UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

GABRIELA LEILA BERTO

Clonagem, expressão e purificação de glicosil hidrolases (GH5 e GH45)
provenientes do fungo *Gloeophyllum trabeum* e estudo da ação das proteínas
como auxiliares na hidrólise de polissacarídeos

Lorena
2015

GABRIELA LEILA BERTO

Clonagem, expressão e purificação de glicosil hidrolases (GH5 e GH45)
provenientes do fungo *Gloeophyllum trabeum* e estudo da ação das proteínas
como auxiliares na hidrólise de polissacarídeos

Dissertação apresentada à Escola de
Engenharia de Lorena da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia
Industrial na área de conversão de
biomassa

Orientador: Prof. Dr. André Luís Ferraz

Versão Original

Lorena
2015

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

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Berto, Gabriela Leila
Clonagem, expressão e purificação de glicosil
hidrolases (GH5 e GH45) provenientes do fungo
Gloeophyllum trabeum e estudo da ação das proteínas
como auxiliares na hidrólise de polissacarídeos /
Gabriela Leila Berto; orientador André Luis Ferraz -
Versão Original. - Lorena, 2015.
100 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de
Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo. 2015
Orientador: André Luis Ferraz

1. Gh45. 2. Podridão parda. 3. Subfamília c. 4.
Endoglucanase. I. Título. II. Ferraz, André Luis,
orient.

*Dedico este trabalho ao meu avô,
que sempre estará me protegendo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador André Ferraz, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e pelos valiosos ensinamentos científicos e éticos. Obrigada por sua paciência, apoio e pela amizade. Ter tido a oportunidade de ser orientada por você me tornou uma profissional mais crítica.

Agradeço ao meu “co-orientador” (e marido) pelo companheirismo e disponibilidade em sempre me ajudar. Obrigada pelos momentos de discussões, pelos conhecimentos passados, por exigir sempre mais e principalmente por trazer alegria no meu dia a dia. Obrigada por cuidar de mim.

Agradeço meus amigos do Laboratório de Ciências da Madeira, ou Laboratório de Ciências Moleculares. Fefa, Angéla, Thales, Omar, Rafa e Gui, obrigada pelos momentos de descontração, pelas conversas sempre produtivas e por aguentar de maneira digna meu mau-humor.

Agradeço aos amigos do do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica I pela amizade e pelo apoio material. Vocês todos foram fundamentais nessa etapa. Obrigada também aos meus amigos Laboratório de Biologia Sintética e Molecular, vocês fizeram parte dessa história e espero continuar fazendo parte da história de vocês.

Um super obrigada aos técnicos e meus amigos Zé Carlos e Zé Moreira. Sem vocês não haveria tanta amizade envolvida em uma dissertação de mestrado. Vocês são fundamentais nos projetos de todos os alunos. Sou muito grata à vocês.

Quero agradecer de forma especial minha família, que não é apenas uma família de pai, mãe e filha. É uma família onde mãe, avô, avó, tios, tias, primos e primas estão sempre juntos e realmente envolvidos e interessados nos meus projetos. Amo todos vocês. Obrigada mãe, pelos valores de vida e por todo amor que foi capaz de me dar!!!!

Agradeço aos meus amigos de infância, de colégio, de faculdade, da vida, que de uma forma ou de outra participaram da realização desse projeto de mestrado. Vocês são os irmãos que recebi ao longo da minha trajetória. Muito obrigada!!!!

Obrigada à todos os funcionários do Debiq e da EEL por todo suporte prestado aos alunos.

Agradeço às agências fomentadoras, CAPES e Fapesp pelo apoio financeiro

“A ciência compõe-se de erros, que por sua vez são passos em direção à verdade”

Júlio Verne

RESUMO

BERTO, G. L. **Clonagem, expressão e purificação de glicosil hidrolases (GH5 e GH45) provenientes do fungo *Gloeophyllum trabeum* e estudo da ação das proteínas como auxiliares na hidrólise de polissacarídeos.** 2015. 100p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena-SP, 2016.

Fungos de podridão branca e fungos de podridão parda são capazes de degradar a biomassa lignocelulósica utilizando diferentes mecanismos. Os fungos de podridão parda degradam a celulose e a hemicelulose enquanto modificam a lignina, sendo, portanto, as enzimas hidrolíticas ativas em substrato rico em lignina. O arsenal enzimático diferenciado desses fungos torna-os alvos para prospecção de enzimas que podem ser aplicadas em diversos processos biotecnológicos. O fungo *Gloeophyllum trabeum* é uma das espécies mais compreendidas deste grupo, e sabe-se que é capaz de degradar a celulose sem produzir CBHs. Além disso já foi reportado uma GH5 proveniente desse organismo com características processivas. Nossa tentativa de clonagem dessa enzima (GtGH5) em *A. nidulans* A773 não foi bem sucedida, todavia nosso grupo está repetindo os passos de clonagem e expressão. No genoma desse organismo está presente um gene que codifica uma GH45. A GtGH45 foi clonada e expressa com alto rendimento em *A. nidulans* cepa A773. A expressão, secreção e acumulação da GtGH45 foi positiva após 72 h de incubação em meio líquido (maltose como indutor), confirma por eletroforese SDS-PAGE do extrato enzimático concentrado e dialisado. A massa molar de 18,4 kDa foi consistente com a predição da sequência de 204 amino-ácidos obtida a partir da sequência gênica e corrobora com a caracterização por espectrometria de massas (18,9 kDa). A análise filogenética é consistente com estudos anteriores, agrupando a proteína alvo com outras GH45s de basidiomicetos na subfamília C. A enzima purificada foi testada para determinação da especificidade pelo substrato apresentando maior atividade em arabinoxilana, xilana, arabinoxilana e CMC e foi capaz de gero celo-oligômeros a partir da hidrólise de PASC. O pH ótimo em CMC foi 2,5, além de demonstrar ser termoestável em ensaio de Thermoflour. A hidrólise enzimática de substratos lignocelulósicos derivados de cana-de-açúcar mostrou que a GtGH45 foi eficiente para suplementar coquetéis enzimáticos comerciais, principalmente na conversão de xilana.

Palavras-chave: *GH45, Podridão parda, Subfamília C, Endoglucanase.*

ABSTRACT

BERTO, G. L. **Cloning, expression and purification of glicosil hydrolases (GH5 and GH45) from *Gloeophyllum trabeum* and the evaluation of these proteins in polysaccharides hidrolise.** 2015. 100p. Dissertation (Master os Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena-SP, 2016

White-rot and brown-rot basidiomycetes are able to transform lignocellulosic materials through different mechanisms. The brown-rot fungi are able to degrade cellulose and hemicellulose meanwhile modifies lignin. The hydrolytic enzymes of these fungi act on a lignin-enriched substrate, which makes them targets to prospect new enzymes for polysaccharides hydrolysis. *Gloeophyllum trabeum* is one of the best understood fungal species in this group. An interesting processive GH5-endoglucanase (EG) has been described in this species suggesting an unusual pathway for lignocellulosic degradation without cellobiohydrolases (CBH). Our first attempt to clone this GtGH5 was default but our grup is trying a new attempt of heterologous expression of this protein. Furthermore, *G. trabeum* genome points out for a low molar mass GH45-EG. Here we report on a recombinant high-yield *G. trabeum* ATCC 11539 GtGH45 production system. Expression and secretion of endoglucanase GtGH45 was positive after 72 h incubation of the transformed *A. nidulans* stain A773 in stationary liquid cultures (maltose as inductor). The SDS-PAGE electrophoresis of ultra-filtrated extract showed a single-band GtGH45 over expressed band. The molar mass of 18,4 KDa was consistent with the predicted 204 amino acids sequence derived from gene sequence analyses and corroborates with mass spectrometry characterization (18,9 KDa). Even more, the phylogenetic analyze is consistent to previews studies, clustering the target protein with others GH45 from basidiomycetes at subfamily C. The purified protein was assayed for substrate specificity showing activity against xylan, arabinoxylan and PASC. GtGH45 was able to produce cello-oligomers from PASC. The optimum pH was 2.5 with CMC as the substrate. Xylan conversion was enhanced when GtGH45 was mixed with commercial enzymes in enzymatic hydrolysis of alkaline-sulfite pretreated sugar cane bagasse.

Keywords: *GH45, Brown rot-decay, Subfamily C, Endoglucanase.*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABF	Tampão Acetato Borato Fosfato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BlastP	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (utilizando sequências de amino-ácidos)
BlastX	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (utilizando sequências de nucleotídeos)
CAZy	<i>Carbohydrate-Active Enzymes</i>
CBM	<i>Carbohydrate-binding module</i>
CDH	<i>Cellobiose dehydrogenase</i>
cDNA	DNA complementar
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
CMC	Carboximetil Celulose
dNTP	Deoxi ribonucleotídeo trifosfato
dATP	Deoxi adenosina trifosfato
dTTP	Deoxi timina trifosfato
EC	<i>Enzyme Commission</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
g	Grama
HEC	Hidroximetil Celulose
°C	Graus centígrados
ID	<i>Identification number</i>
Kb	Kilobases
Kg	Kilograma
kDa	Kilodaltons
L	Litro
UV	Luz ultravioleta
Mpa	Megapascal
MM	Meio mínimo
μL	Microlitro

µm	Micrômetro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
PASC	<i>Phosphoric acid swollen cellulose</i>
Pb	Pares de base
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pmol	Picomol
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PES	Polieter Sulfona
1G	Primeira geração
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	Rotações por minuto
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
TAE	<i>Tris-acetate-EDTA</i>
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: (A) Ilustração da oscilação do preço do petróleo ao longo dos últimos anos e projeções de preços futuros até 2040; (B) Consumo diário de barris de petróleo em várias regiões do mundo. 25
- Figura 2: Estrutura de uma cadeia de celulose. 28
- Figura 3: Desconstrução da celulose por celulasas e enzimas oxidativas. As endoglucanases (EG) clivam as ligações glicosídicas na região amorfa. As extremidades redutoras e não redutoras são hidrolisadas processivamente pelas celobiohidrolases (CBH I e II, respectivamente), estando ligadas ou não aos domínios de ligação ao carboidrato (CBM). A ação das CBHs tem como produto principal a celobiose, a qual é hidrolisada em duas unidades de glicose pelas β -glicosidases. Proteínas com atividade auxiliar da família AA9 também participam da desconstrução da celulose por um mecanismo oxidativo, formando novos terminais para o ataque das CBHs. As SWOs podem destruturar a porção cristalina da celulose. As celobiodesidrogenases (CDH) participam como doadores de elétrons para as AA9 e também podem atuar oxidando as celobioses. 32
- Figura 4: Mecanismo proposto para redução do Fe^{+3} à Fe^{+2} e produção de H_2O_2 pelo fungo *Gloeophyllum trabeum* por meio da oxidação de quinonas e o mecanismo simplificado da degradação dos componentes da parede celular vegetal via reação de Fenton. 35
- Figura 5: Modelo de mecanismo de reação proposto para a *PcCel45A* por meio de múltiplas transferência de prótons entre amino-ácidos adjacentes aos amino-ácidos catalíticos. 40
- Figura 8: Vetor *pEXPYR* para clonagem em *A. nidulans*. 49
- Figura 9: Esquematisação das etapas de amplificação e clonagem envolvendo o sistema LIC. (A) amplificação do vetor de clonagem *pEXPYR* ocorre a partir do *gap* que será ocupado pelo gene de interesse, iniciando na região do peptídeo sinal (*reverse*) e no terminador do Triptofano (*forward*), sendo que a região do *poly-linker* não foi amplificada; (B) no vetor e no gene de interesse amplificados foram inseridas as caudas do sistema LIC; (C) tanto o vetor como o gene de interesse foram tratados com a enzima T4 DNA polimerase, que pela sua ação de exo polimerase remove os nucleotídeos no sentido 3'-5', criando extremidades *overhanging*, em reação na presença de dTTP para o gene e dATP para o vetor; (D) os *overhangings* serão complementares e assim ocorre a ligação biológica entre o vetor e a o gene de interesse, sem a necessidade da enzima ligase. 51
- Figura 10: Sequência completa de amino-ácidos da P84194 (GtGH5) e EPQ56593 (GtGH45), sendo que os fragmento em azul correspondem ao peptídeo sinal e os fragmentos em negrito da GtGH5 apresentam homologia com os peptídeos descritos por Cohen et al. (2005). Os amino-ácidos em vermelho foram corrigidos dos fragmentos iniciais. 63
- Figura 11: Resultados da análise das sequências de amino-ácidos (A) GtGH5 e (B) GtGH45 pelo servidor SignalP 4.1, ilustrando as predições *in silico* das regiões do peptídeo sinal. 64
- Figura 12: Eletroforese em gel de agarose (A) confirmando o produto de extração do DNAg de *G. trabeum* e (B) mostrando produtos de PCR das sequências de interesse. (1) GtGH5 com 1450 pb e (2) GtGH45 com 600 pb amplificados a partir do DNAg. (M) marcador de pares de base nos dois géis (1kb ladder). 64

Figura 13: Eletroforese em gel de agarose apresentando os resultados dos PCRs de colônia para confirmação das cepas bacterianas positivas para a presença do material genético de interesse P84194 (GH5) e EPQ56593.1 (GtGH45), onde cada poço de aplicação do gel corresponde à uma colônia bacteriana 65

Figura 14: Diagrama esquematizando as glicosilações putativas das proteínas GtGH45e GtGH5. (A) Potenciais sítios de glicosilação da GtGH45, estando ausentes glicosilações do tipo N e havendo 4 sítios para glicosilação do tipo –O; (B) idem A, porém estimado para a proteína GtGH5, sendo que o servidor NetOGlyc apontou 6 sítios potenciais para glicosilação e o servidor NetNGlyc apontou 3 regiões. 66

Figura 15: Eletroforese em SDS-PAGE mostrando o as proteínas expressas pela cepa original de *A. nidulans* com o vetor de clonagem vazio e uma das cepas recombinantes que superexpressou a GtGH45. (M) Marcadores de massa molar; (A773) cepa de *A. nidulans* com o vetor de clonagem vazio e (GH45) cepa recombinante de *A. nidulans*. 67

Figura 16: (A) Eletroforese em SDS-PAGE mostrando o perfil das proteínas extracelulares de diferentes clones de *A. nidulans* transformados para secretar GtGH45 e GtGH5. (MW) Marcadores de massa molar; (Números nos canais) Diferentes clones obtidos; (A773) cepa de *A. nidulans* com o vetor de clonagem vazio. (B) Ensaio enzimático dos extratos de cultivo agindo sobre CMC e posteriormente corado com vermelho congo. (GtGH45 e GtGH5) indicam a proteína de interesse clonada; (Números) Diferentes clones obtidos. 68

Figura 17: Indicação do procedimento de identificação da proteína GtGH45. (A) A banda mais intensa detectada por eletroforese na região de 18-19 kDa foi removida do gel e digerida com quimotripsina. (B) Os polipeptídeos gerados foram analisados por MALDI-TOF e identificados (fragmentos marcados em vermelho) por comparação com a sequência depositada no GenBank. 70

Figura 18: Árvore filogenética de proteínas GH45. Estão apresentados os números de acesso das proteínas em bancos de dados públicos e também a identificação das espécies produtoras das enzimas, sendo que as 3 primeiras letras indicam o gênero e as 5 letras seguintes indicam a espécie. As cores mostram as divisões das subfamílias desse grupo de GHs e a seta indica a posição da proteína GtGH45 na árvore. 71

Figura 19: Alinhamento das sequências de amino-ácidos dos representantes das subfamílias A, B e C de GH45, SWO e expansina. Os organismos e os números de acesso das proteínas em bancos de dados estão padronizados. Depois do número de acesso esta a especificação à qual grupo a proteína pertence. Para *P. chrysosporium* foram anotados os amino-ácidos catalíticos (estrela vermelha) e os resíduos adjacentes, apontados como fundamentais para a atividade catalítica da GH45 em um estudo apresentado por Nakamura et al. (2015) que denominaram estes amino-ácidos de "Newton Cradle" numa alusão ao "caminho do próton" durante a hidrólise (marcações rosas) (ver também figura 5, página 40). 72

Figura 20: Desenvolvimento de *A. nidulans* com o inserto para expressão da GtGH45 nas diferentes condições de cultivo (tempo e concentração de maltose). Em amarelo estão as concentrações iniciais de maltose. 73

Figura 21: Relação da secreção da proteína com variação do tempo de incubação e da concentração de maltose. (A) extratos enzimáticos concentrados dos cultivos, aplicando 10 µg de proteínas totais em SDS-PAGE 15%; (B) proteínas totais (µg/µL) acumuladas no meio extracelular. 74

