela imagem de difração no detector (-155° $\leq \eta \leq 155^{\circ}$, divididos a cada 5°). As diferenças entre os dois difratogramas é decorrente da diferença de orientação preferencial do cristal e essas diferenças em anisotropia são adequadamente modeladas pelo método de Rietveld.

O grau de cristalinidade dos materiais pré-tratados com as diferentes concentrações pode ser observado na Tabela 4. Houve um aumento na cristalinidade da celulignina concomitantemente com o aumento observado na concentração de NaOH utilizado durante o tratamento alcalino, o que pode ser atribuído a uma remoção preferencial da matéria amorfa, uma vez que o grau de cristalinidade é uma função do peso do material. Esse aumento observado na cristalinidade não dificultou o ataque enzimático, de acordo com o observado de que o maior grau de cristalinidade foi correlacionado a um maior rendimento de hidrólise.



Figura 22 – Difratograma experimental (pontos) e modelado (linha fina) do bagaço pré-tratado com NaOH 4%. Os difratograma de reconstrução isotrópica (linha azul), background (área cinza) e contribuição do capilar (linha preta grossa) são também apresentados.

Tabela 4 – Graus de cristalinidade depois de pré-tratamento ácido seguido por tratamento com concentrações variáveis de NaOH (calculado em base seca).

	Bagaço pré-tratado (% NaOH)				
_	0.1%	0.5%	1%	4%	
Grau de cristalinida de (%)	62.9 ± 2.2	66.6 ± 3	70.5 ± 2.9	68.6 ± 3.4	

5.2.4 Hidrólise Enzimática do bagaço de cana-de-açúcar por diferentes preparados enzimáticos

Para os testes de hidrólise, a atividade enzimática total das diferentes combinações foi normalizada para 25 FPU/g de substrato e como controle e parâmetro de comparação foi utilizado

o composto enzimático comercial na metade (12,5 FPU/g) da atividade (em papel filtro) utilizada para os demais. Também foi realizado controle negativo, no qual a reação não recebeu enzimas (Figura 23).



Figura 23 – Imagens dos frascos de ensaios de hidrólise. O frasco da esquerda, nas duas fotografias, consiste no frasco do controle negativo, ou seja, sem a adição de enzimas e consequentemente sem aparência de matéria hidrolisado. O frasco da direita recebeu 25 FPU/g de substrato e apresenta aspecto líquido de degradação da fração insolúvel do bagaço pré-tratado.

Os resultados foram analisados quanto ao rendimento de hidrólise e os diferentes coquetéis enzimáticos foram comparados quanto a sua eficiência em degradar o bagaço de canade-açúcar em 18 horas (**Tabela 5**) (**Figura 24**). Verifica-se que ao final de 18 horas de hidrólise, o preparado enzimático composto de enzimas do *T. harzianum* suplementando o comercial Multifect® foi mais eficiente do que quando se utiliza somente o preparado comercial Multifect®. Este liberou o máximo de 12,99 g/L de açúcar depois de 18 hs de hidrólise quando aplicado como 25 FPU/g e 9,08 g/L quando o carregamento enimático foi de 12,5 FPU/g. A performance dos dois coquetéis foi 68,3 e 48,1% do rendimento de hidrólise teórico, respectivamente. De acordo com análises feitas pelo teste de Tukey, os valores aumentaram quando metade do carregamento enzimático foi substituído pelo combinado de enzimas produzido pelo fungo *T. harzianum* (MT), alcançando o valor de 18,42 g de glucose/ L o que representa um rendimento de 97,6% do valor teórico máximo. Por outro lado, o preparado enzimático produzido pelo *T. harzianum* comportou-se igual ao comercial Multifect®, ambos liberaram, em 18 horas, em torno de 12 g/L, o equivalente a 64%. No controle negativo dos experimentos (adição de tampão no lugar das enzimas) não houve a liberação de açúcar redutor.

Tabela 5 - Rendimento de hidrólise (%) por celulases de *Trichoderma harzianum* (T) e enzima comercial Multifect (M). Concentração de sólidos 25 g/L (celulignina com 70 % celulose).

Enzimo	Carga enzimática	Tempo de l	Tempo de hidrólise (h)					
LIIZIIIIa	total (FPU/g)	2	4	6	8	12	18	
M25	25	22,5	36,2	36,7	52,9	61,4	68,9	
M12,5	12,5	16,7	34,0	35,0	36,0	45,2	47,4	
Т	25	19,0	31,1	32,9	43,9	53,5	71,8	
M + T	25	30,3	44,1	54,7	61,4	74,2	87,9	



Figura 24 – Gráfico de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com 4% de NaOH. Comparação de eficiências de hidrólise para enzimas produzidas pelo *T. harzianum* (T), comercial Multifect® e uma mistura equilibrada de ambos (MT). Foi também avaliada a performance do coquetel comercial com a metade do carregamento enzimático dos demais (M12,5).

Para compreensão dessa maior eficiência dos coquetéis e das diferenças observadas quanto aos rendimentos obtidos, foi analisada, também, a composição enzimática, bem como o conteúdo proteico de cada preparado, conforme pode ser identificado na **Tabela 6**. A proporção de atividade FPase em relação a β -glucosidase, no preparado do *T. harzianum*, foi cerca de 1:3,7, o que é muito importante no processo de sacarificação e fermentação simultânea (SSF) pois evita acúmulo de celobiose, um forte inibidor de celobiohidrolases. Por outro lado, uma alta concentração de celobiose no hidrolisado foi identificada quando o preparado comercial Multifect® foi utilizado a 12,5 ou 25 FPU/g, liberando celobiose nas concentrações de 0,89 e 2,28 g/L, respectivamente (**Figura 25**).

Preparado		Proteína				
enzimático	FPase	Avicelase	CMCase	β-glucosidase	Xilanase	(mg/L)
Trichoderma harzianum	8.4	4.2	121.4	31.4	320.0	6.4
Multifect®	174.2	99.2	6500.0	195.3	2107.0	56.8

Tabela 6 – Atividades de celulases quantificadas nos preparados enzimáticos utilizados nos testes de hidrólise da celulignina.



Figura 25 - Celobiose liberada durante as 18 horas de hidrólise

Contudo, no meio hidrolisado pela mistura de comercial suplementado de *T. harzianum* (MT) houve um acúmulo inicial de celobiose seguido pela conversão em glucose depois de duas horas de reação. Além disso, o extrato do *T. harzianum* tem uma relação três vezes mais alta de atividade de xilanase em relação à FPase quando comparado ao Multifect® (**Tabela 1**) o que deve contribuir para sua mais alta eficiência.

5.2.5 Testes de hidrólise em bagaços com diferentes graus de deslignificação

Em uma tentativa de identificar a concentração mínima de NaOH que poderia ser usada no pré-tratamento sem interferir na eficiência de hidrólise, foram realizados testes com 4 concentrações (0,1; 0,5; 1 e 4%). Na Figura 26 é possível observar a influência desses diferentes tratamentos alcalinos no resultado de hidrólise enzimática da celulignina. Com 0,1% não houve liberação de açúcar satisfatória, enquanto que a concentração de NaOH de 0,5% apresentou uma leve redução na eficiência de hidrólise em relação aos 4% normalmente utilizados. No entanto, quando 1% de NaOH foi utilizado para remoção parcial da lignina, o rendimento observado foi equivalente ao obtido quando o pré-tratamento é feito com 4% de NaOH.

5.2.6 Efeito de BSA na eficiência de hidrólise do Bagaço com Diferentes Graus de Deslignificação

A Adição de BSA foi baseada em trabalho publicado por Yang e Wyman, em 2006⁹⁴, no qual afirmaram ser possível aumentar a eficiência da hidrólise enzimática com a adição da proteína BSA ao bagaço antes da adição do coquetel enzimático. No presente estudo os resultados demonstraram não haver diferença estatisticamente significante na eficiência de hidrólise quando BSA é adicionada antes da adição do preparado enzimático (Figura 26).



Figura 26 - Efeito de diferentes níveis de deslignificação (NaOH em diferentes concentrações) e presença de BSA na hidrólise enzimática da celulignina. A hidrólise foi realizada por um preparado enzimático composto por enzimas produzidas pelos fungos *T. harzianum* e *Penicillium funiculosum* e o comercial Multifect® em quantidades para garantir que cada um contribuísse com 8,3 FPU/g substrato em um total de 25 FPU/g.

5.3 Gel 2D do extrato extracelular de T. harzianum

Uma análise inicial do secretoma do *T. harzianum*, com 4 dias de cultivo, foi obtida a partir de gel bi-dimensional do extrato extracelular desse fungo e permitiu a identificação, em uma primeira análise, de duas proteínas por espectrometria de massa: a CBHI e a swolenina (**Figura 27**). Para identificação das demais proteínas do extrato foram necessárias repetições de todo o experimento (dados não mostrados).



Figura 27 - Gel 2D do extrato extracelular do *T. harzianum* com as duas proteínas, CBHI e swolenina, identificadas por espectrometria de massa, após análise no programa MASCOT com banco de dados do NCBI.

5.4 Caracterização da CBHI

5.4.1 Purificação da Cel7A (CBHI) de T. harzianum

A enzima CBHI foi purificada por cromatografia de troca aniônica (**Figura 28**) seguida por gel filtração. A proteína foi eluída da coluna de troca iônica com gradiente linear de 0-100% de NaCl em 5 CV. As proteínas separadas por troca aniônica foram visualizadas em gel SDS-PAGE (15 % de poliacrilamida) (**Figura 29**). As frações com a proteína CBHI foram misturadas e tratadas em coluna de exclusão molecular Superdex 75 16/60 para refinamento da purificação.



Figura 28 – Cromatograma da corrida de purificação da proteína CBHI a partir do extrato total do *T. harzianum* em coluna de troca aniônica Q-sepharose 16/10. Numeração nos picos corresponde às frações analisadas em SDS-PAGE a seguir.



Figura 29 – SDS-PAGE com a frações coletadas na coluna de troca aniôica (acima). Amostras 3 e 4, correspondentes à proteína CBHI, foram misturadas e concentradas para próximo passo de purificação.

5.4.2 Gel nativo da proteína CBHI de T. harzianum

A proteína CBHI inteira e seu domínio catalítico isolado foram caracterizados quanto ao seu estado nativo pela aplicação de um gel não desnaturante de 8-25% de acrilamida (**Figura 30**). No gel de eletroforese em condições nativas podemos verificar que as proteínas são monoméricas e apresentam uma única banda para as diferentes concentrações medidas. Este resultado reflete o fato de termos CBHI em fração pura e monodispersa em solução.



Figura 30 - Gel nativo de 8-25% de acrilamida com diferentes diluições (2, 4, 8 e 16x) de uma alíquota de 6,5 mg/mL da proteína CBHI inteira (figura da esquerda) e do domínio catalítico, obtido por digestão parcial por papaínas (gel da direita). Padrão de massa molecular (67, 140 e 232 kDa).