Figura 22: (A) Variação do pH dos meios de cultivo; (B) atividade de proteases no meio extracelular. 74

Figura 23: Perfil do esgotamento do açúcar disponível no meio extracelular com o decorrer do cultivo de *A. nidulans* recombinante para secretar GtGH45. 75

Figura 24: (A) Cromatograma da purificação da GtGH45 em coluna de troca aniônica; (B) gráfico das atividades relativas das frações coletadas e (C) eletroforese em SDS-PAGE das frações coletadas. Os números anotados nos picos cromatográficos correspondem aos números indicados na eletroforese. Cada fração coletada corresponde a 1 ml. 76

Figura 25: (A) Cromatograma em gel Superdex 75 da fração contendo a proteína GtGH45 prépurificada por troca iônica; (B) Eletroforese em gel SDS-PAGE das frações coletadas. 77

Figura 26: Temperatura de desenovelamento da GtGH45 em diferentes pHs e condições tamponantes. Os dados foram obtidos a partir da técnica *Thermofluor* que detecta a proteína na forma desenovelada com o auxílio de uma sonda fluorescente. 79

Figura 29: TLC dos produtos gerados na hidrólise de PASC catalisada por GtGH45. Marcadores de celo-oligossacarídeos com DP 1 à 6 (M); sobrenadantes da reação com GtGH45 após 1 min (1), 60 min (2) e 120 min (3) de reação; Controles sem a presença de GtGH45 após 1 min (4), 60 min (5) e 120 min (6) de incubação; Solução controle contendo GtGH45 (E). 81

Figura 28: Efeito do pH na atividade enzimática em CMC da GtGH45 em termos de atividade relativa. A linha tracejada mostra a tendência de atividade influenciada pelo pH 82

Figura 30: Gráficos com as porcentagens conversão dos polissacarídeos da hidrólise do bagaço de cana pré tratado com sulfito alcalino. (A) conversão de celulose com carga completa de enzimas comerciais; (B) conversão de xilana com carga completa de enzimas comerciais; (C) conversão de celulose com carga reduzida de enzimas comerciais e (D) conversão de xilana com carga reduzida de enzimas comerciais. suplementada com GtGH45; suplementada com BSA e somente com as enzimas comerciais. 83

Figura 31: gráficos com as porcentagens conversão de celulose de polissacarídeos resultantes da hidrólise da medula de cana. (A) conversão de celulose com carga completa de enzimas comerciais; (B) conversão de xilana com carga completa de enzimas comerciais; (C) conversão de celulose com carga reduzida de enzimas comerciais e (D) conversão de xilana com carga reduzida de enzimas comerciais. suplementada com GtGH45; suplementada com BSA e somente com as enzimas comerciais. 84

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Porcentagem de conversão à açúcar redutor de três substratos celulósicos diferentes por endoglucanases após 24h de reação à 50°C. O meio reacional continha tampão acetato de sódio pH 5,5 e 25 mg de proteína purificada por litro. Os substratos foram adicionados na proporção de 2g/L no caso de PASC e 5g/L no caso de CMC e palha de milho pré-tratada com ácido diluído (PSC). 37
- Tabela 2: Atividade residual relativa (%) de diferentes glicosil hidrolases submetidas à ensaios de termo-estabilidade. As proteínas foram incubadas durante 3 horas nas temperaturas indicadas e após esse período foram avaliadas quanto a atividade hidrolítica empregando CMC como substrato. 41
- Tabela 3: Atividade relativa (%) de EGs da família GH45 em substrato de celulose e hemicelulose. 42
- Tabela 4: Comparação das principais características entre diferentes plataformas biotecnológicas empregadas para a produção de proteínas heterólogas em meio de cultura líquido. 44
- Tabela 6: Parâmetros utilizados nos ciclos e reações de PCR para amplificação das sequência de interesse. 49
- Tabela 7: Parâmetros utilizados nos ciclos e reações de PCR para amplificação do vetor de clonagem. 50
- Tabela 8: Detalhamento dos substratos utilizados na determinação da especificidade da GtGH45. As informações foram obtidas em www.megazyme.com/. 60
- Tabela 9: Composição química do bagaço de cana de açúcar submetido ao tratamento com sulfito alcalino (10g Na₂SO₃ e 5 g de NaOH/100g bagaço) e da região medular da cana híbrido 58. Todos os valores estão baseados na massa seca inicial. . 61
- Tabela 10: Características das proteínas GtGH5 e GtGH45 obtidas por análise de bioinformática. 66
- Tabela 11: Monitoramento da concentração de proteínas extracelulares totais (mg/mL) nos cultivos das diferentes cepas de *A. nidulans* transformadas para secreção de GtGH5 e GtGH45. A escala de cores está relacionada com os teores de proteína, sendo que baixos valores estão associados com a cor amarela e altos teores com a cor azul escuro. 69
- Tabela 12: Hidrólise de diferentes polissacarídeos catalisada por GtGH45. A escala de cores varia do o amarelo mais claro para menor atividade até laranja mais escuro para maior atividade. Reação feita à 50 °C durante 1 hora em pH 4.8. 80

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1. PANORAMA ENERGÉTICO	25
2.2. BIOCOMBUSTÍVEIS	26
2.3. BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	27
2.4. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE	29
2.5. FUNGOS DEGRADADORES DE MADEIRA	32
2.5.1. FUNGOS DE DEGRADAÇÃO BRANCA	33
2.5.2. FUNGOS DE DEGRADAÇÃO PARDA	34
2.6. ENDOGLUCANASES DA FAMÍLIA GH5	36
2.7. PROTEÍNAS DA FAMÍLIA GH45	38
2.8. CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA	42
3. OBJETIVOS	45
4. MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1. MICRO-ORGANISMOS E MEIOS DE CULTIVO	46
4.2. CLONAGEM E EXPRESSÃO DAS ENDOGLUCANASES GtGH5 E GtGH45 EM <i>A. nidulans</i>	46
4.2.1. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO (DNAg)	47
4.2.2. CONSTRUÇÃO DOS PRIMERS	48
4.2.3. AMPLIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA GÊNICA	48
4.2.4. VETOR DE CLONAGEM PARA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EM <i>Aspergillus nidulans</i>	49
4.2.5. CÉLULAS COMPETENTES	52
4.2.6. TRANSFORMAÇÃO EM <i>E. coli</i>	52
4.2.7. EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL	53
4.2.8. OBTENÇÃO DE PROTOPLASTOS DE <i>A. nidulans</i> A773	53
4.2.9. TRANSFORMAÇÃO EM <i>A. nidulans</i>	54
4.3. ANÁLISE FILOGENÉTICA	54
4.4. SELEÇÃO DO CLONE COM MAIOR NÍVEL DE EXPRESSÃO	55
4.5. CONFIRMAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE POLIPEPTÍDEOS AUTÊNTICOS NAS PROTEÍNAS A PARTIR DE ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	56
4.6. CULTIVO DE <i>A. Nidulans</i> RECOMBINANTES PARA IDENTIFICAR CONDIÇÕES QUE PERMITISSEM ELEVADA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DE INTERESSE	57

4.7. PREPARAÇÃO DA PROTEÍNA DE INTERESSE	58
4.8. DETERMINAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DA ENZIMA PURIFICADA	59
4.8.1. ESTABILIDADE TÉRMICA	59
4.8.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE EM DIFERENTES SUBSTRATOS	59
4.8.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE EM FUNÇÃO DO pH DE REAÇÃO	60
4.9. ANÁLISE DE OLIGOSSACARÍDEOS FORMADOS EM REAÇÕES CATALIZADAS PELA GtGH45	60
4.10. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SUBSTRATOS COMPLEXOS COM GtGH45	61
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1. CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA GtGH45 e GtGH5	63
5.2. SELEÇÃO DOS CLONES COM MAIOR NÍVEL DE EXPRESSÃO	66
5.3. CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTOMETRIA DE MASSAS	69
5.4. ANÁLISE FILOGENÉTICA	70
5.5. CONDIÇÕES IDEAIS PARA A EXPRESSÃO DE GtGH45	73
5.6. PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA GtGH45 RECOMBINANTE	76
5.7. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E ATIVIDADE CATALÍTICA DA GtGH45	78
5.7.1. DESNATURAÇÃO TÉRMICA EM SOLUÇÃO EM DIFERENTES pHs	78
5.7.2. ATIVIDADE CATALÍTICA DA GtGH45	79
5.7.3. OLIGOSSACARÍDEOS GERADOS DURANTE A HIDRÓLISE DE PASC POR GtGH45	81
5.7.4. pH ÓTIMO	81
5.8. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO PRÉ-TRATADO COM SULFITO ALCALINO E DE MEDULA DE CANA AUXILIADAS POR GtGH45.	82
6. CONCLUSÕES	68
7. PERSPECTIVAS	88
8. REFERÊNCIAS	89
APÊNDICE A	94
APÊNDICE B	97
APÊNDICE C	98
APÊNDICE D	99

1. INTRODUÇÃO

A biomassa lignocelulósica representa uma fonte de carbono renovável, com potencial para gerar energia e produtos químicos de forma sustentável, minimizando problemas ambientais decorrentes do uso de combustíveis fósseis (RODRIGUES, 2011).

Nas últimas décadas, Brasil e EUA têm dominado o cenário mundial da produção de etanol combustível a partir de fontes renováveis (JONKER et al., 2014). As matérias primas utilizadas para a produção deste etanol (denominado de primeira geração) são as culturas de cana-de-açúcar e do milho, respectivamente. Nos dois casos, a fonte de açúcar fermentecível é de fácil obtenção: sacarose do caldo de cana e glicose a partir da hidrólise enzimática do amido contido no milho. Por outro lado, existe uma expectativa atual de que a próxima geração de biocombustíveis (denominados de segunda geração) seja produzida a partir de rejeitos agrícolas e/ou florestais (biomassa lignocelulósica), maximizando o uso da área plantada e ampliando o número de países envolvidos na produção de biocombustíveis (DIAS et al., 2015). No entanto, o processamento da biomassa lignocelulósica para a produção de etanol de segunda geração é mais complexo e requer a conversão eficiente de seus polissacarídeos a monômeros fermentescíveis (HARRIS et al., 2014).

O material lignocelulósico é constituído principalmente por celulose, hemicelulose, lignina, extrativos e compostos minerais. A celulose é o componente mais abundante da biomassa, sendo um polímero linear constituído de monômeros de D-anidroglicopirranose unidos por ligações β -1,4-glicosídicas (HENRIKSSON; LENHOM, 2009). Para a desconstrução desse polissacarídeo é necessária a ação sinérgica de pelo menos três grupos de enzimas hidrolíticas, conhecidas como celulasas: endoglucanases (EGs), celobiohidrolases (CBHs) e β -glicosidases (HORN et al., 2012). Além dessas enzimas, recentemente tem sido discutido o papel de outras proteínas não hidrolíticas envolvidas na degradação da celulose, como as swoleninas (SWO) e as LPMOs (do inglês, *lytic polysaccharide mono-oxygenases*). O modo particular de ação das SWOs sugere que elas possam estar envolvidas no incremento do acesso das celulasas à celulose. As LPMOs podem romper uma ligação glicosídica de forma oxidativa e randômica e assim gerar novos terminais acessíveis às CBHs (ARANTES; SADDLER, 2010).

Dentro do contexto atual de busca por sistemas enzimáticos mais eficientes para a desconstrução da celulose, existe uma série de trabalhos que prospectam enzimas ainda não conhecidas ou com maior capacidade catalítica. Uma das fontes de prospeção destas enzimas são os fungos degradadores de materiais lignocelulósicos. Estes organismos são os responsáveis pela ciclagem do carbono na natureza e apresentam "maquinário" extracelular completo, capaz de transformar os componentes da biomassa

lignificada em CO₂ e água (VAN DEN BRINK; DE VRIES, 2011). Dentro dos basidiomicetos, *Gloeophyllum trabeum* é classificado, segundo seu modo de ação na madeira, como um fungo de degradação parda. Durante o curso de degradação da biomassa, este fungo é capaz de produzir enzimas hidrolíticas e metabólitos extracelulares capazes de iniciar a formação de radicais hidroxila via reação de Fenton. A ação desses radicais oxida o material, gerando, inclusive, terminais oxidados na celulose (ARANTES; JELLISON; GOODELL, 2012). O sistema enzimático deste fungo é deficiente em CBHs (MANSFIELD; SADDLER; GUBITZ, 1998) e o mecanismo utilizado para desconstrução da celulose pode envolver enzimas diferenciadas como endo-1,4-β-glucanases processivas (COHEN et al., 2005) e outras enzimas que ainda não foram adequadamente estudadas.

As características mencionadas anteriormente fazem de *G. trabeum* um alvo promissor para a prospecção de enzimas de interesse biotecnológico. No presente trabalho, duas glicosil hidrolases (GH5 e GH45) originárias de *G. trabeum* foram clonadas e expressas em *Aspergillus nidulans* a fim de permitir a realização de estudos bioquímicos de caracterização do modo de ação dessas enzimas. A aplicação das enzimas purificadas, juntamente com celulases comerciais, também foi avaliada frente à hidrólise de biomassa lignificada.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. PANORAMA ENERGÉTICO

O mundo atual vem passando por mudanças no que se refere à questão de geração de energia, como apontado pelo *International Energy Outlook* de 2015 (EIA, 2015). A demanda energética mundial está em uma mudança dinâmica, movimentada principalmente pela China, Índia e Oriente Médio. Algumas projeções feitas por analistas de mercado indicam a possibilidade de um aumento no preço dos combustíveis fósseis nas próximas décadas (figura 1A). Recentemente o preço do petróleo atingiu patamares elevados e tem oscilado de acordo com as articulações políticas dos países produtores. A acessibilidade garantida a um custo razoável é um dos grandes problemas dos países dependentes do recurso. Além disso, o consumo de combustíveis líquidos tende a aumentar com o desenvolvimento dos países, sendo que em 2010 o consumo foi de 40 milhões de barris por dia (mb/d) e em 2040 pode chegar a 75 mb/d (IEO, 2014) (figura 1B).

Figura 1: (A) Ilustração da oscilação do preço do petróleo ao longo dos últimos anos e projeções de preços futuros até 2040; (B) Consumo diário de barris de petróleo em várias regiões do mundo.

Fonte: (A) Adaptado de IEO, 2015; (B) Adaptado de IEO, 2014.

Outro fator que envolve a questão da oferta e do preço do petróleo é a sua distribuição mundial irregular, sendo que um grande número de países produtores enfrentam instabilidade política e econômica. Estas instabilidades fazem com que o preço do petróleo oscile no mercado, dificultando as projeções de preços (GOLDEMBERG, 2008). Associado aos problemas de ordem política internacional existe a questão ambiental, pois o uso de combustíveis fósseis afeta o equilíbrio dos gases na atmosfera e está correlacionado com o aquecimento global e suas consequências indesejáveis.

Existem ainda problemas operacionais relativos à exploração de petróleo que podem resultar em gigantescos impactos ambientais, tais como, a explosão da plataforma localizada no Golfo do México em 2010 (AMORIM et al., 2011).

Diante da demanda social por mudanças na matriz energética mundial, tem havido um grande esforço de diversos setores, como empresas, universidades, centros de tecnologia privados e públicos no sentido de buscar novos suprimentos energéticos sustentáveis, alinhando a visão acadêmica com a necessidade industrial. Nesse cenário os biocombustíveis de segunda geração emergem como um conceito a ser explorado (AMORIM et al., 2011).

2.2. BIOCOMBUSTÍVEIS

O desenvolvimento de novas tecnologias para a produção sustentável de energia vem crescendo, sendo que os biocombustíveis surgem como uma das fontes energéticas promissoras. As matérias primas utilizadas para a produção de biocombustíveis de primeira geração (1G) em larga escala são provenientes de culturas agrícolas, principalmente a cana-de-açúcar, o milho e as plantas (AMORIM et al., 2011). Mais recentemente, surgiu o conceito de um complexo fabril, denominado biorefinaria de segunda geração (2G), que seria similar a uma refinaria petrolífera, pois poderia produzir energia e compostos químicos de elevado valor agregado a partir de toda a biomassa incluindo a fração lignocelulósica (*National Renewable Energy Laboratory*). Este tipo de biorefinaria poderia aproveitar integralmente a biomassa, incluindo os resíduos agrícolas e florestais, minimizando o uso da terra para a produção de energia e insumos (KIM; DALE, 2004).

Uma comparação da produção de etanol 1G a partir da cana e do milho mostra que é possível produzir, em média 7.200 L de etanol por hectare a partir de cana contra 3.800 L/hectare a partir do milho (HO; NGO; GUO, 2014). Além disso, quando se considera o balanço energético dos processos produtivos observa-se que para uma unidade energética de combustível fóssil consumido são gerados 9,3 unidades energéticas de etanol a partir da cana. No caso do etanol do milho, são geradas apenas 1,3 unidades energéticas por unidade de combustível fóssil consumido (AMORIM et al., 2011). Estas informações indicam que o uso integral da biomassa produzida, incluindo, por exemplo, o bagaço de cana e a palha do milho é desejável não só do ponto de vista econômico, mas também do ponto de vista do uso mais otimizado da área de solo plantada.

O Brasil é referência mundial na produção de etanol a partir de cana. Um estudo que calculou a demanda por área plantada de cana para substituir 5% do uso do petróleo

mundial (projetado para um total de 1,7 trilhão de litros em 2025) por etanol 1G de cana mostrou que o país deveria produzir 102 bilhões de litros desse combustível. Isso demandaria a expansão de 17 milhões de hectares de plantação de cana para atingir essa produção, o que significaria contar com uma área plantada de cana equivalente a atual área cultivada de soja. Contudo, se 8% do bagaço da cana for utilizado para produção de etanol 2G, esta área cultivada poderia ser diminuída em 29%. A palha gerada como subproduto da produção sucro-energética também pode ser utilizada junto com o bagaço para o aumento do rendimento do etanol 2G (LEITE et al., 2009).

Os dados comentados anteriormente reforçam que a biomassa lignocelulósica pode ser efetivamente uma fonte alternativa de carbono renovável, com potencial para gerar energia e produtos químicos, diminuindo a demanda por área plantada contornando as inquietações acarretadas pelos biocombustíveis 1G.

2.3. BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

O termo biomassa lignocelulósica se refere à matéria orgânica de origem vegetal produzida por plantas terrestres a partir do processo de fotossíntese. Dentre os diversos tipos de biomassa lignocelulósica que podem ser utilizados para produzir combustíveis ou energia pela queima direta estão os produtos do setor florestal, os resíduos florestais e agrícolas, além dos produtos de cultivos dedicados à produção de matéria prima para o setor de agro-energia (JONKER et al., 2014).

Embora os teores de componentes da parede celular possam variar de acordo com o tipo celular da planta e com a sua maturidade, celulose, hemicelulose e lignina se associam em uma ultra-estrutura complexa e compacta que limita o acesso aos polissacarídeos estruturais, dificultando assim a hidrólise dos mesmos até monômeros fermentescíveis (PAYNE et al., 2015).

A celulose é o componente mais abundante da biomassa e é encontrada na natureza quase exclusivamente na parede celular das plantas, embora seja produzida por alguns animais (*exemplo*: tunicados) e algumas bactérias. A elevada concentração de celulose é uma característica típica das paredes celulares vegetais, sendo que os teores podem variar entre 35 e 50% do peso seco da parede celular, dependendo do tipo de planta (HENRIKSSON e LENNHOLM, 2009). A celulose é um polímero linear constituído de monômeros de D-anidroglicopiranosose unidas por ligações β -1,4-glicosídicas (figura 2), com um grau de polimerização acima de 10000 (HENRIKSSON e LENNHOLM, 2009).

Figura 2: Estrutura de uma cadeia de celulose.

Fonte: Adaptado de (HENRIKSSON, LENNHOLM, 2009).

As cadeias de celulose interagem entre si por ligações de hidrogênio ou força de van der Waals formando estruturas cristalinas, que conferem recalcitrância ao material. A estrutura cristalina da celulose impede a infiltração de celulasas bem como de qualquer molécula, mesmo pequena, como a água (ARANTES; SADDLER, 2010). Um grande desafio para acessar as cadeias celulósicas reside também no fato de ela estar envolvida em uma matriz formada por hemicelulose e lignina (BINDER; RAINES, 2010).

O segundo polímero de maior abundância no material lignocelulósico é a hemicelulose (20% à 35%), porém diferentemente da celulose, há grande variação na composição de seus monômeros dependendo do tipo de plantas e até mesmo do tecido vegetal (HORN et al., 2012). Os principais monômeros constituintes da hemicelulose são glicose, manose e galactose (hexoses) e/ou xilose e arabinose (pentoses). Em gramíneas, onde está incluída a cana-de-açúcar, a hemicelulose é constituída majoritariamente por unidades de anidroxilose, unidas por ligações β -1,4, formando cadeias de xilana, com grupos pendentes de arabinose, ácido 4-O-metil-glucurônico, acetila e ainda ácidos ferúlico e cumárico (4-O-metil-glucoroxilanas) (RENNIE; SCHELLER, 2014; HORN et al., 2012; SQUINA et al., 2009).

O terceiro componente da parede celular vegetal é a lignina, que diferente da celulose e da hemicelulose, é formada por unidades de fenil-propano unidas por ligações do tipo éter ou carbono-carbono (HENRIKSSON, 2009). Os precursores que formam a lignina são derivados de três monolignóis: álcool coniferílico, o álcool sinapílico e álcool *p*-cumarílico. Quando estes monolignóis são incorporados na lignina, através da polimerização radicalar das unidades fenil-propano, dão origem a estruturas denominadas guaiacil (G), siringil (S) e *p*-hidroxifenil (H), respectivamente (HORN et al., 2012). Na estrutura da lignina em cana-de-açúcar estão presentes os três tipos de precursores (HENRIKSSON, 2009; DELRIO et al., 2015).

A lignina apresenta uma estrutura de alta estabilidade biológica e química. Sua presença na parede celular vegetal, juntamente com a hemicelulose, forma uma matriz amorfa onde a celulose está embebida e protegida contra a biodegradação (ADSUL et al., 2011). Costa et al. (2013), demonstraram que existe uma relação inversa entre o teor de

lignina e a digestibilidade da parede celular por celulases, onde um alto teor de celulose e um baixo teor de lignina ou hemicelulose aumenta o rendimento da hidrólise enzimática.

Para a conversão dos polissacarídeos da parede vegetal em monômeros fermentescíveis são necessárias duas etapas. A primeira consiste na quebra da recalcitrância do material expondo as cadeias de celulose, chamada de pré-tratamento, sendo estes classificados em biológicos, físicos e químicos, bem como pode haver combinações entre eles (ALVIRA et al., 2010). A segunda etapa é chamada de sacarificação ou hidrólise e consiste na desconstrução dos polissacarídeos, gerando açúcares primários que podem ser fermentados, gerando etanol ou outros produtos de interesse comercial (SIMS et al., 2010).

2.4. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE

Existe um conjunto de enzimas ativas em carboidratos que degradam os polissacarídeos estruturais da parede celular vegetal (VAN DEN BRINK; DE VRIES, 2011). Um grupo de pesquisadores liderados por Bernard Henrrisat criou um banco de dados denominado CAZy (*Carbohydrate Active Enzyme*) que agrupa estas proteínas de acordo com a similaridade nas sequências de amino-ácidos e nas estruturas proteicas (LEVASSEUR et al., 2013). Essas enzimas são agrupadas em classes conhecidas como glicosil hidrolases (GHs, *glycosyl hydrolases*), carboidrato esterases (CEs, *carbohydrate esterases*), polissacarídeo liases (PLs, *polysaccharide lyases*) e mais recentemente se incluiu também um grupo de enzimas denominadas auxiliares (AAs, *auxiliary activities*).

A desconstrução enzimática da celulose requer a ação sinérgica de pelo menos três grupos de enzimas hidrolíticas conhecidas como celulases e classificadas no CAZy como glicosil hidrolases. De acordo com a *Enzyme Comission* (EC), estas enzimas são classificadas de acordo com os respectivos modos de ação como: endoglucanases (EC 3.2.1.14), exo-glucanases (EC 3.2.1.91 e EC 3.2.1.176) e β -glicosidases (EC 3.2.1.21) (DASHTBAN et al., 2010; VLASENKO et al., 2010; HORN et al., 2012). Todas essas celulases são hidrolases, pois clivam as ligações glicosídicas pela adição de uma molécula de água (DAVIES; HENRISSAT, 1995).

As endoglucanases (EGs) iniciam a degradação da celulose clivando randomicamente ligações glicosídicas, podendo ser processivas ou não, agindo preferencialmente na região amorfa ao longo do polissacarídeo. Esta etapa de degradação promove uma rápida diminuição no grau de polimerização da celulose e expõe novas extremidades das cadeias de celulose. Atualmente as endoglucanases estão classificadas no CAZy nas famílias GH 5, 6, 7, 8, 9, 12, 44, 45, 48, 51, 61, 74 e 124

(VLASENKO et al., 2010; VAN DEN BRINK; DE VRIES, 2011; HORN et al., 2012; SEGATO et al., 2014).

As celobiohidrolases (CBHs) podem iniciar a hidrólise da celulose ou de celooligômeros a partir das extremidades redutoras e não-redutoras, agindo ao longo da cadeia, sempre liberando celobiose como produto de reação (HORN et al., 2012). Quanto a classificação no CAZy, CBHs estão presentes nas famílias GH 6 (CBHII - atuam no terminal não redutor) e 7 (CBHI - atuam no terminal redutor). Este é, atualmente, o grupo de celulases mais estudado e também o mais abundante nos coquetéis enzimáticos comerciais devido a grande eficiência que apresentam para hidrolisar a celulose (VAN DEN BRINK; DE VRIES, 2011; HORN et al., 2012).

Por fim, as β -glicosidases hidrolisam a ligação glicosídica β -1,4 da celobiose, (produto da ação das CBHs), liberando duas unidades de glicose (HORN et al., 2012). As β -glicosidases são encontradas nas famílias GH 1 e GH3 (SEGATO et al., 2014).

Uma característica em comum de algumas celulases é uma estrutura modular conhecida como módulo de ligação ao carboidrato (CBM, do inglês *carbohydrate-binding module*). O CBM afeta a ligação da celulase à superfície da celulose e provavelmente facilita a hidrólise desse polímero por aproximar o domínio catalítico ao substrato. A presença dos CBMs é particularmente importante para o início da reação e a processividade das CBHs e de algumas EGs (SEGATO et al., 2014). Além disso, Arantes e Saddler (2010), mencionaram que o CBM tem a capacidade de penetrar entre as cadeias de celulose, quebrando as ligações de hidrogênio entre essas cadeias.

Algumas proteínas são capazes de causar modificações na supra-estrutura da celulose sem apresentar atividade hidrolítica expressiva. As swoleninas (SWOs) estão neste grupo e compreendem a uma classe de proteínas assistentes, classificadas no CAZy, como CBMI. A sequência de amino-ácidos da primeira SWO descrita na literatura possui alta similaridade com expansinas de plantas. As expansinas são proteínas conhecidas por afrouxarem as nanofibrilas de celulose que formam a parede celular vegetal, mediante quebra das ligações de hidrogênio, sem hidrolisar o polissacarídeo (SALOHEIMO et al., 2002; ANDBERG; PENTTILÄ; SALOHEIMO, 2015). Apesar de não apresentar atividade catalítica, as SWOs aumentam a eficiência da conversão de celulose à glicose quando são adicionadas às reações de hidrólise de substratos contendo celulose insolúvel (ANDBERG; PENTTILÄ; SALOHEIMO, 2015). Esses efeitos podem ser atribuídos às mudanças supra-estruturais no substrato celulósico, envolvendo a diminuição da proporção de celulose cristalina, o que leva à desagregação das nanofibrilas sem a formação de novos terminais redutores (SALOHEIMO et al., 2002). O modo particular de ação das SWOs sugere que elas possam estar envolvidas no incremento do acesso das celulases às cadeias mais internas do polímero de celulose

(ARANTES; SADDLER, 2010). Todavia, ainda não há conceitos completamente estabelecidos sobre a forma de ação das SWOs. Por exemplo, Andberg, Penttilä e Saloheimo (2015) observaram atividade hidrolítica na SWO1 de *Trichoderma reesei* sobre CMC, HEC e β -glucana, sugerindo que, ao contrário do que se pensava, essa proteína pode apresentar atividade catalítica.

Além das enzimas hidrolíticas, as LPMOs são enzimas com atividade oxidativa que podem romper uma ligação glicosídica nos polissacarídeos da biomassa. A ação oxidativa em questão ocorre ao acaso nas cadeias de celulose e pode aumentar o acesso das celulasas à cadeia de celulose (ARANTES; SADDLER, 2010). Originalmente, as LPMOs foram classificadas como GHs da família 61 e caracterizadas como EGs de baixa atividade. Porém, atualmente foram reclassificadas e são conhecidas como oxido-redutases pertencentes à família AA9 (*auxiliary activity*), que correspondem ao grupo de proteínas com atividade auxiliar descrito no CAZy (LEVASSEUR et al., 2013).

Harris et al. (2010) demonstraram que, incorporando a sequência gênica de uma LPMO de *Thielavia terrestris* ao genoma da cepa industrial de *Trichoderma reesei*, foi obtido um extrato enzimático com o qual foi possível aumentar o rendimento da hidrólise, utilizando a mesma carga de proteína, quando comparada com o extrato da cepa industrial convencional. Além disso, os autores demonstraram a dependência dessa enzima por íons metálicos, uma vez que foi detectado um sítio de ligação para metais. Em outro trabalho utilizando a LPMO do basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* (fungo modelo de degradação branca), foi demonstrado que a proteína torna-se mais reativa na presença de cobre ou manganês ou outro agente redutor e que essa enzima tem atividade oxidativa na cadeia de celulose. Também, foi descrita a capacidade dessa LPMO em clivar a celulose quando já existe a presença de grande quantidade de terminais redutores, liberando oligossacarídeos ou dissacarídeos oxidados, mas sua principal característica é agir em sinergia com as celulasas, principalmente com as CBHs (WESTERENG et al., 2011).

As celobiose desidrogenases (CDHs) (EC 1.1.99.18) são enzimas oxidativas produzidas pelos fungos de degradação parda e branca. Elas são capazes de oxidar celobiose e celo-oligossacarídeos na presença de um aceptor de elétrons (HORN et al., 2012; RYTIOJA et al., 2014). Em função destas observações experimentais, tem sido sugerido que as CDHs estão envolvidas na degradação da celulose, atuando, provavelmente, como um cofator das LPMOs, que catalisam a inserção de oxigênio nas ligações C-H das ligações glicosídicas (SEGATO et al., 2014). Além disso, as CDHs podem reduzir íons Fe^{3+} e, desta forma, gerar radicais hidroxilas via reação de Fenton ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{OH}(\text{rad}) + \text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}$). Os radicais hidroxila podem degradar tanto polissacarídeos como lignina devido à elevada capacidade oxidativa (HAMMEL et al.,

2002). A Figura 3 ilustra como todo o conjunto de enzimas descrito anteriormente pode atuar em sinergia na despolimerização da celulose até glicose.

Figura 3: Desconstrução da celulose por celulasas e enzimas oxidativas. As endoglucanases (EG) clivam as ligações glicosídicas na região amorfa. As extremidades redutoras e não redutoras são hidrolisadas processivamente pelas celobiohidrolases (CBH I e II, respectivamente), estando ligadas ou não aos domínios de ligação ao carboidrato (CBM). A ação das CBHs tem como produto principal a celobiose, a qual é hidrolisada em duas unidades de glicose pelas β -glicosidasas. Proteínas com atividade auxiliar da família AA9 também participam da desconstrução da celulose por um mecanismo oxidativo, formando novos terminais para o ataque das CBHs. As SWOs podem destruturar a porção cristalina da celulose. As celobiodesidrogenases (CDH) participam como doadores de elétrons para as AA9 e também podem atuar oxidando as celobioses.

Fonte: Adaptado de (HORN et al., 2012).

A adição das LPMOs nos coquetéis de celulasas permite aumentar significativamente a hidrólise de um determinado material lignocelulósico, o que indica o efeito sinérgico desta enzima, sugerindo que são criados mais sítios reativos devido a desestruturação da região cristalina da celulose e à clivagem da cadeia que gera novos pontos de acesso às CBHs (HU; ARANTES; PRIBOWO, 2014). Mesmo com o aumento da eficiência de hidrólise, Cannella et al. (2012) sugerem que pode haver uma super estimativa da quantidade de glicose liberada, pois ocorre a formação e liberação de ácidos aldônicos, detectados na mesma fração da glicose e celobiose pelas técnicas cromatográficas tradicionais. Estes ácidos aldônicos são resultantes da atividade oxidativa das LPMOs, sendo que também apresentam capacidade de inibir a ação das celulasas.