5.4.3 Análise por espectrometria de massa

A análise por espectrometria de massa confirmou a identidade da proteína celobiohidrolase I de *Hypocrea lixii (T. harzianum)* com cobertura de 14% de peptídeos identificados. A **Figura 31** apresenta a sequência depositada para CBHI de *T. harzianum (*gi|50400675) em banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) com os peptídeos identificados por espectrometria de massa destacados em negrito.

1MYRKLAVISAFLAARAQQVCTQQAETHPPLTWQKCTASGCTPQQGSVVL51DANWRWTHDTKSTTNCYDGNTWSSTLCPDDATCAKNCCLDGANYSGTYGV101TTSGDALTLQFVTASNVGSRLYLMANDSTYQEFTLSGNEFSFDVDVSQLP151CGLNGALYFVSMDADGGQSKYPGNAAGAKYGTGYCDSQCPRDLKFINGQA201NVEGWEPSSNNANTGVGGHGSCCSEMDIWEANSISEALTPHPCETVGQTM251CSGDSCGGTYSNDRYGGTCDPDGCDWNPYRLGNTSFYGPGSSFALDTTKK301LTVVTQFATDGSISRYYQNGVKFQQPNAQVGSYSGNTINTDYCAAEQTA351FGGTSFTDKGGLAQINKAFQGGMVLVMSLWDYAVNMLWLDSTYPTNATA401STPGAKRGSCSTGSSPTATQTHYGQCGGTGWTGPTRCASGYTCQVLNPF501YSQCLSTGSASTGSASTGSASTGSA

Figura 31 - Sequência da proteína CBHI de *T. harzianum* com a sequência de peptídeos identificados por espectrometria de massa detacados em negrito.

A proteína CBHI foi submetida a uma clivagem parcial pela protease papaína tendo liberado dois grupos de massa molecular de cerca de 50 e 16 kDa. Serão realizados testes para confirmação da identidade desses fragmentos como sendo, possivelmente, o domínio catalítico e o módulo de ligação ao substrato (CBM). Os fragmentos digeridos foram separados por gel

filtração em coluna superdex 75 10/30. Os fragmentos foram visualizados em SDS-PAGE (Figura 32).



Figura 32 – Análise da clivagem parcial da CBHI por papaína: um domínio de cerca de 50 kDa (1) e outro de aproximadamente 16 kDa (2) são analisados em SDS-PAGE.

5.4.4 Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR)

A investigação do pH e da temperatura ótima da enzima identificou ser em pH 5 e a 50°C que a enzima atua no substrato na sua melhor performance. As duas variáveis apresentaram bastante influência na resposta de atividade de pNPG e os resultados, analisados por método de regressão múltipla, são mostrados na **Tabela 7**.
	Variáveis combinada	Resposta	
Tratamento	Temperatura (°C)	рН	pNPG (U/mL)
1	30	3	25,00
2	30	7	3,80
3	70	3	6,90
4	70	7	1,50
5	21,8	5	12,70
6	78,2	5	8,40
7	50	2,18	3,50
8	50	7,82	0,00
9	50	5	86,30
10	50	5	95,20
11	50	5	95,50

Tabela 7 - Resposta aos tratamentos (variação de temperatura e pH).

O modelo, relacionando a atividade de pNPG com as variáveis independentes, temperatura e pH, foi ajustado a um polinômio de segunda ordem, mostrado abaixo:

Baseado em um nível de confiança de 95%, o modelo demonstrou ser significativo, indicando que o modelo de regressão é confiável em predizer a atividade de pNPG. Além disso, valores de Probe>F menor que 0,05 também indicam que o modelo é significativo. O coeficiente de determinação ($R^2 = 0,994$), avaliados para testar o ajuste do modelo indica que a variação da amostra de 99,4% para atividade de pNPG é atribuída às variáveis independentes e somente 0,6% da variação total não é explicado pelo modelo. A análise correspondente de variância (ANOVA) está resumida na **Tabela 8**.

Fonte	Soma dos quadrados	df	Média dos quadrados	Valor F	Prob>F
Model	17042.70	5	3408.54	161.08	0.000016
Error	108.38	5	21.16		
Total	17151.08	10			

Tabela 8 - ANOVA

 R^2 = coeficiente de determinação = 0.994

Valor de Prob>F menor que 0.05 é significante

A partir das equações de regressão obteve-se as Superfícies de Resposta e o gráfico de contorno para as duas variáveis, em função da atividade de pNPG (**Figura 33**). Considerando um tempo de reação fixo de 120 minutos, a condição ótima identificada consiste nos valores ótimos de temperatura de 50°C e pH 5.0. A atividade enzimática foi 95,20 U/mL sob esta condição ótima.



Figura 33 - Gráfico de superficie de resposta (esquerda) e gráfico de contorno (direita) indicando faixas ideais de temperatura e pH na atividade da enzima CBHI com substrato avicel.

5.4.5 Estudos de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

5.4.5.1 Análise de dados de SAXS revelam uma conformação semiestendida da Cel7A

Foram realizados experimentos de SAXS para angariar informações sobre tamanho, forma molecular, estado oligomérico e posição relativa dos domínios. As análises, realizadas com o domínio catalítico e a proteína inteira foram comparados com dados obtidos para a Cel7A de *T. reesei* no final de 1980^{115; 116; 117}, com modelos cristalográficos dos domínios isolados de TrCel7A^{118; 119} e com as estruturas obtidas através de modelagem por homologia. A alta identidade entre *T. reesei* e *T. harzianum*, 80%, pode ser melhor analisada pelo alinhamento entre as duas celobiohidrolases na **Figura 34**. A Cel7A do *T. harzianum* contém 505 resíduos enquanto que a de *T. reesei* tem 513, as duas proteinas têm a mesma organização de módulos, onde o domínio catalítico e o linker da Cel7A de T. *harzianum*, têm, cada um, 4 resíduos a menos que a CBHI de *T. reesei*. O CBM das duas enzimas tem exatamente o mesmo número de resíduos. O linker da CBHI de *T. harzianum*, com seis serinas e 5 treoninas, tem dois possíveis sítios de O-glicosilação a mais que TrCel7A (sete treoninas e duas serinas).



Figura 34 - Comparação das sequências inteiras da CBH1 de *T. harzianum* e de *T. reesei*. Alinhamento foi realizado com o programa $ClustalW^{120}$ e com ESPript¹²¹.

As curvas de SAXS para as duas concentrações de CBH1 e domínio catalítico de *T. harzianum* são similares entre si, apresentando o mesmo perfil e sem sinal de agregação. Uma comparação das curvas de espalhamento para a proteína inteira e seu domínio catalítico são mostrados na Figura 35.



A partir das análises de Guinier computou-se o raio de giro (R_g) da enzima CBHI inteira e seu domínio catalítico como 27.30 Å and 21.04 Å, respectivamente. A linearidade do gráfico de Guinier na baixa região-q mostra que a intensidade espalhada segue a Lei de Guinier e indica que as preparações das proteínas são monodispersas (Figura 35A). A massa molecular foi calculada tanto para o domínio catalítico quanto para a enzima inteira usando a técnica SAXSmoW disponível em www.if.sc.usp.br/~saxs⁹⁸, e rendeu os valores 43 kDa e 46.7 kDa, respectivamente, enquanto os valores teóricos são 47.30 kDa e 53.00 kDa. A discrepância observada entre os dados de SAXS e os valores teóricos é pequena, cerca de 10%, e suporta o fato de que as proteínas são monoméricas em solução.

A função de distribuição de distância P(r) foi obtida pela Transformada Inversa de Fourier dos dados de espalhamento das duas proteínas. Análise da função P(r) permitiu concluir que a proteína inteira tem uma forma alongada com um D_{max} de 110 Å e o domínio catalítico tem uma forma globular com um D_{max} de 60 Å (Figura 35B). A diferença de 50 Å entre as distâncias máximas são decorrentes de 59 resíduos adicionais, do linker e do CBM, em relação aos 431 resíduos de aminoácidos do domínio catalítico. Esses dados indicam que o linker é parcialmente estendido, contribuindo com a forma alongada da enzima. O linker, com 22 resíduos, alcançaria 85 Å se completamente estendido.

5.4.5.2 Forma molecular ab initio da Cel7A e as posições relativas dos seus domínios

ODAM da Cel7A inteira é alongado e claramente revela dois domínios, um consideravelmente maior que o outro. Para interpretar as posições relativas dos domínios, dentro do modelo de baixa resolução, foi realizado ajuste de corpo rígido. Modelos de alta resolução da Cel7A, preditos por modelagem por homologia, foram posicionados dentro do envelope de SAXS da proteína inteira.

Curvas de SAXS preditas a partir do modelo e experimentalmente foram comparadas usando o programa Crysol (Figura 36). O raio de giro (Rg) e o diâmetro máximo (D_{max}) da proteína inteira e do domínio catalítico preditos por dados de SAXS, modelagem por homologia e RBMs são mostrados na Tabela 9. DAM derivados de SAXS da proteína inteira e seu domínio catalítico superposto com RBM são apresentados na Figura 37.



Figura 36 – Curvas de espalhamento de raios-X e procedimento de ajuste. A) Curvas de espalhamento de SAXS para domínio catalítico da Ce7A (círculos escuros com barras de erro), curvas simuladas correspondentes ao DAM (linha tracejada) e da estrutura modelada por homologia. B) Curvas de SAXS para a proteína inteira (círculos abertos com barras de erro). Curvas simuladas correspondentes ao DAM (linha tracejada) e modelo de corpo rígido (linha sólida)

Tabela 9 - Parâmetros estruturais da CBH1 inteira e do domínio catalítico de T. harzianum obtidos por SAXS.

ThCel7A	Domínio catalítico			Inteira		
	Exp [†]	DAM [‡]	Homologia	\mathbf{Exp}^{\dagger}	DAM [‡]	RBM [¢]
D _{max} (Å)	60.00 ± 0.50	56.80	68.20	110.00 ± 0.50	110.7	116.80
R_g (Å)	20.08 ± 0.050	19.80	20.50	27.56 ±0.50	30.46	32.67
Resolução (Å)	22.70	-	-	29.39	-	-
MW_{SAXS} (kDa) ϵ	43.00	-	-	46.70	-	-

[†]Calculado de dado experimental

[‡]Parâmetros calculados dos modelos de átomos dummy

Parâmetros calculados do modelo de corpo rígido

$^{\rm \varepsilon}$ Calculado de SAXSMoW.

Resolução: $2\pi/q_{max}$



В



Figura 37 – Modelos de SAXS. A) Três posições ortogonais do envelope *ab initio* para domínio catalítico, obtido por Dammin (esferas sombreadas), sobrepostas a estrutura cristalográfica do domínio catalítico da CBHI modelada por homologia (desenho). B)Três posições ortogonais do envelope de SAXS *ab initio* para a CBH1 inteira, obtida por Gasbor (esferas sombreadas), sobrepostas ao modelo de corpo rígido.

A dimensão média do linker em solução foi estimada colocando o domínio catalítico e o CBM dentro do envelope de SAXS e computando a distância do centro de massa do CBM ao centro geométrico da superfície do domínio catalítico. O tamanho do linker é cerca de 49,5 Å, indicando uma extenção de 2,25 Å por resíduo, o que sugere que o linker seja parcialmente estendida.