2.5. FUNGOS DEGRADADORES DE MADEIRA

O Reino Fungi está dividido nas classes Zigomicota, Ascomicota e Basidiomycota, sendo que os basidiomicetos são reconhecidos como os verdadeiros fungos de

degradação de madeira (NILSON, 2009). Esses fungos possuem papel fundamental no ciclo do carbono dentro da dinâmica das florestas. O estudo dos mecanismos de degradação empregados por esses organismos permite, não somente a compreensão da sua participação nos processos ecológicos, mas também no contexto de desenvolvimento de preservantes de madeira mais sustentáveis e nas aplicações de suas enzimas para a hidrólise de biomassa *in vitro* (ARANTES; JELLISON; GOODELL, 2012).

Em contraste com o conhecimento gerado sobre o modo de ação de enzimas hidrolíticas de ascomicetos, principalmente *Trichoderma reesei*, ainda é limitada a compreensão sobre os mecanismos de ação dos basidiomicetos, bem como o de suas enzimas (IGARASHI et al., 2008). Todavia, nos últimos anos tem aumentado o número de estudos que sequenciam e anotam o genoma dos fungos degradadores de madeiras (RYTIOJA et al., 2014). Em muitos desses estudos, a finalidade é compreender a fisiologia desses microrganismos e também prospectar novas enzimas para aplicação em processos industriais (EASTWOOD et al., 2011).

Sabe-se que os fungos degradadores de madeiras possuem dois sistemas diferentes envolvidos na desconstrução das moléculas de celulose: enzimático e pela ação de radicais (BALDRIAN; VENDULA, 2008). Os basidiomicetos são usualmente divididos em fungos de degradação parda e fungos de degradação branca, de acordo com o tipo de modificação macroscópica que são capazes de fazer no material lignocelulósico (FERRAZ, 2004). Informações obtidas dos genomas desses organismos indicam que os fungos de degradação parda evoluíram a partir de espécies ancestrais de fungos de degradação branca (RYTIOJA et al., 2014).

2.5.1. FUNGOS DE DEGRADAÇÃO BRANCA

Os fungos de degradação branca são conhecidos pela degradação extensiva da celulose, hemicelulose e lignina da parede celular vegetal (NILSON, 2009). Mais de 90% de todas as espécies de basidiomicetos degradadores de madeira são do tipo de degradação branca e ocorrem mais comumente em folhosas (angiospermas) do que em coníferas (gimnospermas) (RYTIOJA et al., 2014).

A típica degradação branca deixa o material lignocelulósico (principalmente madeira) com aspecto esbranquiçado e fibroso, sendo que celulose, hemicelulose e lignina são degradadas em velocidades similares. Todavia, existe um tipo de degradação branca que remove lignina de forma seletiva. Neste caso, lignina e hemicelulose são degradadas simultaneamente, no entanto a celulose permanece praticamente intacta (NILSON, 2009).

Os fungos de degradação branca empregam um arsenal de enzimas extracelulares durante o curso da degradação. No genoma desses organismos são comumente encontrados genes que codificam celobiohidrolases (GH6 e GH7), endoglucanases (GH5, GH43), xilanases (GH10 e GH11), β -glucosidases (GH3), um grande número de LPMOs (AA9) e também de enzimas oxidativas que atuam sobre a lignina, como a lignina peroxidase (LiP) (AA2), manganês peroxidase (MnP) (AA2), peroxidases versáteis (VP) (AA2) e lacases (AA1) (FLOUDAS et al., 2012).

2.5.2. FUNGOS DE DEGRADAÇÃO PARDA

A degradação parda apresenta características singulares que não se assemelham a nenhuma outra (NILSON, 2009). Apesar de apenas 6% das espécies de fungos degradadores de madeira pertencerem ao grupo de degradação parda, esses são dominantes na decomposição da biomassa nas florestas boreais e geralmente são associados à degradação de madeira de coníferas (EASTWOOD et al., 2011).

Os fungos degradação parda são capazes de degradar a celulose e a hemicelulose, enquanto a lignina permanece no material levemente modificada. O material lignocelulósico que sofre esse tipo de degradação fica com coloração marrom, quebradiço na forma de cubos e colapsa em pó facilmente (NILSON, 2009). Muitos pesquisadores atribuem a desconstrução do material lignocelulósico pelos fungos de degradação parda não somente às enzimas hidrolíticas, mas também a agentes oxidantes extracelulares de baixa massa molar que são capazes de se difundir na parede celular lignificada, atuando relativamente distante da hifa fungica (JENSEN et al., 2001).

Em 1974, Koenigs, em um cultivo de *Gloeophyllum trabeum* em madeira de *Pinus*, demonstrou que ocorre uma rápida diminuição no grau de polimerização dos polissacarídeos, indicando que nas etapas iniciais da degradação existe a participação de Fe^{2+} e de H_2O_2 . Mais de duas décadas depois foi detectada a presença de 2,5-dimetoxihidroquinona (DMHQ) que sofre oxidação à 2,5-dimetoxi-1,4-benzoquinona (DMBQ) em cultivos de *G. trabeum* (GOODELL et al., 1997; KEREM; JENSEN; HAMMEL, 1999). O ciclo de reação destas quinonas reduz Fe^{3+} à Fe^{2+} e pode ainda produzir H_2O_2 no meio extracelular pela redução de O_2 . Esses componentes reagem (reação de Fenton), gerando radicais hidroxila (JENSEN et al., 2001) (figura 4). O radical hidroxila pode degradar tanto polissacarídeos, levando à despolimerização oxidativa, como na lignina, situação na qual predominam reações de hidroxilação do anel aromático e não a despolimerização (HAMMEL et al., 2002).

Figura 4: Mecanismo proposto para redução do Fe^{+3} à Fe^{+2} e produção de H_2O_2 pelo fungo *Gloeophyllum trabeum* por meio da oxidação de quinonas e o mecanismo simplificado da degradação dos componentes da parede celular vegetal via reação de Fenton.

Fonte: Adaptado de (KEREM; JENSEN; HAMMEL, 1999; ARANTES; JELLISON; GOODELL, 2012).

Os radicais hidroxila promovem uma degradação inicial da biomassa que resulta em intensa desestruturação da parede celular, permitindo que as enzimas infiltrem e atuem posteriormente (KOENIGS, 1974; PAYNE et al., 2015). A ação desses radicais modifica o material por oxidação, gerando, inclusive, terminais carboxilatos na celulose (ARANTES; JELLISON; GOODELL, 2012). É interessante notar que as enzimas hidrolíticas de fungos de degradação parda são ativas nesse ambiente. Para Baldrian e Vendula (2008), as celulasas tem papel fundamental na nutrição do microrganismo, já que elas atuam sempre próximas à hifa.

Os fungos de degradação parda também utilizam enzimas hidrolíticas e oxidativas na degradação da biomassa. Porém, no genoma de vários organismos não foram encontradas sequências que codificam CBHs e peroxidases ligninolíticas. Todavia existem exceções, como as espécies *Coniophora puteana* e *Laetiporus sulfureus*, que apresentam genes que codificam CBHs (FLOUDAS et al., 2012).

O basidiomiceto *Gloeophyllum trabeum*, objeto de estudo nesta dissertação, é um típico de fungo de degradação parda, pois possui um sistema enzimático aparentemente incompleto para a hidrólise de celulose, sendo que os genes que codificam CBHs estão ausentes (MANSFIELD; SADDLER; GUBITZ, 1998; FLOUDAS et al., 2012).

A ação isolada dos radicais e das EGs não gera grande quantidade de açúcares solúveis a partir da celulose devido a forma randômica e não processiva de ação sobre as ligações glicosídicas. Entretanto, já foi reportado que alguns organismos são capazes de produzir EGs processivas, classificadas com base na sua estrutura e funcionalidade (PAYNE et al., 2015). As EGs processivas são capazes de clivar a celulose de forma randômica, mas também liberam oligossacarídeos solúveis antes de se desligar do substrato (COHEN et al., 2005). Algumas destas enzimas apresentam um

nível intermediário de processividade, pois não são tão efetivas quanto as CBHs para gerar celobiose. De fato, há controvérsia nos critérios cinéticos empregados para definir a processividade de uma celulase (PAYNE et al., 2015).

Cohen et al. (2005) estudaram a secreção de celulases por *G. trabeum* quando cultivado em celulose micro cristalina (Avicel) como única fonte de carbono. Os autores purificaram a celulase produzida em maior proporção, classificando-a como uma EG processiva, pois a enzima apresentou atividade em celulose cristalina. Ao analisar os produtos da atividade dessa proteína em Avicel, foram detectados novos terminais redutores no substrato insolúvel, além de se detectar a formação de celobiose e glicose, quando havia β -glicosidase no meio reacional. A detecção de celobiose como produto de reação levou os autores a classificar a EG como potencialmente processiva.

Com exceção do *S. lacrymans* e *L. sulfureus*, os fungos de degradação parda não apresentam em seus genomas sequências que codificam CBMs, geralmente considerados essenciais para uma eficiente hidrólise da celulose (EASTWOOD et al., 2011). As CDHs também são exceções quando presentes no genoma de fungos de degradação parda. *G. trabeum* faz parte das exceções, pois apresenta uma sequência codificante de CDH (RILEY et al., 2014).

O mecanismo singular da desconstrução da celulose pelos fungos de degradação parda, por meio de reações de oxidação pelo radical hidroxila e sem utilizar o arsenal completo de celulases despertou o interesse do nosso grupo de pesquisa. Com base nas informações sobre EGs processivas, nosso grupo que já vem estudando os mecanismos de ação desses organismos, interessou-se por compreender e detalhar mais a fundo o mecanismo celulolítico particular de *G. trabeum*.

2.6. ENDOGLUCANASES DA FAMÍLIA GH5

A família GH5 é uma das maiores e mais diversificada dentro do grupo das glicosil hidrolases classificadas no banco de dados do CAZy, possuindo 6499 proteínas anotadas (www.cazy.com, acessado em dezembro de 2015). Há um grande número de trabalhos publicados que descrevem propriedades bioquímicas e estruturais das enzimas da família GH5 (PAYNE et al., 2015). Apesar de ser classificada como uma única família no CAZy, as GHs5 atuam em diferentes substratos, o que pode ser atribuído à origem das proteínas que derivaram de um ancestral comum, preservando alguns domínios proteicos (PAYNE et al., 2015). As enzimas pertencentes à essa família podem atuar em substratos diversos, apresentando atividade típica de endoglucanases, mananases, xilanases, xiloglucanases e arabinofuranosidases (ASPEBORG et al., 2012; SEGATO et al., 2014). Devido a grande diversidade, Aspeborg et al. (2012) sugerem a divisão da família GH5

em 51 subfamílias, com base nas sequências de amino-ácidos e na disponibilidade de características bioquímicas já avaliadas.

As EGs da família GH5 são as principais celulasas de fungos, sendo que estão codificadas tanto no genoma de ascomicetos, como no genoma de fungos de degradação branca e parda (FLOUDAS et al., 2012; SEGATO et al., 2014). As GHs5 provenientes de fungos estão agrupadas em 18 das 51 subfamílias e, até o momento, apenas 4 estruturas tridimensionais de EGs de origem fungica foram determinadas a partir da difração de cristais proteicos (VLASENKO et al., 2010; PAYNE et al., 2015). Essas enzimas são empregadas comercialmente em diversos processos industriais, como a fabricação de papel, a lavagem de jeans na indústria têxtil e a preparação de rações para a alimentação de animais (MANSFIELD; SADDLER; GUBITZ, 1998; PAYNE et al., 2015)

Vlasenko et al. (2010) avaliaram a atividade de EGs da família GH5 produzidas por 7 diferentes microrganismos. Os dados da avaliação de atividade enzimática das EGs em diferentes substratos estão mostrados na tabela 1. Nota-se que a atividade em CMC foi similar entre as enzimas de ascomicetos e de basidiomicetos. Em PASC, as EGs provenientes de basidiomicetos apresentaram atividade maior ou similar às EGs de ascomicetos. Porém, quando observamos a atividade em substratos complexos contendo lignina (palha de milho pré-tratada com ácido diluído, PSC), as EGs dos basidiomicetos apresentaram maior atividade, com exceção da EG de *Acidothermus cellulolyticus*.

Tabela 1: Porcentagem de conversão à açúcar redutor de três substratos celulósicos diferentes por endoglucanases após 24h de reação à 50°C. O meio reacional continha tampão acetato de sódio pH 5,5 e 25 mg de proteína purificada por litro. Os substratos foram adicionados na proporção de 2g/L no caso de PASC e 5g/L no caso de CMC e palha de milho pré-tratada com ácido diluído (PSC).

Conversão em açúcares redutores (%)			
Organismo	PASC	CMC	PSC
<i>Acremonium sp.</i>	7,6	2,9	0,41
<i>Aspergillus aculeatus</i>	9,7	2,9	1,9
<i>Acidothermus cellulolyticus</i>	2,4	3,0	4,1
<i>Basidiomiceto A</i> ¹	21	3,7	1,9
<i>Basidiomiceto B</i> ²	12	3,6	1,8
<i>Myceliophthora thermophila</i>	3,0	3,6	0,70
<i>Thielavia terrestris</i>	33	6,0	ND

^{1,2} identificação taxonômica não foi informada; PASC: celulose entumecida em ácido fosfórico, (do inglês *phosphoric acid swollen cellulose*); CMC: carboxymetil celulose; PSC: palha de milho pré tratada com ácido.

Fonte: Adaptado de (VLASENKO et al., 2010).

Floudas et al. (2012), observaram que o fungo *G. trabeum* possui pelo menos 5 EGs pertencentes à família GH5 e nenhuma CBH (GH6 e GH7). Cohen et al. (2005)

sugeriram, com base em ensaios de atividade enzimática, que pelo menos uma destas GH5 apresenta atividade enzimática processiva. Os dois trabalhos indicam que as GHs5 deste basidiomiceto podem apresentar características diferenciadas, já que o organismo produz apenas esse tipo de celulase para desconstrução da celulose.

Mansfield, Saddler e Gubitz (1998) cultivaram *G. trabeum* (cepa MAD 617) em 0,5% de CMC como fonte de carbono e observaram um perfil proteico extracelular que incluía uma EG. A proteína foi purificada e apresentou uma massa molar de 40,5 kDa, similar à EG (42 kDa) do mesmo fungo descrita no trabalho desenvolvido por Cohen et al. (2005). A proteína purificada gerou glicose, celobiose e celotriose como os principais produtos de hidrólise de dois substratos distintos, CMC e PASC, o que sugere certa atividade processiva da EG purificada. A EG em estudo também mostrou sinergismo para a solubilização de celo-oligossacarídeos quando empregada simultaneamente com uma EG de *Gloeophyllum sepiarium*, com 8% de aumento na solubilização de celo-oligossacarídeos durante a hidrólise de polpa de dissolução (celulose contendo 1,7% de xilana e 0,9% de manana). Houve ainda sinergismo com xilanase de *Thermomyces lanuginosus*, tendo sido observado um aumento de 72% na liberação de xilose em ensaios de hidrólise de polpa de dissolução.

Kim et al. (2012) expressaram uma GH5 (Cel5B) de *G. trabeum* em *Pichia pastoris*. A proteína recombinante apresentou massa molar de 47 kDa e pela análise da sequência completa de amino-ácidos confirmou ser a mesma proteína estudada por Cohen et al. (2005) e Mansfield, Saddler e Gubitz (1998). Os autores demonstraram que a Cel5B tem dupla-função, pois apresentou atividade em CMC bem como em papel de filtro, todavia não apresentaram resultados avaliando o nível de processividade dessa proteína. As propriedades bioquímicas da Cel5B (pH e temperatura ótimos de 3,5 e 55 °C, respectivamente) indicam que a enzima é ativa em ambiente ácido.

2.7. PROTEÍNAS DA FAMÍLIA GH45

As glicosil hidrolases pertencentes à família 45 são comumente utilizadas na indústria têxtil (biopolimento e *stonewashing*) e também adicionadas a sabões em pó para lavagem de roupas, devido a sua capacidade de remover as fibrilas da superfície da fibra de celulose e assim “recuperar” a uniformidade e suavidade da superfície dos tecidos (PAYNE et al., 2015). As GH45 podem estar ou não ligadas a CBMs. Um exemplo de GH45 que não possui CBM foi descrito para o fungo *Melanocarpus albomyces* (HIRVONEN; PAPAGEORGIOU, 2003). Exemplos de GHs45 que possuem CBM foram descritos para a bactéria *Celvibrio japonicus* que esta ligada à dois CBMs e para o basidiomiceto *Humicola insolens* que apresenta um CBM (PAYNE et al., 2015). Em

aspergilli, as endoglucanases pertencentes à família GH45 que apresentam CBMs são raras (SEGATO et al., 2014).