5.5 Expressão heteróloga

5.5.1 Expressão heteróloga em Pichia pastoris

5.5.1.1 Amplificação da região codificadora do gene da swolenina de T. reesei

Um fragmento de 1500 pb (Figura 38), correpondendo ao gene da sowllenina, foi amplificado com a seguinte reação de PCR: 3 minutos a 95°C, início do ciclo por 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 56°C, 1 minutos a 72°C (por 35 ciclos) finalizando com 20 minutos a 72°C.



Figura 38 - Fragmento de DNA de 1500 pb amplificado a partir de biblioteca de cDNA de T. reesei.

5.5.1.2 Clonagem do gene da swolenina de *T. reesei* em vetor de expressão pPIC9k de *Pichia pastoris*

O gene da swolenina amplificado da biblioteca de cDNA (produzida no laboratório do Prof. Dr. Flávio Henrique Silva) foi clonado em vetor pTZ. O fragmento inserido no vetor foi liberado com as enzimas de restrição NDE e NOTI e subclonado em vetor pET28a previamento digerido com as mesmas enzimas. Foram realizadas duas digestões seqüenciais de acordo com manual para as enzimas de restrição da FERMENTAS. O vetor pET28a com o gene serviu de DNA molde para uma reação de PCR na qual se utilizaram iniciadores específicos para que a sequência que codifica a cauda de histidina do pET fosse inserida na mesma fase de leitura e a montante do gene da swolenina.

O fragmento amplificado com o gene da swolenina e a cauda de histidina foi subclonado em vetor pTZ e a construção foi digerida com as enzimas de restrição *AvrII* e NOTI. O fragmento liberado foi subclonado em vetor pPIC9k previamente digerido com as mesmas enzimas em duas reações seqüenciais. O vetor pPIC9k foi digerido com as mesmas enzimas para confirmação da inserção do fragmento no vetor de expressão a partir da liberação de sequência do tamanho do gene (**Figura 39**).



Figura 39 - Teste de digestão por enzimas de restrição para confirmação da inserção do fragmento no vetor pPIC9k.
1) Fragmento de DNA com tamanho correspondente ao tamanho do vetor pPIC9k linearizado (9,3 kb);
2) Fragmento de DNA de tamanho correspondente ao gene da swolenina (1500 pb).

5.5.1.3 Preparo do DNA para transformação em P. pastoris

O vetor de expressão pPIC9k foi linearizado com *SacI* para integração no genoma da *Pichia*. A linearização com *SacI* favorece a inserção no AOXI em linhagens GS115 gerando um fenótipo His⁺Mut⁺ e um fenótipo His⁺Mut^s em linhagens KM71. A linearização do vetor pPIC9k vazio para controle das proteínas nativas secretadas pela levedura e a linearização do vetor com o gene da swolenina inserido foi analisada em gel de agarose 0,8% (Figura 40).



Figura 40 - Gel de agarose 0,8% com 1) vetor pPIC9k fechado; 2) vetor pPIC9k linearizado (9,3 kb) e 3) vetor pPIC9k linearizado com o gene da swolenina (10,8 kb).

5.5.1.4 Teste de expressão heteróloga da proteína swolenina de *T. reesei* em *P. pastoris* GS115

O DNA linearizado foi inserido no genoma da levedura por transformação por eletroporação de acordo com protolo descrito no manual da invitrogen. As células transformadas foram selecionadas por fenótipo His⁺ em meio mínimo sem histidina (MD).

Algumas colônias que cresceram no meio de seleção foram inoculadas em meio de crescimento de células (BMG) com glicerol como fonte de carbono. As culturas ficaram crescendo nas condições previamente descritas por cerca de 18 horas quando foram centrifugadas e o precipitado ressuspendido em meio de expressão com metanol. (BMM). O cultivo permaneceu por 72 horas quando, então, o sobrenadante com as proteínas secretadas foi concentrado 10 vezes e aplicado em SDS-PAGE para análise (**Figura 41**). Uma banda na altura do marcador de 66 kDa foi observada. A massa molecular teórica calculada para a proteína swolenina é de 53 kDa e espera-se que, de acordo com o padrão de glicosilação, possa ser a banda em torno de 66 kDa secretada pela levedura.



Figura 41 - SDS-PAGE 15% acrilamida com sobrenadante do cultivo de *P. pastoris* concentrado 10 vezes. Uma banda na região de 66 kDa indica expressão da proteín swolenina. Seta da esquerda indica banda correspondente a proteína swolenina.

5.5.1.5 Teste de purificação por cromatografia de afinidade da proteína expressa

A proteína foi eluída com 250 mM de imidazol (**Figura 42**). A altura da banda purificada corresponde ao tamanho esperado para a swolenina glicosilada. A interação da proteína com a coluna de afinidade com cobalto reforça a afirmação de que a proteína recombinante swolenina foi expressa pela levedura. Ensaios com atividade dessa proteína serão feitos posteriormente para confirmação de sua identidade, bem como o sequenciamento por espectrometria de massa.



Figura 42 - SDS-PAGE com passos da purificação por cromatografía de afinidade. 1) Marcador de massa molecular;
2) fração injetada na coluna (extrato extracelular total);
3) Fração que não cola na coluna (*flow trough*);
4) Lavagem sem imidazol;
5) Lavagem com 10 mM de imidazol;
6) Lavagem com 100 mM de imidazol;
7) Eluição com 250 mM de imidazol. A seta da direita indica a banda com cerca de 66 kDa, provavelmente, a swolenina.

5.5.2 Expressão Heteróloga em Aspergillus niger

5.5.2.1 Amplificação dos genes

Os genes foram amplificados com os oligonucleotídeos específicos e passaram a conter as caudas necessárias para inserção no vetor ANIp7G pelas técnias de gateway ou LIC (Figura **43**). A proteína swolenina, bem como seus domínios isolados, foram clonados da mesma maneira e no mesmo vetor (dados não mostrados).



Figura 43 - Gel de agarose 1% com o produto de PCR das reações de amplificação dos genes de interesse a partir da biblioteca de cDNA. Da esquerda pra direita foram aplicados o gene inteiro, o domínio catalítico e o CBM da CBHI, CBHII, EGLI e EGLII, respectivamente.

Após amplificação os genes foram submetidos a um segundo ciclo no termociclador com outro par de oligonucleotídeos para inserção das caudas necessárias à clonagem por LIC ou Gateway®. Uma comparação entre a primeira e a segunda amplificação foi analisada para conferência da presença da cauda antes da continuidade dos experimentos (**Figura 44**).



Figura 44 – Gel comparativo entre primeira e segunda amplificação dos genes para conferência da adição da cauda de clonagem da plataforma Gateway®.

5.5.2.2 Clonagem dos genes no vetor Anip7G

Os clones gerados por LIC foram submetidos a uma reação de amplificação com os oligonucleotídeos específicos para conferência da clonagem (Figura 45).



Figura 45 – Amplificação dos genes clonados por LIC utilizando o vetor Anip7G clonado como DNA molde e os olignoucleotídeos específicos. 1) domínio catalítico da CBHII; 2) CBM da EGLI; 3) domínio catalítico da EGLII E 4) CBM da CBHI.

Os clones BP gerados por Gateway® foram analisados após digestão com a enzima de restrição BsrG1 para conferência da inserção do gene no vetor (Figura 46).



Figura 46 – Digestão, com BsrG1, dos clones BP gerados na plataforma Gateway® para conferência da inserção do gene no vetor Anip7G. 1) Controle do gene da CBHI para comparação; 2) CBHI; 3) CBHII; 4) domínio catalítico da CBHI; 5) domínio catalítico da EGLI; 6) EGLI; 7) EGLII; 8) controle com digestão de vetor vazio, sendo linearizado sem a liberação do gene.

Os clones LR gerados por Gateway® foram analisados após digestão com a enzima de restrição *BsrG1* para conferência da inserção do gene no vetor (**Figura 47**).



Figura 47 - Digestão, com BsrG1, dos clones LR gerados na plataforma Gateway® para conferência da inserção do gene no vetor Anip7G. 1) domínio catalítico da CBHI; 2) domínio catalítico da EGLI; 3) EGLI; 4) EGLII; 5) CBHII; 6) CBHI e 7) controle com digestão de vetor vazio, sendo linearizado sem a liberação do gene. Em cada amostra é possível observar, além do gene, o vetor AniP7G sendo linearizado.

5.5.2.3 Testes de expressão das enzimas por A. niger

O monitoramento das culturas de *A. niger* foi feito de 5-7 dias de cultivo. Com 6 dias de crescimento as culturas já estavam esporulando e o pH do meio de cultivo havia aumentado para em torno de 5.5 (

Figura 48). Nessas condições observamos a superexpressão de algumas das proteínas heterólogas testadas. Foi obtido sucesso na expressão de 6 proteínas: CBHI e seu domínio catalítico, EGLI e seu domínio catalítico, EGLII e CBHII (Figura 49). As proteínas swolenina, tanto de *T. harzianum* quanto de *T. reesei* não foram expressas nessas condições. Testes em microrganismos industriais, mais robustos e voltados à secreção de proteínas foram realizados em cepas não comerciais, mas o resultado não foi diferente e a proteína não foi expressa mesmo nessas condições.



Figura 48 – Imagem de placa de 24 poços utilizada na seleção de colônias positiva (foto da esquerda) e de frasco *erlenmeyer* utilizado para produção em maior escala (foto da direita). Culturas de *A. niger*, nas fotos, estão esporulando e com 6 dias de cultivo.



Figura 49 - Gel de poliacrilamida 15% com alíquotas dos meios de cultivo coletados com 6 dias de crescimento. Foram expressas as proteínas: (1) CBHI; (2) EGLI; (3) EGLII; (4) catEGLI; (5) CBHII e (6) catCBHI. As amostras destacadas como C representam o controle do total de proteínas secretado pelo *A. niger* quando transformado com vetor ANIp7G sem gene inserido (controle negativo).

5.5.2.4 Caracterização inicial das enzimas expressas

5.5.2.4.1 Confirmação da identidade por espectrometria de massa

As sequências das proteínas em estudo foram digeridas com tripsina *in situ* e as massas dos peptídeos encontradas foram comparadas às massas dos peptídeos medidos por espectrometria de massa (PMF). Os cromatogramas com as massas dos peptídeos detectados e calculadas, para cada amostra, podem ser visualizados na **Figura 50**.



Figura 50 –Espectros com as massas dos peptídeos gerados por digestão tríptica medidos por espectrometria de massa (*Peptide Mass fingerprinting*). De cima para baixo: CBHI, EGLI, EGLII, catCBHI, catEGLI e CBHII. As setas indicam os peptídeos identificados na sequência das respectivas proteínas em estudo.

5.5.2.4.2 Purificação das enzimas CBHII, EGLII e o domínio catalítico da EGLI

As enzimas CBHII e EGLII foram purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de cobalto (Figura 51 e Figura 52).



Figura 51 - Gel de poliacrilamida 15% com as fases do processo de purificação da enzima CBHII. Da esquerda para a direita foram aplicadas as amostas: (1) Injetado (total); (2) marcador de peso molecular: 66, 45, 39, 31, 20 e 12 kDa; (3) fração que não liga a coluna (FT); (4, 5 e 6) 3 lavagens com 2 VC e (7, 8 e 9) 3 eluições com 1 VC com 150 mM de imidazol.



Figura 52 - Gel de poliacrilamida 15% com as fases do processo de purificação da enzima CBHII. Da esquerda para a direita foram aplicadas as amostas: (1) Marcador de peso molecular: 66, 45, 39, 31, 20 e 12 kDa; (2) injetado (total); (3) fração que não liga a coluna (FT); (4, 5, 6 e 7) 4 lavagens com 2 VC e (8, 9 e 10) 3 eluições com 1 VC com 150 mM de imidazol.

O domínio catalítico da EGLI foi purificado por cromatografia de exclusão molecular em coluna superdex 75 16/60 com tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5.0, NaCl 150 mM (Figura 53).



Figura 53 - Gel de poliacrilamida 15% com a purificação do domínio catalítico da EGLI em coluna de gel filtração. O total injetado na coluna (2 e 3) e a fração com o pico correspondente a proteína pura (1) foram aplicados no gel. (4) Marcador de massa molecular: 66, 45, 39, 31, 20 e 12 kDa.

As proteínas puras foram testadas contra os substratos CMC 1% (EGLII e catEGLI), papel filtro e pNPc (CBHII) para confirmação de suas atividades. As proteínas ainda não purificadas estão sendo estudadas quanto as suas propriedades e encontram-se em fase de estabelecimento de protocolo de purificação. Ensaios de cinética enzimática, caracterização bioquímica, biofísica e estrutural estão sendo realizados com as proteínas puras para cumprimento da próxima etapa do projeto. Com esses estudos será possível entender o mecanismo de ação dessas enzimas e estabelecer comparações que permitam um aumento no entendimento sobre o processo de hidrólise enzimática da celulose.

5.5.2.5 Caracterização do domínio catalítico da EGLI de T. harzianum

A proteína foi purificada à homogeneidade com rendimento final de purificação de cerca de 40% (dados obtidos de análise de SDS-PAGE e quantificação por *Bradford*) e testes de atividade padrão contra substrato CMC 1% indicaram que a proteína apresenta atividade específica de 15,9 U/mg. Os cromatogramas obtidos na purificação da proteína e na coluna

utilizada para cálculo de massa molecular são mostrados nas Figura 54 e Figura 55, respectivamente. A proteína se comportou, na coluna de exclusão molecular, como monomérica e sua massa calculada ficou em 43 ± 4 kDa. Um fração menos representativa indica uma possível forma dimérica da proteína.



Figura 54 – Cromatograma de purificação em coluna Superdex 75 16/60. Pico principal corresponde à fração com a proteína pura.



Figura 55 – Cromatograma de purificação em coluna superdex 75 10/30. Calibração da coluna permitiu cálculo de massa molecular da proteína e investigação do estado oligomérico nessas condições. Seta A indica uma possível forma dimérica da proteína.

A proteína pura foi submetida a análise do grau de pureza em SDS-PAGE corado com nitrato de prata (Figura 56).



Figura 56 – SDS-PAGE (15% acrilamida) com proteína catEGLI apresentando alto grau de pureza.

5.5.2.5.1 Gel nativo

A proteína se comportou como dimérica no experimento de eletroforese de gel em condições nativas. Uma banda em torno de 90 kDa pode ser observada no gel. Uma fração menos representativa, contudo, pode ser observada em altura condizente com forma monomérica (**Figura 57**).



Figura 57 – Gel não desnaturante (8-25% acrilamida) com as duas bandas, em maior e menor intensidade demonstrando a forma da proteína dimérica (seta superior) e monomérica (seta inferior), respectivamente.

5.5.2.5.2 Painel de substratos

A enzima demonstrou ser capaz de quebrar ligações $\beta(1-4)$ entre resíduos de glucoses dos substratos xiloglucano, β -glucano, liquenano e CMC (**Figura 58**). Na **Figura 59** é possível analisar as estruturas dos carboidratos que a enzima foi capaz de clivar.



Figura 58 – Painel de substratos testados quanto à habilidade da enzima em degradar a estrutura e liberar açúcar redutor.



Figura 59 - Estrutura dos carboidratos clivados pelo domínio catalítico da EGLI de T. harzianum

5.5.2.5.3 Eletroforese Capilar de Zona (CZE)

O perfil de degradação da enzima foi traçado a partir de experimentos de eletroforese capilar de zona. Com substratos simples, ou seja, pequenos fragmentos de fibra de celulose (baixos graus de polimerização) como C4, C5 e C6, foi possível apontar que a enzima não é capaz de liberar monômeros de glucose e necessita de, pelo menos, quatro unidades de glucose (duas unidades de celobiose para cada lado a partir dos aminoácidos catalíticos) para adsorver à fibra e efetuar a catálise (**Figura 60**).



Figura 60 – Eletroferograma com o perfil de gradação, pela enzima catEGLI, dos substratos sintéticos que simulam a fibra de celulose com 4, 5 e 6 resíduos de glucose.

O mesmo experimento, porém realizado com substratos mais complexos, CMC, β glucano e liquenano, demonstrou qual o perfil de degradação da enzima sobre os mesmos (**Figura** 61).



Figura 61 – Eletroferogramas com perfil de degradação, pela enzima catEGLI, dos substratos CMC, β-glucano e liquenano (na ordem de cima para baixo), degradados em 15 minutos ou 15 horas (esquerda e direita, respectivamente).

5.5.2.5.4 Temperatura e pH ótimos

Ensaios de condições ótimas de atividade enzimática apresentaram alguns resultados um tanto surpreendentes do ponto de vista do esperado para essa família de proteínas. Primeiramente foi realizado um ensaio variando-se as condições de pH e temperatura simultaneamente para verificar possíveis influências de um sobre o outro (**Figura 62**). Identificada temperatura ótima, de 50°C, foi realizado teste de pH ótimo, o qual indicou ser a enzima de estudo bastante ácida, com pH ótimo entre 2 e 3 (**Figura 63**).



Figura 62 - Gráfico com resultados de atividade enzimática da catEGLI frente a diferentes pHs e temperatura.



Figura 63 – Gráfico apresentando a influência do pH na atividade da enzima catEGLI.

5.5.2.5.5 Teste de estabilidade – atividade residual

Alíquotas foram retiradas periodicamente de amostra de proteína incubada a 50°C, em pH 3 para monitoramento de sua atividade. Com 5 dias (120 horas) a enzima ainda mantinha sua atividade contra CMC 1%.

5.5.2.5.6 Experimento de Deslocamente Térmico (Thermal shift)

Experimentos de deslocamento térmico foram realizados para monitorar a estabilidade térmica da proteína frente a diferentes pHs. Os resultados permitem a identificação dos melhores pHs para manutenção da estabilidade da estrutura terciária da proteína, em função da temperatura, na seguinte ordem: pH2>pH3>pH4>pH5, observando que o pH de maior estabilidade permite à proteína manter seu enovelamento em mais altas temperaturas (**Figura 64**). A mesma análise pode ser feita por comparação das temperaturas de *melting* (T_m) para cada pH, sendo elas: pH 2 (61°C); pH3 (59°C); pH4 (53,4°C) e pH5 (42,2°C).



Figura 64 – Espectro de fluorescência emitida em função da temperatura em ensaio de deslocamento térmica (termal shift). As temperaturas de *melting* (T_m), para cada pH estão indicadas.

5.5.2.5.7 Ensaio de Dicroísmo Circular (CD)

Experimentos de dicroísmo circular permitiram a caracterização da estrutura secundária da proteína. O espectro de CD medido para a enzima EGI, a 25 °C, não apresentou uma banda negativa ao redor do comprimento de onda de 222 nm, indicando assim, um baixo teor de conteúdo de estruturas regulares na forma de α -hélice em sua estrutura secundária. A forma geral do espectro de CD de EGI é característico de proteínas com estrutura regular da forma de folhas- β (**Figura 65**). A análise do espectro de CD, empregando o programa CONTINLL revelou que a porcentagem (valor estimado) de α -hélices e de folhas- β são de aproximadamente 6% e 42%, respectivamente.



Figura 65 – Espectro de CD do domínio catalítico da EGLI em diferentes pHs.

6 DISCUSSÃO

O fungo *T. harzianum* atingiu uma produção compatível com a descrita na literatura para fungos com forte capacidade celulolítica, o que confere um resultado satisfatório e promissor no que diz respeito à utilização desse microrganismo para produção de coquetéis celulolíticos para fins de caracterização e compreensão do seu mecanismo de ação. A utilização de biorreatores para o crescimento da cultura, no lugar de frascos em incubadoras com agitação permitiu um aumento de 2x na quantidade de proteínas produzidas (de 200 para 400 μ g/mL) devido ao controle mais rigoroso de importantes parâmetros envolvidos no crescimento e desenvolvimento do fungo como temperatura, oxigenação e pH. Estudo de cinética de produção enzimática permitiu o estabelecimento de 4 dias (96 horas) de cultivo para alcance do pico de maior atividade de FPase, CMCase e β -glucosidase, ao passo que as proteases ainda não eram fortemente produzidas (normalmente 6 dias). O coquetel produzido foi concentrado e encaminhado para estudos de hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado para investigação de sua eficiência.

O bagaço a ser utilizado foi submetido ao processo de pré-tratamento para remoção da frações de lignina e hemicelulose, os quais dificultam a ação enzimática na celulose. A lignina representa um grande entrave na utilização desses materiais lignocelulolíticos¹²², e esse é um dos principais motivos da necessidade de se fazer um pré-tratamento. Deseja-se remover parcialmente a lignina, além de aumentar a porosidade e a acessibilidade da enzima à celulose^{8;123}. Contudo, esse é um procedimento caro para aplicações biotecnológicas e, logo, o tratamento alcalino consiste em um dos gargalos do ponto de vista econômico desse processo.

Nossos resultados dos testes de diferentes concentrações de NaOH no pré-tratamento do bagaço sugeriram que a utilização de 1% de base é suficiente no processo de remoção da lignina tanto para maior exposição da celulose quanto para permitir uma maior disponibilidade das enzimas para a hidrólise (menor adsorção inespecífica). Trabalhos na literatura indicavam a necessidade do uso de 4% de NaOH. Essa redução para 1% é economicamente e ecologicamente mais atraente. Contudo, esse aumento na concentração de NaOH levou a um aumento na cristalinidade da amostra.