As GH45s são proteínas geralmente pequenas (20 kDa), em comparação com outras famílias de GHs. Essa característica pode ser vista como uma vantagem evolutiva, já que o menor tamanho permite acessar pequenos poros e cavidades do substrato. Além disso, as GH45s possuem relação evolutiva e estruturas semelhantes às expansivas, proteínas de plantas associadas com o processo de formação e alongamento da parede celular (PAYNE et al., 2015).

Atualmente, a família GH45 possui 344 proteínas anotadas no Cazy, sendo todas associadas à atividade de endoglucanase (www.cazy.com acessado em dezembro de 2015). Com base em análises filogenéticas, foi proposta a divisão desta família em subfamília A, B e C (IGARASHI et al., 2008). Na subfamília A estão presentes, majoritariamente, EGs de fungos e de algumas bactérias. Na subfamília B estão as proteínas de moluscos e de alguns fungos. Na subfamília C estão agrupadas as EGs provenientes de basidiomicetos, como a GH45 de *Phanerochaete chrysosporium* (IGARASHI et al., 2008; PAYNE et al., 2015). No banco de dados do PDB estão depositadas 5 estruturas de GHs45, com pelo menos uma representante de cada subfamília. Comparando a sequência de amino-ácidos desses representantes, nota-se maior semelhança entre a subfamília B com a subfamília C e com as expansivas, do que com a subfamília A (IGARASHI et al., 2008).

Em um trabalho recente, Nakamura et al. (2015) propuseram um mecanismo de ação para a GH45 - *PcCel45A* (representante da subfamília C produzida por *P. chrysosporium*) que explica a atividade hidrolítica por inversão (gerando β e α -celo-oligômeros simultaneamente). Os autores propuseram um modelo de catálise da PcGH45 onde o Asp¹¹⁴ (ácido aspártico) e a Asn⁹² (asparagina) atuam como os amino-ácidos catalíticos. Além disso, outros amino-ácidos estariam envolvidos no "caminho do próton", conforme ilustrado na figura 5. Estes amino-ácidos seriam a Gln⁹³, Cys⁹⁶, Phe⁹⁵, Asn¹⁰⁵, Ser¹⁴, His¹¹² e Thr¹⁶, sugerindo que os mesmos sejam essenciais para a atividade catalítica da proteína.

Figura 5: Modelo de mecanismo de reação proposto para a *PcCel45A* por meio de múltiplas transferência de prótons entre amino-ácidos adjacentes aos amino-ácidos catalíticos.

Fonte: (NAKAMURA et al., 2015).

Ao compararmos os amino-ácidos catalíticos de duas GHs45 de dois fungos com estruturas tridimensional depositadas em banco de dados (*H. insolens* - ascomiceto e *P. chrysosporium* - basidiomiceto) notamos que apenas o ácido aspártico (Asp) é conservado, sendo que em *P. chrysosporium* o doador de elétrons é asparagina (Asn) e em *H. insolens* é um aspartato (Asp na forma desprotonada) (NAKAMURA et al., 2015).

Quando comparamos a termo-estabilidade das GHs45 com as demais GHs podemos observar uma tendência de maior estabilidade nas GHs45. Vlasenko et al. (2010) publicaram um estudo extenso de termo-estabilidade de GHs das famílias 5, 7 e 45 (tabela 2). As GHs 5 e 7 usualmente perdem atividade quando são expostas à temperatura de 60 °C. Porém, diversas GHs45 são capazes de se manter razoavelmente ativas a 60 °C e, inclusive, a 80 °C em alguns casos, igualando a termo-estabilidade de GHs de fungos termofílicos como o *M. thermophila*.

Tabela 2: Atividade residual relativa (%) de diferentes glicosil hidrolases submetidas à ensaios de termo-estabilidade. As proteínas foram incubadas durante 3 horas nas temperaturas indicadas e após esse período foram avaliadas quanto a atividade hidrolítica empregando CMC como substrato.

Organismo	40°C	60°C	80°C
<i>Acremonium sp.</i> GH5	96	52	0
<i>Aspergillus aculeatus</i> GH5	103	100	0
Basidiomiceto B ¹ GH5	103	7	2
Basidiomiceto B ² GH5	90	28	5
<i>Myceliophthora thermophila</i> GH5	107	100	5
<i>Acremonium sp.</i> GH7	72	0	0
<i>Cladorrhinum foecundissimum</i> GH7	95	30	0
<i>Humicola insolens</i> GH7	95	35	0
<i>Trichoderma reesei</i> GH7	103	50	0
<i>Acremonium sp.</i> GH45	97	85	2
<i>Chaetomium brasiliensis</i> GH45	55	90	43
<i>Cladorrhinum foecundissimum</i> GH45	87	68	53
<i>Crinipellis scabella</i> GH45	90	82	0
<i>Humicola grisea</i> GH45	85	87	40
<i>Humicola insolens</i> GH45	98	92	83
<i>Humicola insolens</i> GH45	95	88	22
<i>Macrophomina phaseolina</i> GH45	70	72	0
<i>Sordaria fimicola</i> GH45	80	75	0
<i>Volutella colletotrichoides</i> GH45	87	95	12

Fonte: Adaptado de (VLASENKO et al., 2010). ^{1,2} – identificação taxonômica não informada.

Quanto à especificidade de substratos, a avaliação das GHs45 mostra que as enzimas são mais ativas na região amorfa da celulose e em substratos como β -glucano (cadeia de celulose com ligação β -1,4 e β -1,3 e grupos laterais de arabinose e xilose) e liquenana (cadeia de celulose com ligação do tipo β -1,4 e β -1,3 (2:1) e grupos laterais de manose, xilose e galactose) (HIRVONEN; PAPAGEORGIOU, 2003). Vlasenko et al. (2010) demonstraram que diversas GHs45 são mais ativas em PASC do que em CMC. Já para a atividade em substratos de hemicelulose, como xilana, xiloglucana, arabinoxilana, manana e galactomanana, as GHs45 estudadas neste trabalho foram, essencialmente, inativas (tabela 3).

Tabela 3: Atividade relativa (%) de EGs da família GH45 em substrato de celulose e hemicelulose.

Organismo	PASC	Avicel	CMC	XG ¹	X ²	AX ³	M ⁴	GM ⁵
<i>Acremonium sp.</i> GH45	7,7	0,84	1,7	0,01	0,13	0,48	0,05	0,04
<i>Chaetomium brasiliensis</i> GH45	14	1,0	2,1	0,60	0,37	0,73	0,49	0,47
<i>Cladorrhinum foecundissimum</i> GH45	8,4	0,51	1,5	0,24	0,16	0,57	0,20	0,22
<i>Crinipellis scabella</i> GH45	13	0,56	2,3	0,19	0,22	0,49	0,12	0,13
<i>Humicola grisea</i> GH45	17	1,3	2,7	0,69	0,67	1,29	0,75	0,70
<i>Humicola insolens</i> GH45	11	0,78	1,8	0,13	0,08	0,85	0,05	0,02
<i>Humicola insolens</i> GH45	3,1	0,17	1,7	0,05	0,10	0,74	0	0
<i>Macrophomina phaseolina</i> GH45	12	0,69	1,9	0,13	0,21	0,32	0,06	0,04
<i>Sordaria fimicola</i> GH45	11	1,0	1,7	0,61	0,95	1,20	0,65	0,61
<i>Volutella colletotrichoides</i> GH45	11	0,69	1,6	0,12	0,19	0,45	0,11	0,10
<i>Thielavia terrestris</i> GH45	34	2,2	5,1	0	0	1,0	0	0

XG¹: Xiloglucana (semente de tamarindo); X²: Xilana (*birchwood*); AX³: Arabinoxilana (trigo); M⁴: Manana; GM⁵: galactomanana (alfarroba).

Fonte: (VLASENKO et al., 2010).

Uma endoglucanase GH45 de *Neurospora crassa* expressa em *A. nidulans* A773 mostrou atividade expressiva em liquenana (1,05 U/mg de proteína) e β -glucana (1,02 U/mg de proteína) e baixa atividade, porém detectável, em xiloglucana (0,09 U/mg de proteína) e nenhuma atividade em manana, arabinana e galactomanana (KADOWAKI et al., 2015).

A atividade de uma GH45 de *Trichoderma reesei* foi avaliada quanto à relevância da presença do CBM. A enzima foi processada e avaliada com ou sem CBM ligado. Não houve diferença significativa entre elas na porcentagem de conversão de PASC, CMC e Avicel. Em Avicel, ambas formas proteicas converteram 0,1% do substrato em açúcares redutores e em CMC a conversão foi de 0,9%, após uma hora de reação. No caso de PASC, a conversão foi de 0,8% (com CBM) e 0,9% (sem CBM). Também foi demonstrada que a atividade dessa GH45 em glucomanana foi mais significativa do que em β -glucana (KARLSSON et al., 2002).

2.8. CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA

A clonagem de genes específicos em vetores, seguido pela sua transformação em bactérias (principalmente em *E. coli*) é uma técnica bem estabelecida, robusta e atualmente vem sendo empregada em larga escala (*highthroughput*). No entanto, o uso desta técnica para a expressão de genes que codificam proteínas recombinantes de organismo eucariotos apresenta uma série de limitações (HANNIG; MAKRIDES, 1998). A presença de regiões intrônicas em organismos eucariotos (fungos, por exemplo), as quais

estão ausentes nos procariotos (bactérias), requer que o gene seja clonado diretamente do RNA mensageiro. As mudanças pós-traducionais (glicosilações, acetilações e fosforilações), que ocorrem no retículo endoplásmico são diferentes entre os organismos eucariotos (fungos filamentosos, leveduras, células de mamíferos ou de insetos, etc) e podem levar a erros nos processos de enovelamento de proteínas, na solubilidade e até mesmo a degradação das proteínas (PRADE; SEGATO, 2014). Além disso, as etapas de extração e purificação das proteínas recombinantes produzidas em bactérias tornam o processo mais extenso, requerendo a lise celular e um maior número de etapas de purificação (HANNIG; MAKRIDES, 1998).

Uma forma de minimizar as dificuldades relativas as modificações pós-traducionais é obter uma sequência gênica de interesse (retirada de um organismo eucarioto) e em seguida cloná-la em um vetor do tipo *shuttle*, o qual é inserido em uma bactéria. A bactéria que irá replicar o DNA de interesse, aumentando o número de cópias e, por fim, esta construção pode ser extraída e re-inserida em um outro organismo eucarioto. Esta abordagem tem sido muito utilizada para a expressão de proteínas recombinantes em fungos filamentosos (SEGATO et al., 2012).

O primeiro relato de transformação em fungos visando a produção de proteínas heterólogas utilizou *Neurospora crassa* como hospedeiro e ocorreu em 1973 (MISHRA; TATUM, 1973). Desde então, os fungos filamentosos tem se mostrado uma plataforma de expressão amplamente explorada, sendo que em alguns casos a versatilidade metabólica desses organismos os tornam verdadeiras "*cell factories*" para a produção de proteínas heterólogas (MEYER et al., 2011). Uma comparação das características de diferentes sistemas empregados para a expressão heteróloga de proteínas está mostrada na tabela 4. As espécies *Aspergillus niger*, *A. oryzae* e *Trichoderma reesei* são as principais linhagens de fungos filamentosos utilizadas para produção em larga escala de proteínas heterólogas. *A. nidulans*, por ser um organismo modelo e muito bem caracterizado do ponto de vista genético, também tem se destacado como uma plataforma alternativa para a expressão heteróloga de proteínas (NEVALAINEN; TE'O; BERGQUIST, 2005).

Tabela 4: Comparação das principais características entre diferentes plataformas biotecnológicas empregadas para a produção de proteínas heterólogas em meio de cultura líquido.

Características	<i>E. coli</i>	Fungo filamentoso	Levedura	Células de mamíferos	Cultura de parede vegetal
Crescimento celular	Horas até dias	Dias até 1 semana	Dias até 1 semana	Semanas	Meses
Custo do meio de cultura	Baixo à médio	Baixo à médio	Baixo à médio	Alto	Médio à alto
Nível de expressão	Baixo à alto	Baixo à alto	Baixo à alto	Baixo à alto	Baixo
Local de secreção	Periplasma	Meio de cultura	Meio de cultura	Meio de cultura	Meio de cultura
Modificações pós-traducionais					
Dobramento da proteína	Redobramento usualmente requerido	Redobramento as vezes requerido	Redobramento as vezes requerido	Dobramento apropriado	Dobramento apropriado
Ligações O Ac¹, Fosf², Glic³	Não	Sim	Sim	Sim	Sim

1 acetilações; 2 fosforilações; 3 glicosilações

Fonte: Adaptado de (NEVALAINEN; TE'O; BERGQUIST, 2005).

Uma técnica eficiente de clonagem e expressão de proteínas heterólogas em fungos filamentosos foi descrita por Segato et al. (2012) e utiliza um vetor (denominado pEXPYR) que foi especialmente desenhado para expressão e secreção da proteína de interesse. Este vetor, possui o promotor da glucoamilase de *A. niger* (*glaP*), o qual é fortemente induzido por maltose, conduzindo a uma a super expressão do gene que codifica a proteína de interesse, seguido pela sua secreção para o meio extracelular, devido a presença de um peptídeo sinal. Deste modo, o vetor pEXPYR foi utilizado neste trabalho para clonar e expressar duas GHs codificadas no genoma de *G. trabeum* no ascomiceto *A. nidulans* cepa A773.

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi identificar, expressar, purificar, caracterizar e aplicar glicosil hidrolases (GH5 e GH45) oriundas do maquinário celulolítico do fungo de decomposição parda de *Gloeophyllum trabeum*.

Para atingir este objetivo foram desenvolvidas as seguintes etapas:

- ✓ Prospecção dos genes que codificam GHs no genoma de *G. trabeum*
- ✓ Clonagem dos genes que codificam as enzimas GtGH5 e GtGH45;
- ✓ Transformação e expressão dos genes mencionados anteriormente em *Aspergillus nidulans* linhagem A773;
- ✓ Investigação de condições de cultivo que proporcionem elevados níveis de produção das proteínas de interesse;
- ✓ Purificação das proteínas recombinantes;
- ✓ Caracterização bioquímica das proteínas obtidas;
- ✓ Avaliação da hidrólise de polissacarídeos a partir da ação de enzimas comerciais acrescidas de massa proteica fixa das proteínas em estudo

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MICRO-ORGANISMOS E MEIOS DE CULTIVO

O basidiomiceto *Gloeophyllum trabeum* empregado neste estudo foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Barry Goodell (Virginia Tech, EUA) com origem no ATCC (*American Type Culture Collection*) sob número de registro 11539. A cepa foi mantida em refrigerador após cultivo sobre meio contendo 2% de extrato de malte, 0,2% de extrato de levedura e 2% de ágar, além de um cavaco de madeira de *Pinus taeda*. A manutenção da cepa foi feita por repiques semestrais no mesmo meio citado anteriormente. Na ocasião do repique, somente o cavaco de madeira colonizado por micélio do fungo foi usado para inocular uma placa de Petri com novo meio de cultura.

O mutante *Aspergillus nidulans* A773 obtido no ATCC foi mantido em refrigerador após cultivo sobre meio mínimo, pH 6.5, contendo 5% de solução de sais (apêndice A), 0,2% de solução de elementos traço (apêndice A), 1% de glicose e 2% de agar. Por se tratar de um mutante deficiente na síntese de bases nitrogenadas, o meio foi acrescido ainda de uracila (2.5 mg/L), uridina (2.5 mg/L) e piridoxina (1 mg/L) (SEGATO et al., 2012).

As cepas de *A. nidulans* transformadas com os genes que codificam as proteínas GtGH5 e GtGH45 foram mantidas em refrigerador após cultivo em meio mínimo sólido (descrito anteriormente para *A. nidulans* A773), suplementado apenas com piridoxina (1mg/L).

A linhagem de *E. coli* TOP10[®] (*Invitrogen*) foi mantida em solução estoque (glicerol 70% e água) acondicionada em ultrafreezer à -80 °C.