Os resultados desse trabalho suportam a conclusão de que a cristalinidade da amostra

aumenta com aumento do grau de deslignificação até, pelo menos 1% de NaOH e como o grau de cristalinidade é uma relação em função do peso, esse aumento deve ser atribuído à remoção preferencial, pela base, da matéria amorfa tais como lignina, hemicelulose e celulose não cristalina. No entanto, um aumento na concentração da base para 4% levou a uma pequena diminuição na cristalinidade (de $70.5 \pm 2.9\%$ para $68.6 \pm 3.4\%$), porém, incertezas nas medidas de cristalinidade não nos permitiram concluir se houve um artefato ou uma tendência real. Além do mais, o tamanho dos cristais de celulose estimados dos dados de difração consistentemente aumentaram com o aumento na cristalinidade (dados não mostrados). Os resultados sugerem que a deslignificação do bagaço leva a um aumento na proporção e no tamanho dos cristais (condensação dos microcristais) dentro das amostras, provavelmente relacionado a remoção de lignina e hemicelulose. Essa quantificação do conteúdo cristalino na celulose é importante pois promove uma estimativa da recalcitrância da biomassa ao ataque enzimático¹²⁴.

Além do mais, nossos resultados revelam que esse aumento na cristalinidade não impede a hidrólise enzimática do bagaço, pelo contrário, o aumento na cristalinidade está positivamente correlacionado com um aumento na concentração de glucose liberada das amostras, sob um carregamento constante de enzimas. Porém, estudos sobre a acessibilidade da celulose são necessários para uma compreensão mais detalhada desse processo.

Por outro lado, não foram observadas diferenças quanto à hidrólise realizada com ou sem a adição de BSA, contrariando o proposto pelo artigo de Yang and Wyman, que observaram um aumento significativo na eficiência de hidrólise enzimática de palha de milho pré-tratada com ácido diluído. Contudo, nesse mesmo trabalho não foi observada influência de BSA no caso de celulose microcristalina, Avicel®, usada como substrato, a qual não possui áreas de superfície de lignina que permitiriam a adsorção da BSA. Levando esse resultado em conta, nós justificamos a ausência de efeito de BSA em nossos estudos alegando que o pré-tratamento utilizado nesse trabalho foi eficiente em parcialmente remover a lignina que envolve a celulose e serve como âncora de adsorção não produtiva das enzimas.

Uma comparação das atividades celulolíticas do coquetel enzimático produzido pelo *T. harzianum* e um preparado comercial, bem como uma mistura constituída pelos dois, foi realizada a fim de se encontrar uma fórmula ideal para degradação do bagaço de cana de açúcar. Até hoje, nenhum microrganismo identificado demonstrou ser capaz de produzir um coquetel enzimático com o balanço ideal de enzimas e proteínas auxiliadoras para a degradação eficiente

de biomassa à açúcar fermentescível. Fungos filamentosos bastante reconhecidos por sua habilidade em secretar enzimas celulases como *T. reesei* e *A. niger*, por exemplo, apresentam perfil de produção diferenciado. O primeiro produz um excesso de exo e endocelulases em relação a β -glucosidases, enquanto o segundo é um forte produtor de β -glucosidases em detrimento da produção de celulases. Contudo, os coquetéis enzimáticos precisam ser suplementados por enzimas nativas ou recombinantes para que apresentem alta eficiência e sejam viáveis para aplicação biotecnológica.

O preparado comercial alcançou uma taxa de conversão de 68,3%, em 18 horas, a mesma faixa alcançada pelo produto do *T. harzianum* (64,7%). No entanto, quando o comercial foi suplementado com metade do carregamento enzimático por enzimas produzidas pelo *T. harzianum* esse valor aumentou para 97,6%. Em geral, os resultados de rendimento de hidrólise obtidos nesse trabalho foram significativamente mais altos que os descritos na literatura^{125; 126; 127; 128}.

A composição dessas misturas foi analisada para melhor compreensão dos resultados o que indicou haver um desequilíbrio na proporção das classes de enzimas em relação aos dois preparados enzimáticos. O fungo *T. harzianum* apresentou uma mistura rica em β -glucosidases e xilanases, enquanto no preparado comercial essas proteínas encontram-se em mais baixas concentrações. A alta quantidade de β -glucosidases diminui o acúmulo dos inibidores de celobiohidrolases (celobiose) no meio de reação, favorecendo um processo mais eficiente.

Por outro lado, xilooligômeros foram identificados recentemente como fortes inibidores da hidrólise enzimática da celulose, capazes de inibir significativamente a sacarificação da biomassa até mesmo em concentrações tão baixas quanto 1,67 mg/mL, enquanto xilose provou ser um inibidor muito mais fraco ao processo de hidrólise¹²⁹. Essas descobertas destacam a importância da atividade de xilanase na quebra enzimática da biomassa, que, além disso, ainda aumentam o acesso das demais enzimas à celulose por remover a hemicelulose que envolve as fibras a serem digeridas. A mais alta atividade de xilanase observada para o preparado do *T. harzianum* explica a mais alta eficiência dos coquetéis que contém extratos desse fungo. Outros componentes produzidos pelo fungo *T. harzianum* como glicosil hidrolases da família GH 61¹³⁰ e swoleninas²⁰, devem também ter contribuído para os mais altos rendimentos obtidos.

Após caracterização da atividade enzimática na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar foi iniciado o estudo desse coquetel enzimático para compreensão detalhada do mecanismo de ação

de cada componente, bem como das limitações e potenciais melhorias. Um gel 2D do secretoma de *T. harzianum* chamou a nossa atenção para a existência da proteína swolenina no preparado enzimático, uma proteína auxiliadora, considerada um importante acessório na combinação ideal de proteínas para degradação da biomassa. Esse resultado, aliado ao fato de poucos dados estarem disponíveis na literatura para essa classe de proteínas, nos incentivou a tentar expressar e caracterizar a swolenina.

Contudo, a caracterização do extrato extracelular de *T. harzianum* iniciou com a purificação da enzima majoritária do coquetel, a CBHI, uma exonuclease que representa cerca de 60% do total de proteínas presentes nessa mistura. A proteína foi purificada à homogeneidade e apresentou atividade específica contra Avicel® de 0,28 U/mg, condizente com os dados disponíveis na literatura¹³¹ para a mesma enzima de organismo homólogo (*T. reesei*).

Estudos de pH e temperatura ótima planejados de acordo com desenho experimental e análise estatística indicaram que a proteína atua em sua melhor performance quando a reação se dá em pH5 e temperatura 50°C. Porém, mais importante que isso é preceber que esse experimento demonstra a robustez e tolerância da enzima a essas variáveis no processo hidrolítico. O resultado permite aos pesquisadores identificar os limites de temperatura e pH que podem ser variados sem prejudicar a atividade ótima da enzima. Em um processo industrial é necessário conhecer as variáveis que podem ser alteradas sem prejuízo à eficiência máxima da enzima enquanto reduz custos ou impacto ambiental.

A proteína CBHI também foi analisada estruturalmente com estudos de espalhamento de Raios X a baixo Ângulo (SAXS) e os resultados foram comparados com dados disponíveis na literatura. Schumuck e colaboradores mostraram que a celobiohidrolase I de *T. reesei* tem uma forma de girino consistindo de uma cabeça isotrópica e uma longa e flexível cauda¹¹⁵. Uma comparação dos dados de espalhamento de Raios X da enzima intacta e de seu domínio catalítico (CCD) em solução permitiu a identificação da cabeça do girino como sendo o domínio catalítico¹¹⁶. Mais tarde, outras análises de SAXS, apresentando a mesma forma da proteína estruturada em dois módulos, foi descrita para uma celulase de *Cellulomonas fimi* (Pilz et al. 1990).

No entanto, esses estudos pioneiros foram limitados em sua precisão e acurácia devido à falta de estruturas tridimensionais de alta resolução dos domínios isolados e também aos modestos fluxos de espalhamento de raios X disponíveis naquele momento. A estrutura do

módulo de ligação a celulose (CBM) de *T. reesei* foi determinada por RMN em 1989 (Kraulis et al. 1989) e a estrutura cristalográfica do domínio catalítico tornou-se disponível somente em 1994 (Divne et al., 1994). Porém, a única caracterização por SAXS *ab initio* da proteína inteira reportada desde então foi uma de uma enzima Cel45 de *Humicola insolens*, a qual significativamente melhorou os primeiros modelos de baixa resolução de celulases³³.

Em um esforço para ampliar nosso conhecimento sobre a organização molecular e dinâmica conformacional de uma celulase inteira em solução, nós determinamos as dimensões e forma molecular da Cel7A de *T. harzianum*, a ThCel7A. Nesse trabalho nós demonstramos que os domínios catalítico e o CBM da ThCel7A são ligados por uma sequência peptídica semiestendida mas flexível, que pode variar em tamanho o equivalente a cerca de uma unidade de celobiose, sem significativo custo energético, fornecendo indícios sobre como se dá o movimento da ThCel7A na superfície do substrato.

Como *Dmax* corresponde à distância máxima entre todas as conformações presentes em solução, é possível comparar as medidas feitas para a proteína inteira e o domínio catalítico com o objetivo de compreender o sistema de dois módulos da CBHI de *T. harzianum*. Sendo a diferença das distâncias máximas entre a proteína inteira e seu domínio catalítico de consideráveis 50 Å e considerando existir somente 58 resíduos a mais (linker e CBM) contra 431 do domínio catalítico (60 Å), pode-se deduzir que a forma alongada que a enzima assume é derivada de um peptídeo ligador em uma conformação bastante estendida. No entanto, conformações mais compactas podem também existir em solução, como sugerido pelo Rg, o qual descreve uma conformação média adotada por todas as moléculas na amostra e não somente o tamanho máximo observado. Outro indício disso são as variações pequenas observadas para o Rg entre a proteína inteira (27.3 Å) e o domínio catalítico (21.04 Å), sugerindo que este linker não é inflexível e pode assumir muitas formas em solução.

A estrutura desordenada desse linker pode também ser confirmada pela baixa densidade atômica observada de 0,3 resíduos/ Å (22 resíduos distribuídos em 64 Å), indicando falta de coesão entre os resíduos do peptídeo. Estudos em duas endoglucanases, Cel5G e Cel45, de *Pseudoalteromonas haloplanktis (Violot, 2005)* e *Humicola insolens*³³, mostraram uma densidade de 0,5 e 0,7, respectivamente. Isto está em acordo com a existência de aminoácidos cisteínas no linker da Cel5G de *P. haloplanktis*, os quais levam à formação de loops como resultado das pontes dissulfeto e, então, tornam essa região mais compactada que em ThCel7A.

Além do mais, é preciso levar em conta o impedimento estérico causado pela Oglicosilação do linker¹³², a qual restringe o espaço conformacional disponível evitando alguns ângulos de torsão na cadeia polipeptídica e provavelmente estabiliza a conformação estendida do linker.

Os dados de SAXS obtidos para a ThCel7A neste trabalho também permitiram inferir algumas considerações sobre o modo de ação de hidrólise da celulose pela análise da relação especial da enzima com a superfície da celulose. Este assunto tem atraído o interesse de muitos pesquisadores nos últimos anos, mas os detalhes do mecanismo de ação da celulase com seus dois domínios ainda permanecem desconhecidos. Receveur e colaboradores, em 2002, demonstraram, por meio de medidas de SAXS, que o linker das celulases é flexível e estendido e que as celulases se movem na celulose cristalina em forma de lagarta. Eles também propuseram ser a translação do CBM na superfície da celulose a responsável pela liberação de enrgia livre da cellulase e que esse processo ocorre quando o linker está muito estendido^{33; 133; 134}. No entanto, alguns anos mais tarde, Igarashi e colaboradores demonstraram por micorscopia de força atômica de alta velocidade (HS-AFM) que o domínio catalítico isolado da TrCel7A pode transladar ao longo da superfície da celulose em uma ação processiva sendo a única responsável por deslizar no substrato¹³⁵. O grupo conclui que a função do CBM é somente aumentar a concentração de moléculas de enzima no substrato, de acordo com o previamente proposto por Stahlber, em 1991.