4.2. CLONAGEM E EXPRESSÃO DAS ENDOGLUCANASES GtGH5 E GtGH45 EM *A. nidulans*

As regiões gênicas que codificam as endoglucanases das famílias GH5 e GH45 de *G. trabeum* (GtGH5 e GtGH45) foram clonadas no vetor *pEXPYR* (SEGATO et al., 2012), transformadas e expressas em *A. nidulans* A773 sob a supervisão do Prof. Dr. Fernando Segato do Departamento de Biotecnologia, USP-Lorena, em colaboração com o Prof. Dr. Igor Polikarpov do Instituto de Física de São Carlos, USP-São Carlos.

A metodologia empregada para a obtenção dos clones está resumida e ilustrada na figura 10.

Figura 10: Fluxograma das etapas realizadas para clonagem e transformação a fim de expressar as proteínas GtGH5 e GtGH45.

Fonte: Arquivo pessoal.

4.2.1. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO (DNAg)

A massa micelial de *G. trabeum* foi obtida a partir da raspagem do micélio crescido sobre meio sólido previamente cultivado por 7 dias à 27°C (meio descrito no item 4.1). Cerca de 50 mg de micélio (peso úmido) foram macerados em almofariz com auxílio de pistilo, adicionando-se nitrogênio líquido. O macerado foi transferido para um micro tubo de centrifuga e adicionou-se 600 µL da solução de extração de DNAg (1mL de EDTA 0,5M, 1 mL de SDS 10% e 8 mL de água destilada) e a mistura foi aquecida à 68°C durante 10 minutos. Centrifugou-se à 13000 x g por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para um tubo novo. Adicionou-se ao sobrenadante 40 µL de solução 5M de acetato de potássio e, após misturar por inversão, a solução foi mantida em banho de gelo por 10 minutos. A suspensão foi centrifugada novamente à 13000 x g por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, ao qual adicionou-se 1mL de etanol 95% e centrifugou-se nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante obtido nessa etapa foi descartado e o *pellet* formado foi lavado duas vezes com etanol 70%. Ao final das lavagens, o pellet foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 50 µL da solução TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0), acrescida de 50 mg/mL de ribonuclease A (SIGMA R6513). Para a confirmação da presença do DNAg, a fração obtida foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando os marcadores "1 Kb *plus DNA Ladder* (Invitrogen)" como referência. A eletroforese foi realizada à 90 V por 1 hora

4.2.2. CONSTRUÇÃO DOS PRIMERS

Os fragmentos de sequências de peptídeos das proteínas da família GH5 (COHEN et al., 2005) e GH45 foram identificados no genoma de *G. trabeum* através da ferramenta BLASTP no servidor Uniprot. As sequências completas das proteínas GtGH5 e GtGH45 foram submetidas à análise no servidor SignalP 4.1, disponível *on line* em <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> (PETERSEN et al., 2011) para identificação do peptídeo sinal, o qual foi excluído da sequência de amino-ácidos no momento de desenho do par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*). Baseado na sequência da proteína madura (sem peptídeo sinal) apontada pelo SignalP 4.1, um par de) foram planejados os *primers* e a síntese foi solicitada à empresa *Sigma® - Life Science*. Além dos *primers* construídos para a amplificação dos genes de interesse, também foram desenhados *primers* utilizados na amplificação do vetor de expressão (tabela 5).

Tabela 5: Iniciadores utilizados para a amplificação dos genes de interesse e do vetor pEXPYR. Em letras minúsculas estão demonstradas as regiões complementares do sistema LIC, descrito no item 4.2.4.

Sequência	
Vetor LIC - Fwr	ccggcacgggactTCTAGTGATTTAATAGCTCCATGTCAACAA
Vetor LIC - Rev	gccaaacctGTGCAGACGAGGCCGCTCAGGGCGAGTAG
GtGH5 - Fwr	gggttgcaGCCGCGCTCTCTCCGAGAGTGACAGG
GtGH5 - Rev	gtcccggtccggttaTCATGCGTTGGCAATCGGAGCCAAGCAGG
GtGH45 - Fwr	gggttgcaCTCGAGGAACGGGCCACAGGAGGTTACGTC
GtGH45 - Rev	gtcccggtccggttaTCACGACGGGGCAGTTCCCTTGTTCACACA

Fonte: arquivo próprio.

4.2.3. AMPLIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA GÊNICA

Para a amplificação das duas sequências gênicas que codificam as duas proteínas de interesse, foi utilizada a enzima DNA polimerase de alta fidelidade *Phusion™* (New England BioLabs®). As reações de PCR foram montadas de acordo com os ciclos apresentadas na tabela 6, considerando que a velocidade de amplificação é de 10kb por minuto.

Tabela 5: Parâmetros utilizados nos ciclos e reações de PCR para amplificação das sequência de interesse.

Ciclos		Reação	
98°C	30 seg	DNA (500ng)	1 µL
98°C	10 seg	Primer Forward	1,25 µL
50°C	30 min	Primer Reverse	1,25 µL
22°C	30 seg	dNTP (2,5 mM)	4 µL
72°C	10 min	Phusion	0,5 µL
15°C	Infinitos	Tampão Phusion	10 µL
		H ₂ O milli Q	32 µL
		Volume Total	50 µL

Fonte: Arquivo próprio.

A amplificação das sequências gênicas que codificam as proteínas GtGH5 (1450pb) e GtGH45 (600pb) sem o peptídeo sinal foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando os marcadores "1 Kb *plus DNA Ladder (Invitrogen)*" como referência. A eletroforese foi realizada à 90 V por 1 hora e o produto da reação de amplificação foi purificado com o kit "*Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)*", segundo instruções do fabricante.

4.2.4. VETOR DE CLONAGEM PARA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EM *Aspergillus nidulans*

A clonagem da sequência gênica de interesse foi realizada empregando o vetor aprimorado pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Rolf Alexander Prade (SEGATO et al., 2012) da Universidade Estadual de Oklahoma. O vetor *pEXPYR* (figura 8) apresenta uma marca de seleção bem definida e estável, a qual consiste na reversão de auxotrofia de uracila e uridina. Para a indução da expressão gênica utilizou-se o promotor *glaAp* de *Aspergillus niger*, sendo a maltose o indutor da expressão.

Figura 6: Vetor *pEXPYR* para clonagem em *A. nidulans*.

Fonte: (SEGATO et al., 2012).

O vetor *pEXPYR* com a calda do sistema LIC foi amplificado utilizando a enzima DNA polimerase de alta fidelidade *Phusion*TM (*New England BioLabs*[®]). As reações de PCR foram montadas de acordo com os ciclos apresentados na tabela 7, considerando que a velocidade de amplificação é de 10kb por minuto.

Tabela 6: Parâmetros utilizados nos ciclos e reações de PCR para amplificação do vetor de clonagem.

Ciclos		Reação	
98°C	30 seg	DNA (500ng)	5 µL
98°C	10 seg	Tampão	2,0 µL
50°C	30 min	dATP (2,5 mM)	0,5 µL
22°C	30 seg	DTT	1,0 µL
72°C	10 min	BSA	0,2 µL
15°C	Infinitos	T4	0,4µL
		H ₂ O milli Q	11 µL
		Volume Total	20,1 µL

Fonte: Arquivo próprio.

Para a inserção das sequências de nucleotídeos que codificam as proteínas GtGH5 e GtGH45 no vetor *pEXPYR*, foi utilizado o sistema LIC-PCR (do inglês, *Ligation-Independent Cloning of PCR Products*), não requerendo o uso de enzimas de restrição para tratar o vetor ou de T4 DNA ligase (ASLANIDIS; JONG, 1990). Os terminais 5' dos *primers forward* projetados para a amplificação do vetor e das sequências gênicas ganharam uma sequência adicional de 8 nucleotídeos (nt) deficientes em dATP, e por isso os produtos resultantes da amplificação ficaram com uma sequência de 8 nt deficientes em dTTP no terminal 3'. Entretanto, para os *primers reserve*, o terminal 5' recebeu uma sequência adicional de 12 nt, deficiente em dTTP e como resultado, no terminal 3' das amplificações havia deficiência de dATP. Dessa forma a ação da enzima (3'-5') exonuclease T4 DNA polimerase na presença de dATP e dTTP, remove a sequência no terminal 3' das amplificações, fazendo com que a sequências *overhanging* do gene amplificado seja complementar à sequência *overhanging* do vetor amplificado, e aconteça a ligação vetor-gene sem o uso da enzima DNA T4 ligase, demonstrada na figura 9.

Figura 7: Esquematisação das etapas de amplificação e clonagem envolvendo o sistema LIC. (A) amplificação do vetor de clonagem *pEXPYR* ocorre a partir do *gap* que será ocupado pelo gene de interesse, iniciando na região do peptídeo sinal (*reverse*) e no terminador do Triptofano (*forward*), sendo que a região do *poly-linker* não foi amplificada; (B) no vetor e no gene de interesse amplificados foram inseridas as caudas do sistema LIC; (C) tanto o vetor como o gene de interesse foram tratados com a enzima T4 DNA polimerase, que pela sua ação de exo polimerase remove os nucleotídeos no sentido 3'-5', criando extremidades *overhanging*, em reação na presença de dTTP para o gene e dATP para o vetor; (D) os *overhangings* serão complementares e assim ocorre a ligação biológica entre o vetor e a o gene de interesse, sem a necessidade da enzima ligase.

Fonte: Arquivo próprio.

A ligação entre as regiões amplificadas correspondentes à sequência gênica e o vetor linearizado (utilizando o sistema LIC-PCR) foi realizada da seguinte forma: em um tubo de 1,5 mL foram adicionado em 1 µL do vetor linearizado e 2 µL do inserto. A reação foi incubada à 22 °C por 5 min. Foi adicionado 1 µL de EDTA 0,025 M e a solução foi cuidadosamente homogeneizada e novamente incubada à 22 °C por 1 hora, finalizando a etapa de ligação.

4.2.5. CÉLULAS COMPETENTES

Para a obtenção de células cálcio-competentes, foi realizado o seguinte protocolo (INOUE et al., 1990): a cepa de *E. coli* TOP 10 (*Invitrogen*) foi inoculada em tubos de ensaios com tampa de rosca contendo 5 mL de meio líquido LB (apêndice A) acrescido de tetraciclina (15 µg/mL), incubada à 37 °C por 12 horas. Após o período de incubação, aproximadamente 3 mL dessa cultura foram inoculadas em 250 mL de meio SOB (apêndice A) em frasco de 2 L e mantidas à 18°C, sob agitação (200-250 rpm), por aproximadamente 2 horas e 30 minutos, até atingir a absorbância de 0,6-0,8 à 550-600 nm.

Atingida a absorbância desejada, a cultura foi mantida em banho de gelo por 15 minutos. Transcorrido esse tempo, o cultivo foi centrifugado à 5000 x g por 10 minutos à 4 °C. O *pellet* formado foi ressuscitado em 125 mL de tampão I (Tris-HCl pH 7,5 10 mM, Cloreto de Cálcio 50 mM) e mantido em gelo por 15 min. Foi realizada novamente a etapa de centrifugação à 5000 x g por 10 minutos à 4 °C. Finalmente, o *pellet* foi ressuscitado em 3,5 mL de tampão II (Tris-HCl pH 7,5 10mM, Cloreto de Cálcio 10 mM e glicerol 15% (v/v)). A porção total de células foi dividida em alíquotas, congeladas em nitrogênio líquido e imediatamente estocadas à -80°C.

4.2.6. TRANSFORMAÇÃO EM *E. coli*

A inserção do vetor contendo o DNA de interesse (vetor clonado) em *E. coli* foi feita pela metodologia de *heat shock*. Uma fração de 200 µL das células competentes estocadas foram descongeladas em banho de gelo e homogeneizadas. Adicionou-se de 50 a 100 ng do vetor clonado e então a reação foi mantida em banho de gelo por 30 minutos, em ambiente estéril. Transcorridos os 30 minutos, a reação foi submetida ao choque térmico em banho maria à 42 °C por 40 segundos. Após esta etapa, as células foram imediatamente transferidas para o banho de gelo durante 2 minutos. Adicionou-se 1 mL de meio SOC (apêndice A) aos tubos e a suspensão de células transformadas foi incubada à 37 °C durante 1,5 horas sob agitação de 250 rpm. Alíquotas de 200 µL da suspensão foram inoculadas em placas de Petri contendo meio LB sólido (apêndice A), acrescido de 100 µg/mL de ampicilina e incubadas por 18 horas à 37 °C.

Para confirmação da presença do plasmídeo com o fragmento do DNA das endoglucanases de *G. trabeum*, as colônias resistentes à ampicilina (*amp*⁺) foram submetidas ao PCR de colônia. Foram coletadas 10 colônias que foram diluídas em 10 µL de água destilada estéril e 1µL desta suspensão foi utilizado na seguinte reação: 5 µL de tampão 10X de PCR (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 4 µL de

uma solução de dNTP 2,5 mM, 10 pmol de cada *primer* do vetor (*forward* e *reverse*), 1U de Taq polimerase (Fermentas®) e água para completar 50 µL de reação. A reação de PCR foi feita em termociclador *MyCycler* (Bio-Rad) nas seguintes condições:

Etapas	Temperatura	Tempo	
1	95 °C	5 min	
2	95 °C	45 seg	} 24 vezes
	50 °C	45 seg	
	72 °C	2 min e 30 seg	
3	72 °C	5 min	

O produto do PCR foi analisado em gel de agarose 1% (m/v) utilizando os marcadores "1 Kb *plus DNA Ladder* (Invitrogen)" como referência. A eletroforese foi realizada à 90 V por 1 hora.

4.2.7. EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL

Das colônias bacterianas com resultado positivo para a presença dos genes clonados, foi escolhida uma colônia positiva para cada gene de interesse e incubou-se, separadamente, em 5 mL de meio LB líquido (apêndice A) com 100 µg/mL de ampicilina durante 16 horas, à 250 rpm e 37 °C. Para a extração do DNA plasmidial das construções, os cultivos foram centrifugados à 3600 x g por 15 minutos. O *pellet* formado foi submetido à etapa de extração do DNA plasmidial utilizando o *kit Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification System* (Promega), seguindo as orientações do fabricante.

4.2.8. OBTENÇÃO DE PROTOPLASTOS DE *A. nidulans* A773

Inoculou-se aproximadamente 10⁶ esporos do mutante *Aspergillus nidulans* A773 em meio mínimo (descrito no item 4.1). O cultivo foi mantido sob agitação à 180 rpm, à 37 °C durante 18 horas e, após o período de incubação, a cultura foi filtrada em papel de filtro Whatman n°1 e lavou-se o micélio com MgSO₄ 0,6 M e em seguida com solução DSPS (KCl 1,1 M, ácido cítrico 0,1M, pH ajustado para 5,8 com KOH e esterilizado por filtração). A massa micelial foi transferida para um tubo de centrifuga de 50 mL estéril e adicionou-se 500 mg de *Lysing enzymes from Trichoderma harzianum* (Sigma L1412), 250 mg de *Lysozyme from Chicken Egg White* (Sigma L7651) e 5 mL da solução DSPS. A mistura foi incubada à 30°C, 100 rpm por aproximadamente 2 horas, até não haver mais presença visível de precipitados.

Os protoplastos foram recolhidos por filtração em membrana *Miracloth* (Calbiochem®) em funil de Buchner com sucção, coletados em tubo de centrifuga de 50 ml estéril e centrifugados à 3600 x g por 15 minutos. O *pellet* formado foi lavado duas vezes por centrifugação à 3600 x g por 15 minutos, com 45 ml de solução STC50 (sorbitol 1,2 M, Tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 7,5, autoclavado e mantido à 4 °C) para remoção das enzimas de protoplastização. Por fim, o precipitado foi ressuspensionado com 1 mL de STC50 (PUNT; VAN DEN HONDEL, 1992).

4.2.9. TRANSFORMAÇÃO EM *A. nidulans*

Para a transformação de *A. nidulans* A773 com os genes das proteínas GtGH5 e GtGH45, aproximadamente 5 µg do DNA plasmidial foram adicionados em um tubo estéril de 15 mL. O volume final foi ajustado para 100 µL com STC50 e adicionou-se 200 µL da suspensão contendo os protoplastos. A mistura foi incubada à temperatura ambiente por 20 minutos, em seguida adicionou-se 2 mL da solução PEG 60% (6 g de PEG 4000 em 5 ml de STC50). A solução de PEG 60% e a suspensão de foi agitada cuidadosamente e mantida à temperatura ambiente por 20 minutos. Após este período, adicionou-se 8 mL de STC50 e homogeneizou-se a mistura. Em seguida, 2 mL da mistura foi plaqueada em meio mínimo para recuperação de protoplastos (meio mínimo descrito no item 4.1 sem adição de uracila e uridina, acrescido de sorbitol 1,2 M). Incubou-se por 1 dia à 37 °C e após esse período as placas foram invertidas, permanecendo outras 24 horas nas mesmas condições de incubação e finalmente, obtendo-se os transformantes (TILBUNR, 1983).

A triagem e seleção dos melhores clones está descrita no item 4.4.

4.3. ANÁLISE FILOGENÉTICA

O trabalho de Igarashi et al. (2008) foi a base para a busca das sequências de amino-ácidos usados na construção da árvore filogenética. Deste trabalho foram obtidas as sequências de representantes de cada subfamília de GH45 (A, B e C), conforme descrito no item 2.7. Foi incluída também a sequência da GtGH45 e as sequências de proteínas que apresentaram maior homologia na análise utilizando o software BLASTP.

Com essas sequências em formato FASTA foi feito o alinhamento múltiplo no servidor MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>), optando-se por gerar um arquivo Pearson/FASTA. Esse arquivo foi utilizado na construção da árvore filogenética.

A construção da árvore foi feita pelo software MEGA 6.0 seguindo os seguintes parâmetros: método estatístico: Neighbor-joining; Teste de filogenia: alinhamento

Bootstrap; número de replicações: 1000; modelo: P-Distance e tratamento de falhas: Pairwise deletion.

4.4. SELEÇÃO DO CLONE COM MAIOR NÍVEL DE EXPRESSÃO

O processo de clonagem em organismos eucariotos não é trivial e por isso é esperada uma grande variabilidade quanto ao *locus* de integração no genoma e também diferenças no número de eventos integrativos (SEGATO et al., 2012). Assim, após a confirmação do evento de integração no genoma do organismo hospedeiro, fez-se uma triagem e seleção dos clones, visando selecionar a melhor linhagem com relação à eficiência de expressão e de secreção da proteína de interesse (DAMÁSIO et al., 2011). Para isso foram cultivados 9 clones que expressaram as proteínas GtGH5 ou GtGH45 em placas de Petri contendo meio líquido de expressão (apêndice A). O cultivo estacionário foi mantido à 37 °C por 2 dias. Após o período de incubação, os meios cultivados foram filtrados cuidadosamente em membrana *Miracloth* e o extrato enzimático foi analisado por eletroforese em SDS-PAGE 15% posteriormente corado com prata (apêndice A).

Os extratos enzimáticos também foram quantificados quanto ao teor de proteínas totais segundo a metodologia descrita por Bradford (1976). Os cálculos foram feitos com base na equação da reta obtida a partir da curva padrão com albumina de soro bovino (apêndice B) e a leitura feita em espectrofotômetro à 595 nm.

Foi feita uma avaliação prévia, semi quantitativa, da atividade enzimática dos extratos brutos, pois os extratos continham alta carga de açúcar (maltose), o que inviabilizava aplicar o método colorimétrico de DNS. Utilizou-se uma técnica que fornece dados basais rápidos e eficientes para *screening* dos clones, adaptado de Squina et al. (2009). Neste método, 0,5% de CMC de média viscosidade (Sigma C4888) e 0,8% de agarose foram dissolvidos em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 5,5 e vertidos em placas de Petri. Após a solidificação do ágar foram feitas perfurações nas quais adicionou-se 100 µL dos extratos enzimáticos brutos de GtGH5 ou GtGH45. A reação foi mantida à 55 °C por 16 h. Ao final da incubação, 10 mL de solução vermelho congo 0,1% em tampão Tris-HCl 50mM pH 8,0 foi vertida sobre o gel e a mistura incubada por 30 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, a solução corante foi retirada e realizou-se 2 lavagens de 15 minutos com NaOH 0,5 M, revelando as zonas de degradação (halos). Os diâmetros dos halos foram relacionados com a atividade enzimática.

4.5. CONFIRMAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE POLIPEPTÍDEOS AUTÊNTICOS NAS PROTEÍNAS A PARTIR DE ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A confirmação da expressão da GtGH45 e da GtGH5 por *A. nidulans* foi realizada a partir do emprego de espectrometria de massas. Essa etapa foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Igor Polikarpov no Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo e o pós-doutorando Dr. Marco Antônio Kadowaki.

Os extratos enzimáticos obtidos de cultivos de dois *A. nidulans* recombinantes (um para GtGH5 e outro para GtGH45) foram concentrados 20x em dispositivos de ultra filtração Vivaspin 20 (GE Healthcare) com membrana de corte de massa molar de 10 kDa. Os concentrados foram aplicados em SDS-PAGE 15% e posteriormente corado com azul brilhante de comassie (apêndice A). As bandas correspondentes à GtGH5 e à GtGH45 foram seccionadas e submetidas à digestão do gel com quimiotripsina SIGMA C6423 (20 ng/mL) (SHEVCHENKO et al., 1996). A solução resultante desse processo foi utilizada na preparação da amostra empregada para análise em espectrômetro de massas.

A preparação da amostra foi feita do seguinte modo: A amostra foi passada através de ponteiros ZipTip C18 (Milipore). Antes do uso, as ponteiros foram equilibradas por lavagem (três vezes) com 10 µL de solução de bicarbonato de amônio 50 mM. Com a resina da ponteira equilibrada, foi coletado um 1 µL da solução de proteína digerida com a quimiotripsina. Em seguida foram realizadas três novas lavagens com 10 µL de bicarbonato de amônio 50 mM. O material retido foi então eluído com 1 µL de solução 10 mg/mL de ácido α -ciano-4-hidroxi cinâmico. Essa solução foi aplicada sobre a placa de amostras e deixou-se secar à temperatura ambiente. Após seca, a amostra foi analisada utilizando o espectrofotômetro de massas *Microflex* LT MALDI-TOF (*Bruker Daltonics*).

Foram analisados fragmentos de polipeptídeos com razão massa molar/carga entre 400-300 m/z, no modo de íon-positivo. Para a atribuição das massas médias utilizou-se o software flexAnalysisTM do próprio equipamento. A identificação dos polipeptídeos foi feita com base na busca comparativa com o banco de dados BioToolsTM (*Bruker Daltonics*). A lista de polipeptídeos prováveis de detecção foi gerada *in silico* através de análise computacional simulando a digestão por quimiotripsina da sequência de amino-ácidos da proteína conforme descrito por Kadowaki et al. (2015).

4.6. CULTIVO DE *A. nidulans* RECOMBINANTES PARA IDENTIFICAR CONDIÇÕES QUE PERMITISSEM ELEVADA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DE INTERESSE

O nível de secreção e acumulação das proteínas de interesse foi avaliado em cultivos em meio de expressão (apêndice A) com concentrações de maltose de 0,5%, 2%, 5% e 8%. Os cultivos foram feitos com 25 mL de meio contidos em placa de Petri, inoculados com 10^6 esporos de *A. nidulans* recombinante, mantidos estacionários à 37 °C durante 1 a 4 dias. Os conteúdos dos cultivos foram filtrados em membrana *Miracloth* para remoção de micélio fúngico e os extratos enzimáticos foram analisados como descrito a seguir. Para mensuração das proteínas totais e revelação do perfil proteico em SDS-PAGE, o extrato bruto foi concentrado 20x em Vivaspín 500 (GE Healthcare) com membrana de 10 kDa.

Caracterizações empregadas:

- eletroforese com gel SDS-PAGE 15%, corado com azul brilhante de comassie;
- proteínas totais por Bradford, (1976);
- pH – o pH foi aferido imediatamente após a etapa de filtração do cultivo;
- açúcar redutor consumido segundo metodologia de Tanaka (1981): 50 µL ou 5 µL do extrato enzimático (dependendo do estágio de cultivo), 200 µL ou 245 µL de água destilada e 100 µL de DNS. A mistura foi fervida por 5 minutos e a leitura foi feita à 540 nm. O branco foi obtido substituindo-se o extrato enzimático por água destilada. O teor de açúcares redutores foi calculado com base na equação da reta obtida a partir da curva padrão com maltose (apêndice B);
- atividade de proteases – o ensaio enzimático de proteases foi realizado adaptando a metodologia de Bhoomika, Pyngrope e Dubey (2014), onde 0,25 mL de solução 2% de azocaseína (0,1 M Tris-HCl pH 8,4) foi incubada à 37 °C por 30 minutos na presença de 0,25 mL do extrato enzimático. A reação foi interrompida com a adição de 1,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% e mantida em banho de gelo por 10 minutos. Em seguida a mistura foi centrifugada por 15 minutos à 3600 x g. 1 mL do sobrenadante foi transferido para um tubo novo, adicionou-se 1,0 mL de NaOH 1 M e incubou-se por 30 minutos à temperatura ambiente e a leitura foi feita à 440 nm. O branco foi feito substituindo o extrato enzimático por água destilada.

4.7. PREPARAÇÃO DA PROTEÍNA DE INTERESSE

A cepa recombinante de *A. nidulans* (selecionada por produzir GtGH45) foi cultivada na condição ideal de expressão (5% de maltose por 3 dias). Ao término do período de incubação, o extrato bruto foi filtrado em membrana *Miracloth* para remoção do micélio. O extrato também foi infiltrado em filtro sinterizado Schot número 4, membrana PES Whatman (*GE Healthcare*) com porosidade de 0,8 µm e, posteriormente, em membrana PES (*Sartorius Stedim*) 0,45 µm para remoção de particulados. O volume total de extrato obtido foi concentrado em célula de ultrafiltração com agitação Amicon® (*Millipore*) à 10 °C, utilizando membrana Biomax® com corte de 10 kDa (*Millipore*). Os extratos concentrados foram dialisados empregando os mesmos dispositivos de ultrafiltração. Para isso, adicionou-se tampão fosfato de sódio 50 mM pH 5,5 e se procedeu a nova ultrafiltração. A diálise foi realizada para remover o resíduo de maltose presente no extrato.

O extrato concentrado por ultrafiltração contendo a GtGH45 foi injetado em uma coluna de troca iônica Resource Q de 1 mL (*GE Healthcare*) equilibrada com o mesmo tampão da proteína e acoplada ao sistema ÄKTA™ FPLC™ (*GE Healthcare*). Ao final do processo de injeção, a coluna foi lavada com 10 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 5,5. Posteriormente foi aplicado um gradiente de eluição feito com NaCl 1 M. O gradiente foi aplicado partindo de 0% de solução de NaCl até 100%, com fluxo constante de 0,5 ml/min. As frações coletadas (0,5 mL) foram usadas em ensaios de atividade enzimática com CMC 1% como substrato (50°C por 60 minutos) para determinar a presença da enzima de interesse. Uma alíquota de cada fração também foi analisada por eletroforese em SDS-PAGE 15% para a confirmação da presença da proteína de interesse. As frações que continham a proteína de interesse foram reunidas e a solução foi concentrada em Vivaspín 20 (*GE Healthcare*) com membrana de corte de 10kDa.

O extrato concentrado foi então aplicado em uma coluna de filtração em gel *Superdex 75 10/300 GL* (*GE Healthcare*) e eluído com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 5,5 a um fluxo de 0,5 mL/min coletando-se frações de 1,0 mL. As frações coletadas foram analisadas por eletroforese em SDS-PAGE 15%, posteriormente corado com azul brilhante de comassie.

4.8. DETERMINAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DA ENZIMA PURIFICADA

4.8.1. ESTABILIDADE TÉRMICA

A técnica de fluorimetria diferencial de varredura (DSF, do inglês *Differential Scanning Fluorimetry*) foi empregada para avaliar a estabilidade térmica da GtGH45 em solução. A técnica empregada considera que quando a proteína é termicamente desnaturada seu núcleo hidrofóbico é exposto e uma sonda presente na solução irá se ligar preferencialmente à essa região hidrofóbica. A sonda em questão emite fluorescência quando ligada à proteína e a fluorescência é detectada por um equipamento usualmente empregado para realizar "Real-Time PCR" (ERICSSON et al., 2006).

O ensaio em questão foi executado em colaboração com o Prof. Dr. Igor Polikarpov e a pós doutoranda Dra. Amanda Bernardes, do grupo de cristalografia e biologia molecular do Instituto de Física de São Carlos, USP. Foram testados 30 diferentes tampões com pH entre 1,2 e 10,0 na concentração final de 50 mM (apêndice C). As medidas foram acompanhadas no equipamento CFX96 *Real-Time System* (Bio-Rad), usando placa de PCR de parede fina com 96 poços e fita de vedação de qualidade óptica *MiniOpticon Real-Time PCR* (Bio-Rad). Em cada poço foi adicionado 30 µg de GtGH45 em solução com cada tampão ensaiado e solução do corante comercial *SYPRO Orange* diluído em tampão fosfato de sódio 50 mM (*Molecular Probes*). A temperatura aplicada na análise variou de 25 °C à 90 °C com aumento de 1 °C por minuto e mantida por 30 segundos para ser atingido o equilíbrio. A fluorescência foi lida em 530 nm empregando excitação em 490 nm. Para a determinação da temperatura de desenovelamento ("*melting*" temperature - T_m) utilizou-se o software *GraphPAAd Prism* (versão 5.0).

4.8.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE EM DIFERENTES SUBSTRATOS

Com o propósito de elucidar a especificidade da atividade catalítica da GtGH45 purificada, os polissacarídeos PASC, arabinoxilana e xilana de "*beechwood*" (*Megazyme* ou *Sigma Aldrich*) foram empregados como substratos modelo. Informações sobre os substratos utilizados estão apresentados na tabela 8. O meio reacional continha 1000 µL totais, sendo 500 µL de solução de cada substrato à 1% (m/v) e 150 µL da enzima (30 µg) e 350 µL de tampão citrato de sódio, pH4,8. O controle foi feito substituindo o volume de enzima por tampão. A mistura reacional ficou incubada por uma hora à 50 °C. Os açúcares redutores formados foram medidos com o método do DNS (MILLER, 1959) a partir de leitura em espectrofotômetro à 540 nm. Os dados de absorbância foram

empregados diretamente para se ter uma análise comparativa da atividade em diferentes substratos.

Tabela 7: Detalhamento dos substratos utilizados na determinação da especificidade da GtGH45. As informações foram obtidas em www.megazyme.com/.

Substrato	LIGAÇÃO	PUREZA	PROPORÇÃO DE AÇÚCARES	ORIGEM
PASC	β -1,4		-	Avicel digerido com ác. fosfórico
O-Me-GlucuronoXilana	β -1,4/ α -1,2 OMeGLUC subst.	99.9%	Xil:O-Me-Glucurônico 93:7	Beechwood MEGAZYME
Arabinoxilana	β -1,4/ α -1,2 e α -1,3 arabinosil subst.	90%	Xil:Ara 62: 38	Rye MEGAZYME

Fonte: Arquivo próprio.

4.8.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE EM FUNÇÃO DO pH DE REAÇÃO

O efeito do pH na reação da GtGH45 sobre o substrato CMC foi avaliado utilizando o tampão Mcllvaine com glicina (ácido cítrico 400mM, fostato de sódio 400 mM e glicina 400 mM) dentro da faixa de pH de 2,0 a 10,0. O sistema reacional consistia em 100 μ L de volume total, adicionando-se 50 μ L de CMC à 1%, 37,5 μ L do tampão com pH definido e 12,5 μ L de solução de GtGH45 em tampão fostato de sódio 0,05 M, pH 6,5 (20 μ g de proteína – a solução da enzima purificada foi concentrada 2x em Vivaspin 500 *GE Healthcare*). A mistura foi incubada à temperatura de 50 °C por 60 minutos. Neste caso foi adicionado 100 μ L de solução de DNS seguido de aquecimento à 100 °C por 5 minutos. Os açúcares redutores formados foram medidos com o método do DNS (MILLER, 1959) a partir de leitura em espectrofotômetro à 540 nm. Os dados de absorbância foram empregados diretamente para se ter uma análise comparativa da atividade em diferentes substratos.

4.9. ANÁLISE DE OLIGOSSACARÍDEOS FORMADOS EM REAÇÕES CATALIZADAS PELA GtGH45

A formação de oligossacarídeos foi monitorada durante uma reação entre GtGH45 e o substrato PASC (0,5 mL de suspensão à 2%) foi incubado com GtGH45 (10 μ g de proteína) dissolvida em tampão citrato de sódio 0,05 M pH 4,8. A mistura foi incubada à 40°C sob agitação (120 rpm) por tempos variáveis entre 1 e 120 min. A reação controle foi feita incubando somente PASC (GOURLAY et al., 2013) e solução tampão.