Pelo menos, nos dois modelos propostos até agora é clara a necessidade de ancoragem da celobiohidrolase na celulose para um processo hidrolítico mais rápido e mais eficiente. Se a celulose consiste de resíduos de glucose conectados por ligações glicosídicas β -1,4 rotacionados 180°C em relação ao anterior, conferindo à unidade repetitiva da celulose, a celobiose, uma distância de 10,4 Å é possível estimar sua relação especial entre *Th*Cel7A e celulose. A enzima tem um *Dmax* de 110 Å, sendo a distância média do linker de 64 Å. Assumindo sua conformação média, o linker poderia ocupar seis ligações glicosídicas de orientação similar na cadeia de celulose, em outras palavras, fixando o CBM na superfície da celulose seria permitido ao domínio catalítico clivar cinco ou seis unidades de celobiose dependendo da flexibilidade do peptídeo ligador. Levando em conta a mobilidade do CBM na superfície da celulose sem dessorção³³, ele facilitaria a ação do modulo catalítico da ThCel7A, deixando mais sítios de hidrólise disponíveis e tornando o processo mais eficiente¹³⁶.

Esses resultados melhoraram consideravelmente os modelos de celobiohidrolases de espécies de *Trichoderma* disponíveis até o momento^{115; 137}, determinados quando a estrutura dos domínios não era conhecida. Este trabalho confirma a forma de girino da enzima mas corrige os valores para dimensão máxima superestimada de 180 Å obtida para a TrCel7A, que contém 513 resíduos. A ThCel7A, homóloga a TrCel7A, tem D_{max} de 110 Å e 505 resíduos de acordo com dados do modelo cristalográfico. O valor do *Rg* também foi superestimado, sendo 42,7 Å para a TrCel7A, enquanto as medidas atuais para ThCel7A mostraram um *Rg* de 27 Å. Estudo de microscopia eletrônica de alta resolução também encontrou valores menores para TrCel7A em relação aos obtidos por medidas de SAXS.

Para dar continuidade aos estudos dos componentes do coquetel enzimático e para superar a dificuldade de se obter as proteínas em quantidades necessárias aos ensaios, uma vez que, à exceção da CBHI, as demais proteínas são expressas em quantidade muito baixas, partimos para os estudos de expressão heteróloga. A proteína swolenina foi expressa em quantidade insuficiente e extremamente baixa pela levedura *P. pastoris* (dados obtidos por análise em SDS-PAGE), o que nos levou a mudar a estratégia e partir para a expressão das proteínas em fungo filamentoso.

A tentativa de expressão heteróloga das proteínas recombinantes em *A. niger* obteve grande sucesso com a expressão de 6 proteínas: CBHI e seu domínio catalítico, EGLI e seu domínio catalítico e CBHII (de *T. harzianum*) e EGLII (de *T. reesei*). As proteínas foram expressas, em microescala, em grande quantidade (entre 100 e 400 μ g/mL – dados obtidos por quantificação em SDS-PAGE com BSA como padrão). O escalonamento da produção levou a uma redução nesse rendimento (em torno de 50x), mas mesmo assim permitiu o encaminhamento dos clones positivos para produção e caracterização das proteínas.

Para esse trabalho selecionamos o domínio catalítico da endoglucanase I de *T. harzianum* para continuidade aos estudos, enquanto as demais proteínas foram repassadas para outros estudantes darem continuidade.

O domínio catalítico da EGLI foi purificado em dois passos (precipitação com sulfato de amônio e gel filtração), com rendimento estimado em cerca de 40% de proteína com alto grau de pureza. A proteína pura demonstrou-se ativa em teste contra o susbtrato CMC 1%, com atividade específica de 15 U/mg. O resultado está compatível com o disponível na literatura para a proteína do organismo homólogo, o fungo *T. reesei*, com alto grau de identidade com a proteína de estudo

(80%) e que possui atividade específica de 65 U/mg 138 . A proteína é bastante estável e com 72 horas de incubação a 50°C, em pH 3, possui uma atividade residual de 100% da atividade inicial.

A proteína se comportou como dimérica no experimento de eletroforese de gel em condições nativas, contrariando o proposto para celulases na literatura de maneira geral e, ainda, o resultado obtido na coluna de gel filtração, quando o pico de eluição majoritário obtido refletia o comportamento monomérico em solução. Acreditamos que a concentração muito mais baixa no processo de gel filtração, em relação a alta concentração da proteína no gel nativo, representa o principal motivo por esse estado oligomérico diferente observado em dois tipos de experimento. Estudos de SAXS estão sendo realizados a fim de se obter um resultado mais completo para se definir o real estado oligomérico dessa proteína em solução.

Porém, trabalhos na literatura suportam a possibilidade de celulases existirem como dímeros em solução, justificando, por exemplo, condições ótimas de atividade em determinados pHs em detrimento de outros devido a dimerização dependente de pH.

Quando testada quanto a sua capacidade de hidrólise de diferentes substratos, a enzima apresentou perfil esperado para endoglucanases, foi capaz de degradar somente os substratos esperados, confirmou o alto grau de homogeneidade na amostra (inexistência de contaminates e degradação inespecífica) e com isso, permitiu o desenho do experimento de eletroforese capilar de zona sugerindo os substratos mais interessantes a serem estudados.

De acordo com o experimento de eletroforese capilar a enzima não é capaz de liberar glucose, justificando a necessidade da adição de β -glucosidases para a produção de glucose a partir da biomassa, o que já é esperado para endoglucanases padrão. Os resultados também sugeriram uma possível atividade de transglicosilação desempenhada pela enzima em maior tempo de hidrólise (15 horas). Entretanto, novos experimentos se fazem necessários para confirmar essa nova propriedade da enzima.

O carácter acidófilo da enzima, acusado pelo experimento de pH ótimo, causou uma certa surpresa pelo fato de celulases, de maneira geral, apresentarem pH ótimo na faixa de 4 a 5,5¹³⁹. Por outro lado, a temperatura ótima em torno de 50°C confirmou o esperado para celulases produzidas por microrganismos mesofílicos como os fungos do gênero *Trichoderma*. Contudo, enzimas acidófilas são interessantes do ponto de vista industrial, uma vez que uma das tecnologias de pré-tratamento do bagaço de cana bastante utilizadas consiste na explosão a vapor do bagaço embebido em ácido concentrado, seguido pela neutralização e digestão enzimática.
Enzimas mais tolerantes ao tratamento ácido despertam o interesse pela possível redução nos custos desse processo ¹⁴⁰. Cockburn e Clarke mutaram os aminoácidos do sítio catalítico e da superfície da proteína por outros aminoácidos ou por cisteínosulfinatos. Dos 30 mutantes gerados 4 acusaram um aumento na atividade da enzima em pH baixo e três desses estavam relacionados a remoção de grupos carregados na superfície da proteína¹⁴⁰.

A forma geral do espectro de CD da EGI, característico de proteínas com estrutura regular da forma de folhas- β , está de acordo com a composição da estrutura secundária de outras endoglucanases, já descrita na literatura científica. A porcentagem (valor estimado) de α -hélices e de folhas- β estimadas por ensaio de dicroísmo circular, de aproximadamente 6% e 42%, respectivamente estão em concordância com os dados observados para o modelo de homologia de EGI, que foi predita a partir de sua estrutura primária pelo programa I-Tasser (dados não mostrados), e apresentou 9% de α -hélices e 43% de folhas- β quando analisada por Porter.

7 CONCLUSÕES

- O fungo *T. harzianum* demonstrou-se bom produtor de enzimas celulolíticas (400 μg/mL) quando crescido em meio de cultivo induzido por celulose;
- O preparado comercial Multifect® apresentou um aumento de cerca de 30% em eficiência quando suplementado (1:1 – FPU/g_{substrato}:FPU/g_{substrato}) com enzimas produzidas pelo fungo *T. harzianum*;
- 4 Níveis adequados de β-glucosidase e xilanase são essenciais para alta eficiência de coquetéis enzimáticos na degradação de celulignina;
- 4 A cristalinidade do bagaço aumentou com o aumento do grau de deslignificação;
- **4** A cristalinidade do bagaço não está relacionada à redução do rendimento de hidrólise;
- A concentração de NaOH no pré-tratamento alcalino pode ser reduzida para 1%, sem perda significativa no rendimento de hidrólise;
- A adição de BSA ao bagaço, nas condições apresentadas nesse trabalho, não apresentou efeito significativo no rendimento de hidrólise enzimática;
- A proteína CBHI de *T. harzianum* apresenta atividade específica de 1, 25 U/mg e pH e temperatura ótimos de 5 e 50°C;
- Proteólise parcial com papaína separou os dois domínios da enzima CBHI;
- Estudos estruturais de SAXS indicaram que tanto a proteína inteira quanto o domínio catalítico são monoméricos em solução;

- Estudos de SAXS indicaram que a proteína inteira e seu domínio catalítico apresentam D_{max} de 110.00 ± 0.50 e 60.00 ± 0.50 e Rg de 27.56 ±0.50 e 20.08 ± 0.050, respectivamente;
- A proteína CBHI apresenta seu linker de forma bastante estendida, porém flexível, podendo assumir diversar conformações;
- A região peptídica ligadora da CBHI ocupa um espaço na fibra de celulose correspondente a 6 ligações glicosídicas de mesma orientação, ou seja, permite ao domínio catalítico clivar 5 ou 6 unidades de celobiose dependendo da sua conformação;
- A proteína swolenina foi expressa em baixa concentração em *P. pastoris* e não foi expressa em *A. niger* nas condições testadas;
- Seis proteínas foram expressas em A. niger: CBHI e seu domínio catalítico, EGLI e seu domínio catalítico e CBHII (de T. harzianum) e EGLII (de T. reesei), em quantidades suficientes para estudos de caracterização;
- As proteínas CBHII, EGLII e catalítico da EGLI já tiveram seus protocolos de purificação estabelecidos por cromatografia de afinidade e de exclusão molecular;
- O domínio catalítico da EGLI possui massa molecular de 43 kDa, atividade específica de 15,9 U/mg contra CMC 1% e temperatura e pH ótimos de 50°C e 2 a 3, respectivamente;
- O domínio catalítico da EGLI demonstrou-se bastante estável e com 120 horas de incubação a 50°C, pH 3 ainda mantinha a mesma atividade de início;
- O domínio catalítico da EGLI se comportou como monomérico em coluna de gel filtração e dimérica em experimento de gel não desnaturante;

- 4 A enzima catEGLI demonstrou ser capaz de quebrar ligações β(1-4) entre resíduos de glucoses dos substratos xiloglucano, β-glucano, liquenano e CMC;
- ♣ A enzima catEGLI não é capaz de liberar glucose dos substratos de celulose;
- A enzima é mais estável em pHs mais baixos Tm de 61°C em pH 2 contra 42,2°C em pH 5 (ensaio de termal shift).

REFERÊNCIAS*

1 HOOD, E. E. et al. Subcellular targeting is a key condition for high-level accumulation of cellulase protein in transgenic maize seed. **Plant Biotechnology Journal,** v. 5, n. 6, p. 709-719, Nov 2007.

2 OTERO, J. M.; PANAGIOTOU, G.; OLSSON, L. Fueling industrial biotechnology growth with bioethanol. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, v. 108, p. 1-40, 2007. DOI: 10.1007/10_2007_071.

3 MABEE, W. E.; MCFARLANE, P. N.; SADDLER, J. N. Biomass availability for lignocellulosic ethanol production. **Biomass & Bioenergy**, v. 35, n. 11, p. 4519-4529, 2011.

4 DOHERTY, W. et al. Studies on polymers and composites from lignin and fiber derived from sugar cane. **Polymers for Advanced Technologies,** v. 18, n. 8, p. 673-678, 2007.

5 KUMAR, L. et al. The lignin present in steam pretreated softwood binds enzymes and limits cellulose accessibility. **Bioresource Technology**, v. 103, n. 1, p. 201-208, 2012.

6 FERREIRA FILHO, E. X. et al. Xylan-degrading enzyme production by solid-state cultures of aerobic fungi. **Revista De Microbiologia**, v. 28, p. 22-28, 1997 1997.

7 COUGHLAN, M. P.; HAZLEWOOD, G. P. Beta-1,4-d-xylan-degrading enzyme-systems - biochemistry, molecular-biology and applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 17, pt. 3, p. 259-289, Jun 1993.

8 SUN, Y.; CHENG, J. Y. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.

9 COCINERO, E. J. et al. The Building Blocks of Cellulose: The Intrinsic Conformational Structures of Cellobiose, Its Epimer, Lactose, and Their Singly Hydrated Complexes. **Journal of the American Chemical Society,** v. 131, n. 31, p. 11117-11123, 2009.

10 BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances,** v. 15, n. 3-4, p. 583-620, 1997.

11 HIMMEL, M. E. et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 804-807, 2007.

12 GRAY, K. A. Cellulosic ethanol - state of the technology. **International Sugar Journal,** v. 109, n. 1299, p. 145-+, 2007.

13 KIM, S.; DALE, B. E. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. **Biomass & Bioenergy,** v. 26, n. 4, p. 361-375, 2004.

14 HSU, T.; NGUYEN, Q. Analysis of solids resulted from dilute-acid pretreatment of lignocellulosic biomass. **Biotechnology Techniques,** v. 9, n. 1, p. 25-28, 1995.

15 LAVARACK, B. P. et al. A preliminary assessment of aqueous ethanol pulping of bagasse: the ecopulp process. **International Sugar Journal,** v. 107, n. 1283, p. 611-615, 2005.

16 MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology,** v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.

17 HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, v. 89, n. 1, p. 17-34, 2003.

18 PSZCZOLA, D. E. From soybeans to spaghetti: The broadening use of enzymes. Food Technology, v. 55, n. 11, p. 54-+, 2001.

19 VAN BEILEN, J. B.; LI, Z. Enzyme technology: an overview. Current Opinion in Biotechnology, v. 13, n. 4, p. 338-344, 2002.

20 SALOHEIMO, M. et al. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 17, p. 4202-4211, 2002.

21 REESE, E. T.; SIU, R. G. H.; LEVINSON, H. S. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. **Journal of Bacteriology**, v. 59, n. 4, p. 485-497, 1950.

22 HENRISSAT, B. A Classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid-sequence similarities. **Biochemical Journal,** v. 280, p. 309-316, 1991.

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

24 TEERI, T. T. et al. Hydrolysis of crystalline cellulose by native and engineered *Trichoderma reesei* cellulases. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society,** v. 207, p. 21-AGFD, 1994.

25 TUKA, K.; ZVERLOV, V. V.; VELIKODVORSKAYA, G. A. Synergism between *Clostridium thermocellum* cellulases cloned in *Escherichia coli*. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 37, n. 2, p. 201-207, 1992.

26 WALKER, L. P. et al. Fragmentation of cellulose by the major *Thermomonospora fusca* cellulases, *Trichoderma reesei* CBHI, and their mixtures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, n. 9, p. 1019-1026, 1992.

27 DIN, N. et al. The cellulose-binding domain of endoglucanase-a (cena) from *Cellulomonas fimi* - evidence for the involvement of tryptophan residues in binding. **Molecular Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 747-755, 1994.

28 BARR, B. K. et al. Identification of two functionally different classes of exocellulases. **Biochemistry**, v. 35, n. 2, p. 586-592, 1996.

29 RYU, D. et al. Studies on quantitative physiology of *Trichoderma reesei* with 2-stage continuous culture for cellulase production. **Biotechnology and Bioengineering,** v. 21, n. 11, p. 1887-1903, 1979.

30 ROJAS REJON, O. A. et al. Saccharification of cellulosic biomass: Regulation of cellulase and xylanase activities under catabolic repression conditions. **Journal of Biotechnology,** v. 131, n. 2, p. S28-S28, 2007.

31 VANTILBEURGH, H. et al. Limited proteolysis of the cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei* - separation of functional domains. **Febs Letters,** v. 204, n. 2, p. 223-227, 1986.

32 SRISODSUK, M. et al. Role of the interdomain linker peptide of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase-I in its interaction with crystalline cellulose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 28, p. 20756-20761, 1993.

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

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

35 COSGROVE, D. J. Loosening of plant cell walls by expansins. Nature, v. 407, n. 6802, p. 321-326, 2000.

36 SHIEH, M. W.; COSGROVE, D. J. Expansins. Journal of Plant Research, v. 111, n. 1101, p. 149-157, 1998.

37 SAMPEDRO, J.; COSGROVE, D. J. The expansin superfamily. **Genome Biology,** v. 6, n. 12, p. 242-, 2005.

38 LAINE, M. J. et al. The cellulase encoded by the native plasmid of *Clavibacter michiganensis* ssp sepedonicus plays a role in virulence and contains an expansin-like domain. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 57, n. 5, p. 221-233, 2000.

39 LEVASSEUR, A. et al. Production of a chimeric enzyme tool associating the *Trichoderma reesei* swollenin with the *Aspergillus niger* feruloyl esterase a for release of ferulic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v. 73, n. 4, p. 872-880, 2006.

40 YUAN, S.; WU, Y. J.; COSGROVE, D. J. A fungal endoglucanase with plant cell wall extension activity. **Plant Physiology,** v. 127, n. 1, p. 324-333, 2001.

41 YAO, Q. et al. Gene cloning and heterologous expression of a novel endoglucanase, swollenin, from *Trichoderma pseudokoningii* S38. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 72, n. 11, p. 2799-2805, 2008.

42 BROTMAN, Y. et al. Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. **Plant Physiology**, v. 147, n. 2, p. 779-789, 2008.

43 VERBEKE, J. et al. Transcriptional profiling of cellulase and expansin-related genes in a hypercellulolytic *Trichoderma reesei*. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 9, p. 1399-1405, 2009.

44 WANG, M. H. et al. High-level expression and efficient purification of bioactive swollenin in *Aspergillus oryzae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology,** v. 162, n. 7, p. 2027-2036, 2010.

45 CONESA, A. et al. The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view. **Fungal Genetics and Biology,** v. 33, n. 3, p. 155-171, 2001.

46 IDIRIS, A. et al. Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v. 86, n. 2, p. 403-417, 2010.

47 CULLEN, D. et al. Controlled expression and secretion of bovine chymosin in *Aspergillus nidulans*. **Bio-Technology**, v. 5, n. 4, p. 369-376, 1987.

48 OHNO, A. et al. A carrier fusion significantly induces unfolded protein response in heterologous protein production by *Aspergillus oryzae*. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 92, n. 6, p. 1197-1206, 2011.

49 GORDON, C. L. et al. A glucoamylase: GFP gene fusion to study protein secretion by individual hyphae of *Aspergillus niger*. Journal of Microbiological Methods, v. 42, n. 1, p. 39-48, 2000.

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

51PUNT, P. J. et al. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. **Trends in Biotechnology,** v. 20, n. 5, p. 200-206, 2002.

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

53 HUI, J. P. M.; WHITE, T. C.; THIBAULT, 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, 2002.

54 SOMERA, A. F. et al. Effect of glycosylation on the biochemical properties of betaxylosidases from *Aspergillus versicolor*. Journal of Microbiology, v. 47, n. 3, p. 270-276, 2009. 55 HARRISON, M. J. et al. Modified glycosylation of cellobiohydrolase I from a high cellulaseproducing mutant strain of *Trichoderma reesei*. **European Journal of Biochemistry**, v. 256, n. 1, p. 119-127, 1998.

56 DEMAIN, A. L.; NEWCOMB, M.; WU, J. H. D. Cellulase, clostridia, and ethanol. **Microbiology and Molecular Biology Reviews,** v. 69, n. 1, p. 124-+, 2005.

57 MARTINEZ, D. et al. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). **Nature Biotechnology,** v. 26, n. 5, p. 553-560, 2008.

58 ULKER, A.; SPREY, B. Characterization of an unglycosylated low-molecular-weight 1,4beta-glucan-glucanohydrolase of *Trichoderma reesei*. Fems Microbiology Letters, v. 69, n. 3, p. 215-220, 1990.

59 NIDETZKY, B. et al. Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei* - a new model for synergistic interaction. **Biochemical Journal**, v. 298, p. 705-710, 1994.

60 HARMAN, G. E. Overview of new insights into mechanisms and uses of *Trichoderma* based products. **Phytopathology**, v. 94, n. 6, p. S138-S138, 2004.

61 CHAVERRI, P. et al. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex. **Molecular Phylogenetics and Evolution,** v. 27, n. 2, p. 302-313, 2003.

62 GRONDONA, I. et al. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborn fungal plant pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 8, p. 3189-3198, 1997.

63 SCHAFFNER, D. W.; TOLEDO, R. T. Cellulase production by *Trichoderma reesei* when cultured on xylose-based media supplemented with sorbose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, n. 1, p. 12-16, 1991.

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

65 HERZOG, R. W. et al. A comparative study on the transformation of *Aspergillus nidulans* by microprojectile bombardment of conidia and a more conventional procedure using protoplasts treated with polyethyleneglycol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, n. 3, p. 333-337, 1996.

66 WARD, M.; KODAMA, K. H.; WILSON, L. J. Transformation of *Aspergillus awamori* and a-niger by electroporation. **Experimental Mycology**, v. 13, n. 3, p. 289-293, 1989.

67 GOUKA, R. J. et al. Transformation of *Aspergillus awamori* by *Agrobacterium tumefaciens*mediated homologous recombination. **Nature Biotechnology**, v. 17, n. 6, p. 598-601, 1999.

68 BALLANCE, D. J.; BUXTON, F. P.; TURNER, G. Transformation of *Aspergillus nidulans* by the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa*. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 112, n. 1, p. 284-289, 1983.

69 TILBURN, J. et al. Transformation by integration in *Aspergillus-nidulans*. **Gene**, v. 26, n. 2-3, p. 205-221, 1983.

70 _____. Transformation in *Aspergillus-nidulans*. Heredity, v. 51, p. 519-519, 1983.

71 ALEKSENKO, A.; CLUTTERBUCK, A. J. Autonomous plasmid replication in *Aspergillus nidulans*: AMA1 and MATE elements. **Fungal Genetics and Biology,** v. 21, n. 3, p. 373-387, 1997.

72 YELTON, M. M.; HAMER, J. E.; TIMBERLAKE, W. E. Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a trpc plasmid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences,** v. 81, n. 5, p. 1470-1474, 1984.

73 TIMBERLAKE, W. E.; MARSHALL, M. A. Genetic-engineering of filamentous fungi. Science, v. 244, n. 4910, p. 1313-1317, 1989.

74 FOWLER, T.; BROWN, R. D. The bgl1 gene encoding extracellular beta-glucosidase from *Trichoderma-reesei* is required for rapid induction of the cellulase complex. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 21, p. 3225-3235, 1992.

75 FINCHAM, J. Genetics of filamentous fungi. Nature, v. 323, n. 6091, p. 757-758, 1986.

76 BRYGOO, Y.; DEBUCHY, R. Transformation by integration in podospora-anserina .1. methodology and phenomenology. **Molecular & General Genetics,** v. 200, n. 1, p. 128-131, 1985.

77 FINCHAM, J. R. S. Transformation in fungi. Microbiological Reviews, v. 53, n. 1, p. 148-170, 1989.

78 KELLY, J. M.; HYNES, M. J. Transformation of *Aspergillus-niger* by the amds gene of *Aspergillus nidulans*. **Embo Journal**, v. 4, n. 2, p. 475-479, 1985 1985.

79 WORTMAN, J. R. et al. The 2008 update of the *Aspergillus nidulans* genome annotation: a community effort. **Fungal Genetics and Biology,** v. 46, p. S2-S13, 2009.

80 PEL, H. J. et al. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. **Nature Biotechnology,** v. 25, n. 2, p. 221-231, 2007.

81 MACHIDA, M. et al. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. Nature, v. 438, n. 7071, p. 1157-1161, 2005.

82 DENNING, D. W. et al. Sequencing the *Aspergillus fumigatus* genome. Lancet Infectious Diseases, v. 2, n. 4, p. 251-253, 2002.

83 NIERMAN, W. C. et al. What the *Aspergillus* genomes have told us. **Medical Mycology**, v. 43, p. S3-S5, 2005.

84 GILSENAN, J. E. M. et al. *Aspergillus* Genomes and the *Aspergillus* Cloud. Nucleic Acids Research, v. 37, p. D509-D514, 2009.

85 MANDELS, M.; WEBER, J. Production of cellulases. Advances in Chemistry Series, n. 95, p. 391-&, 1969.

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

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

88 VASQUEZ, M. P. et al. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137, p. 141-153, 2007.

89 VERVERIS, C. et al. Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. **Bioresource Technology,** v. 98, n. 2, p. 296-301, 2007.

90 DRIEMEIER, C.; CALLIGARIS, G. A. Theoretical and experimental developments for accurate determination of crystallinity of cellulose I materials. Journal of Applied Crystallography, v. 44, p. 184-192, 2011.

91 RIETVELD, H. M. A Profile refinement method for nuclear and magnetic structures. Journal of Applied Crystallography, v. 2, p. 65-&, 1969.

92 LUTTEROTTI, L. et al. Combined texture and structure analysis of deformed limestone from time-of-flight neutron diffraction spectra. **Journal of Applied Physics,** v. 81, n. 2, p. 594-600, 1997.

93 NISHIYAMA, Y.; LANGAN, P.; CHANZY, H. Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose 1 beta from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. Journal of the American Chemical Society, v. 124, n. 31, p. 9074-9082, 2002.

94 YANG, B.; WYMAN, C. E. BSA treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin containing substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 94, n. 4, p. 611-617, 2006.

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

96 BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

97 APARICIO, R. et al. Structural insights into the beta-mannosidase from T-reesei obtained by synchrotron small-angle X-ray solution scattering enhanced by X-ray crystallography. **Biochemistry**, v. 41, n. 30, p. 9370-9375, 2002.

98 FISCHER, H. et al. Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale. Journal of Applied Crystallography, v. 43, p. 101-109, 2010.

99 ROJAS, A. L. et al. Structural insights into the beta-xylosidase from Trichoderma reesei obtained by synchrotron small-angle X-ray scattering and circular dichroism spectroscopy. **Biochemistry**, v. 44, n. 47, p. 15578-15584, 2005.

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

101 _____. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing (vol 76, pg 2879, 1999). **Biophysical Journal,** v. 77, n. 5, p. 2896-2896, 1999.

102 SVERGUN, D.; BARBERATO, C.; KOCH, M. H. J. CRYSOL - a program to evaluate x-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. **Journal of Applied Crystallography**, v. 28, p. 768-773, 1995.

103 ARNOLD, K. et al. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics,** v. 22, n. 2, p. 195-201, 2006.

104 BORDOLI, L. et al. Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. **Nature Protocols,** v. 4, n. 1, p. 1-13, 2009.

105 KONAREV, P. V.; PETOUKHOV, 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.

106 SVERGUN, D. I.; PETOUKHOV, M. V.; KOCH, M. H. J. Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering. **Biophysical Journal**, v. 80, n. 6, p. 2946-2953, 2001.

107 DELANO, W. L. PyMOL molecular viewer: updates and refinements. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, v. 238, 2009.

108 MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: a conserved domain database for the functional annotation of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. D225-D229, 2011.

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

110 LANDY, A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda-site-specific recombination. **Annual Review of Biochemistry**, v. 58, p. 913-949, 1989.

111 HARTLEY, J. L.; TEMPLE, G. F.; BRASCH, M. A. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. **Genome Research,** v. 10, n. 11, p. 1788-1795, 2000.

112 BUSHMAN, W. et al. Control of directionality in lambda-site specific recombination. **Science,** v. 230, n. 4728, p. 906-911, 1985.

113ASLANIDIS, C.; DEJONG, P. J. Ligation-independent cloning of pcr products (LIC-PCR). Nucleic Acids Research, v. 18, n. 20, p. 6069-6074, 1990.

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

115 SCHMUCK, M. et al. Investigation of cellobiohydrolase from *Trichoderma reesei* by smallangle x-ray-scattering. **Biotechnology Letters,** v. 8, n. 6, p. 397-402, 1986.

116 ABUJA, P. M. et al. Structure-function relationship of the 2 cellobiohydrolases CBHI and CBHII of the cellulolytic system of *Trichoderma-reesei*. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, v. 369, n. 9, p. 789-789, 1988.

117 _____. Domain-structure of cellobiohydrolase-II as studied by small-angle x-ray-scattering - close resemblance to cellobiohydrolase-I. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 156, n. 1, p. 180-185, 1988.

118 DIVNE, C. et al. The 3-dimensional crystal-structure of the catalytic core of cellobiohydrolase-i from *Trichoderma reesei*. Science, v. 265, n. 5171, p. 524-528, 1994.

119 KRAULIS, P. J. et al. Determination of the 3-dimensional solution 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.

120 THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal-W - improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

121 GOUET, P. et al. ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. **Bioinformatics**, v. 15, n. 4, p. 305-308, 1999.

122 REYES, J.; PERALTA-ZAMORA, P.; DURAN, N. Enzymatic hydrolysis of rice hull using cellulases. Effect of chemical and photochemical treatments. **Quimica Nova,** v. 21, n. 2, p. 140-143, 1998.

123 ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 797-824, 2004.

124HALL, M. et al. Cellulose crystallinity - a key predictor of the enzymatic hydrolysis rate. **Febs Journal**, v. 277, n. 6, p. 1571-1582, 2010.

125 GUSAKOV, A. V.; SINITSYN, A. P. A Theoretical-analysis of cellulase product inhibition - effect of cellulase binding constant, enzyme substrate ratio, and beta-glucosidase activity on the inhibition pattern. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, n. 6, p. 663-671, 1992.

126 SINITSYN, A. P.; GUSAKOV, A. V.; VLASENKO, E. Y. Effect of structural and physicochemical features of cellulosic substrates on the efficiency of enzymatic-hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 43-59, 1991.

127 MARTINS, L. F. et al. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 5, p. 1417-1424, 2008.

128 JORGENSEN, H.; OLSSON, L. Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888 - Effect of substrate on hydrolytic performance. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 3-4, p. 381-390, 2006.

129 QING, Q.; YANG, B.; WYMAN, C. E. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 24, p. 9624-9630, 2010.

130 MERINO, S. T.; CHERRY, J. Progress and challenges in enzyme development for Biomass utilization. **Biofuels**, v. 108, p. 95-120, 2007.

131 JAEGER, G. et al. Practical screening of purified cellobiohydrolases and endoglucanases with alpha-cellulose and specification of hydrodynamics. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, 2010.

132 KOBATA, A. Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. European Journal of Biochemistry, v. 209, n. 2, p. 483-501, 1992.

133 VON OSSOWSKI, I. et al. Protein disorder: conformational distribution of the flexible linker in a chimeric double cellulase. **Biophysical Journal**, v. 88, n. 4, p. 2823-2832, 2005.

134 VIOLOT, S. et al. Structure of a full length psychrophilic cellulase from *Pseudoalteromonas haloplanktis* revealed by X-ray diffraction and small angle X-ray scattering. **Journal of Molecular Biology,** v. 348, p. 1211-1224, 2005.

135 IGARASHI, K. et al. High speed atomic force microscopy visualizes processive movement of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I on crystalline cellulose. Journal of Biological Chemistry, v. 284, n. 52, p. 36186-36190, 2009.

136 LINDER, M.; TEERI, T. T. The roles and function of cellulose-binding domains. **Journal of Biotechnology,** v. 57, n. 1-3, p. 15-28, 1997.

137 ABUJA, P. M. et al. Structural and functional domains of cellobiohydrolase-I from *Trichoderma reesei* - a small-angle x-ray-scattering study of the intact enzyme and its core. **European Biophysics Journal with Biophysics Letters,** v. 15, n. 6, p. 339-342, 1988.

138 NAKAZAWA, H. et al. Characterization of the catalytic domains of *Trichoderma reesei* endoglucanase I, II, and III, expressed in Escherichia coli. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 81, n. 4, p. 681-689, 2008.

139 FARINAS, C. S. et al. Finding stable cellulase and xylanase evaluation of the synergistic effect of pH and temperature. **New Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 810-815, 2010.

140 COCKBURN, D. W.; CLARKE, A. J. Modulating the pH-activity profile of cellulase A from *Cellulomonas fimi* by replacement of surface residues. **Protein Engineering Design & Selection,** v. 24, n. 5, p. 429-437, 2011.

* De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 6023.