O produto de reação foi analisado por cromatografia de camada delgada em uma folha de sílica (TLC de sílica sobre com alumínio - *Macherey-Nagel*). As amostras foram eluídas com uma solução solvente contendo acetato de etila, ácido acético, isopropanol,

ácido fórmico e água (25:10:5:1:15 v/v). Após a eluição as placas foram secas com ar quente para evaporação completa dos solventes. Os produtos formados foram revelados com a aplicação da solução reveladora (40 mL de etanol, 4 mL de ácido sulfúrico e 35 mg N-(dihidrocloreto de 1- naftil etilenodiamina – Merck 106237) e incubação durante 5 min à 100°C (PUCHART; BIELY, 2008).

4.10. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SUBSTRATOS COMPLEXOS COM GtGH45

Com o intuito de avançarmos na compreensão da atividade enzimática da GtGH45, avaliamos seu potencial de hidrólise diretamente em biomassas lignocelulósicas. O primeiro substrato testado foi bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado pelo processo quimiotermomecânico que emprega sulfito alcalino (10 g de sulfito de sódio e 5 g de NaOH / 100 g de bagaço de cana) (MENDES et al., 2015). O material foi preparado pelo estudante de doutorando Omar Antônio Uyarte da EEL/USP. O segundo substrato testado foi medula de cana de açúcar obtida a partir de um híbrido experimental (H58) em condições idênticas às descritas por Costa et al. (2013).

Os dois substratos foram analisados quanto à composição química seguindo metodologia previamente descrita por Ferraz et al., 2000, sendo a composição descrita na tabela 9.

Tabela 8: Composição química do bagaço de cana de açúcar submetido ao tratamento com sulfito alcalino (10g Na₂SO₃ e 5 g de NaOH/100g bagaço) e da região medular da cana híbrido 58. Todos os valores estão baseados na massa seca inicial. .

	Glucanas	Xilanas	Lignina
Medula H58*	51,75	17,45	14,3
Sulfito Alcalino*	54,7	20,3	14,7

*dados não publicados, comunicação pessoal com Omar Uyarte e Thales Costa.

Nos ensaios de hidrólise enzimática foram empregados 20 mg do substrato lignocelulósico (peso seco) em um volume reacional de 1 mL (2% de consistência). A mistura continha as enzimas comerciais Celluclast e Novozym 188 (ambas comercializadas pela Sigma) e tampão acetato de sódio 50 mM em pH 4,8, contendo 0,01% de azida sódica. Foram feitos dois ensaios de hidrólise utilizando diferentes cargas das enzimas comerciais. Um grupo de ensaios empregou cargas de enzimas comerciais para proporcionar atividades enzimáticas no meio reacional correspondentes inicialmente a 10 FPU/g de substrato e 20 UI de β-glicosidase/g de substrato. O mesmo tipo de ensaio

também foi realizado com as cargas destas enzimas reduzida para 25% do valor inicial. As reações foram realizadas sob agitação de 120 rpm à 45 °C.

A proteína GtGH45 foi utilizada como enzima adicional em alguns ensaios e foi adicionada na proporção de 1 mg de proteína/20 mg de substrato. Uma reação controle foi realizada substituindo a GtGH45 por albumina de soro bovino (BSA) na mesma proporção usada para a GtGH45.

As reações de hidrólise foram amostradas nos tempos de 4, 8, 24, 48 e 72 horas, coletando 20 µl de cada reação. Para as coletas de amostras, os tubos reacionais foram previamente resfriados em banho de gelo e centrifugados à 3500 x g, 4 °C por 25 min, possibilitando a pipetagem do volume necessário. Após a coleta, os tubos foram novamente incubados nas mesmas condições iniciais.

A análise dos monossacarídeos liberados nas reações de hidrólise foi feita por HPLC (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) acoplado com coluna HPX 87H à 45°C, ácido sulfúrico 5 mM como fase móvel e com fluxo de 0,6 mL/min, utilizando um detector de índice de refração com temperatura controlada de 35°C.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA GtGH45 e GtGH5

A partir das sequências de peptídeos apresentadas por Cohen et al. (2005) e do estudo do genoma de *G. trabeum* foram obtidas as sequências completas das glicosil hidrolases avaliadas nesta dissertação (figura 10). Para a busca das sequências completas foi utilizado o programa BLAST no servidor Uniprot. Desta forma, identificamos uma endoglucanase GtGH5. Uma segunda glicosil hidrolase, GtGH45, de menor massa molar também despertou nosso interesse. Essa segunda proteína esta descrita como uma endoglucanase "*V-like*", com características de GH45. Os números de acesso das proteínas no GeneBank são P84194 e EPQ56593.1 para a GtGH5 e a GtGH45, respectivamente.

Figura 8: Sequência completa de amino-ácidos da P84194 (GtGH5) e EPQ56593 (GtGH45), sendo que os fragmento em azul correspondem ao peptídeo sinal e os fragmentos em negrito da GtGH5 apresentam homologia com os peptídeos descritos por Cohen et al. (2005). Os amino-ácidos em vermelho foram corrigidos dos fragmentos iniciais.

GtGH5
MFKALLSLAIVGVS AISARA AALSPRV TGPAPLKFAGVNIAGFD FGC GTDGTCTVSGAYPPLTQYYGADGAGQM QHFVNDDG YNLFRLPVGWQYL TNGVVG GTLNSTNFDKYDALVQA CLNTG AYCII DIHNYARWNGEIIGQGGPTNAQFAALWSSLATQYKSQ SHVMFGIMNEPHDLPSITTWAA TVQAAVTAIRNAGATSQYILLPGDNWTSAA TFVSGGSAAALATVTNPDGSTTNLIMDVHKYL DSDNSGT SNTCVTNNTVEAWEPLSVWLRANNRLAINTETGGGNTAS CV EYLCQQVAYQKTIADVFLGYVGWAAAGNFDTGYVL SETPDNGGTWTD TETVSSCLAPIANA
GtGH45
MVRISSVLSAAVVS LASGVLA LEERATGGYVQNPSGSASF TMYSGCGSPACGETASGYTAAMNQLSFGAGPGAGAGDACGR CFALTGTADPYSPSYTGP FHTIVVKVTDLCPVAGNQEWCGQTTSNPNNQHGEVPVHFDICEDTGGAGAFFPSGHGALTGTYRE VSCSQWSGSDGSPLWTGACLSGES AANWPSTACGNKG TAPS

Fonte: Arquivo próprio.

As sequências completas de amino-ácidos das duas proteínas foram submetidas à análise no servidor SignalP 4.1 (PETERSEN et al., 2011), onde a região referente ao peptídeo sinal de cada uma das proteínas foi identificada, indicando que as proteínas em questão são secretadas no meio extracelular. Além disso, a determinação *in silico* da posição dos peptídeos sinais (20 amino-ácidos para a GtGH5 e 21 amino-ácidos para a GtGH45) (figura 11) foi a base para o planejamento dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*).

Figura 9: Resultados da análise das sequências de amino-ácidos (A) GtGH5 e (B) GtGH45 pelo servidor SignalP 4.1, ilustrando as predições *in silico* das regiões do peptídeo sinal.

Fonte: Arquivo próprio.

Os *primers* foram desenhados para iniciar a amplificação das sequências de nucleotídeos na posição posterior aos peptídeos sinais. Dessa forma, a região do peptídeo sinal das proteínas não foi amplificada e utilizamos o peptídeo sinal contido no promotor *glaP* (*glucoamylase promoter*) do vetor *pEXPYR*.

O DNAg de *G. trabeum* ATCC 11539 foi extraído e a qualidade desta extração esta apresentada na figura 12A. Com o DNAg de qualidade e com o *primers* sintetizados foi feita a amplificação das sequências de interesse. O produto da amplificação dos fragmentos de 1450 pb e 600 pb, referentes à GH5 e GH45, respectivamente, foram observados e confirmados por eletroforese (figura 12). As bandas contendo os fragmentos de interesse foram excisadas do gel, purificadas e utilizadas na ligação com o vetor *pEXPYR* para posteriormente serem inseridas em *E coli* TOP10®.

Figura 10: Eletroforese em gel de agarose (A) confirmando o produto de extração do DNAg de *G. trabeum* e (B) mostrando produtos de PCR das sequências de interesse. (1) GtGH5 com 1450 pb e (2) GtGH45 com 600 pb amplificados a partir do DNAg. (M) marcador de pares de base nos dois géis (1kb ladder).

Fonte: Arquivo próprio.

Com a confirmação das amplificações das regiões gênicas de interesse, foi realizada a ligação com o vetor de expressão *pEXPYR* utilizando o sistema LIC-PCR e, posteriormente, foi feita a inserção do plasmídeo clonado em *E. coli* TOP10®. Para confirmação da presença do plasmídeo nas células bacterianas crescidas em meio sólido com ampicilina, foi realizado PCR de colônia de algumas colônias selecionadas, confirmado por análise de eletroforese (figura 13).

Figura 11: Eletroforese em gel de agarose apresentando os resultados dos PCRs de colônia para confirmação das cepas bacterianas positivas para a presença do material genético de interesse P84194 (GH5) e EPQ56593.1 (GtGH45), onde cada poço de aplicação do gel corresponde a uma colônia bacteriana

Fonte: Arquivo próprio.

Para a confirmação da inserção da sequência gênica completa e verificação de possíveis erros nas regiões codificantes, foi realizado o sequenciamento do DNA plasmidial. Para isso, foram selecionadas duas colônias bacterianas que apresentaram resultado positivo no PCR de colônia, tanto para a GH5 quanto para a GH45. Essa etapa foi feita em colaboração com a Dr. Juliana Velasco Oliveira e o Prof. Dr. André Damásio, pesquisadores do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) (Campinas/SP). Para isso utilizou-se o sequenciador ABI/Hitachi 3500 Genetic Analyzer e as amostras foram preparadas seguindo as especificações do CTBE. As sequências obtidas do sequenciamento foram utilizadas na análise pelo programa BLASTX, confirmando a transformação bacteriana com os genes que codificam as proteínas alvo (apêndice D).

O vetor transformado com gene de interesse, replicado e extraído da bactéria, foi utilizado para transformação de *A. nidulans* A773. Utilizou-se aproximadamente 3 µg de DNA plasmidial para a transformação em fungo. As transformações foram feitas separadamente afim de gerar recombinantes distintos de *A. nidulans* que produzissem GtGH5 ou GtGH45. O resultados da transformação do *A. nidulans* estão apresentandos no item 5.2.

Foram feitas análises de bioinformática na plataforma ExPAZy utilizando a ferramenta ProtParam (GASTEIGER et al., 2005). A massa molar estimada e o ponto isoelétrico das proteínas estão apresentados na tabela 10. As análises foram feitas utilizando as sequências de amino-ácidos maduras.

Tabela 9: Características das proteínas GtGH5 e GtGH45 obtidas por análise de bioinformática.

	Massa Molar (kDa)	pI teórico	Número de amino-ácidos	Coefficiente de extinção*
GtGH5	35,6	4,3	338	2,0
GtGH45	18,4	4,5	183	1,7

* para 280 nm, expresso em l/g.cm água como solvente a 28°C, com todas as cisteínas reduzidas.

Fonte: Arquivo próprio.

Também foram avaliados os possíveis sítios de glicosilação do tipo O- e N- ao longo da sequência da proteína madura utilizando os servidores NetNGlyc 1.0 Server (GUPTA; JUNG; BRUNAK, 2004) e NetOGlyc 4.0 Server (STEENTOFT et al., 2013). Para a GtGH45 o servidor NetNGlyc não apontou nenhum sítio de glicosilação, já o servidor NetOGlyc apontou quatro sítios potenciais. Para a GtGH5 foram apontados 6 sítios de glicosilação O- e 3 para N glicosilação (figura 14).

Figura 12: Diagrama esquematizando as glicosilações putativas das proteínas GtGH45e GtGH5. (A) Potenciais sítios de glicosilação da GtGH45, estando ausentes glicosilações do tipo N e havendo 4 sítios para glicosilação do tipo –O; (B) idem A, porém estimado para a proteína GtGH5, sendo que o servidor NetOGlyc apontou 6 sítios potenciais para glicosilação e o servidor NetNGlyc apontou 3 regiões.

Fonte: Arquivo próprio.

A presença de sítios de glicosilação em proteínas indica que, uma vez glicosilada, a proteína pode apresentar uma massa molar efetiva maior do que àquela prevista tomando como base somente a composição de amino-ácidos.

5.2. SELEÇÃO DOS CLONES COM MAIOR NÍVEL DE EXPRESSÃO

Quando o vetor é integrado ao genoma do hospedeiro, o resultado esperado é a super-expressão da enzima alvo a partir de indução por maltose (SEGATO et al., 2012). Como obtivemos vários transformantes de *A. nidulans* foi realizada a seleção dos clones com maior nível de expressão das proteínas de interesse. Os cultivos foram feitos em

meio de expressão com 3% de maltose e a identificação das proteínas secretadas foi feita por SDS-PAGE com base na similaridade da massa molar determinada experimentalmente com àquela prevista por bioinformática. Um exemplo de resultado obtido com a GtGH45 está mostrado na figura 15. A eletroforese indicou a presença de duas proteínas superexpressas de massa molar muito próximas à 18-19 KDa. A cepa original de *A. nidulans* não secretou nenhuma proteína nessa faixa de massa molar.

A massa molar observada para estas potenciais GtGH45 foi similar ao previsto por bioinformática (18,4 kDa) o que é coerente com o baixo número de potenciais sítios de glicosilação indicados para essa proteína. Já no caso da GtGH5 não foi possível avançar na análise das glicosilações, pois não foi observada uma banda diferenciada no SDS-PAGE indicando a superexpressão da enzima, como será discutido na sequência do trabalho.

Figura 13: Eletroforese em SDS-PAGE mostrando o as proteínas expressas pela cepa original de *A. nidulans* com o vetor de clonagem vazio e uma das cepas recombinantes que superexpressou a GtGH45. (M) Marcadores de massa molar; (A773) cepa de *A. nidulans* com o vetor de clonagem vazio e (GH45) cepa recombinante de *A. nidulans*.

Fonte: Arquivo próprio.

A concentração total de proteínas extracelulares determinada nos cultivos das cepas recombinantes de *A. nidulans* (figura 16A) e a atividade hidrolítica determinada seguindo o método semi-quantitativo descrito por Squina et al. (2009) (figura 16B) indicaram que vários dos clones para GtGH45 apresentaram uma banda de proteína super expressa na região de 18-19kDa, sendo que a mesma banda esteve ausente na cepa *A. nidulans* A773 com o vetor de clonagem vazio. Todos os clones para GtGH45 também proporcionaram a formação de halos no ensaio semi-quantitativo em CMC, o que sugere atividade hidrolítica desses extratos (figura 16B).

No caso dos clones para a GtGH5, a análise por eletroforese mostra que as cepas recombinantes secretam diversas proteínas, porém nenhuma delas foi expressa de forma intensa e diferenciada em relação à cepa original com o vetor de clonagem vazio (figura 16A). A proteína mais intensa observada na eletroforese (indicada na figura) apresentou massa molar de 26-28 kDa o que é significativamente menor do que a predição obtida pela análise de bioinformática (35,6 kDa) (tabela 10). Essa diferença poderia ser atribuída aos processos pós-transcricionais e traducionais, ou à proteólise da enzima GtGH5. Frente a estes resultados há uma evidência de que a transformação do gene que codifica esta proteína não foi bem sucedida ou que há problemas relacionados com a secreção da enzima íntegra.

Figura 14: (A) Eletroforese em SDS-PAGE mostrando o perfil das proteínas extracelulares de diferentes clones de *A. nidulans* transformados para secretar GtGH45 e GtGH5. (MW) Marcadores de massa molar; (Números nos canais) Diferentes clones obtidos; (A773) cepa de *A. nidulans* com o vetor de clonagem vazio. (B) Ensaio enzimático dos extratos de cultivo agindo sobre CMC e posteriormente corado com vermelho congo. (GtGH45 e GtGH5) indicam a proteína de interesse clonada; (Números) Diferentes clones obtidos.

Fonte: Arquivo próprio.

O teor de proteínas totais extracelulares detectados nos cultivos estão apresentados na tabela 11. Os dados indicam que a secreção e acumulação de proteínas nos cultivos dos clones para GtGH45 foi maior do que o observado para os clones para GtGH5.

Tabela 10: Monitoramento da concentração de proteínas extracelulares totais (mg/mL) nos cultivos das diferentes cepas de *A. nidulans* transformadas para secreção de GtGH5 e GtGH45. A escala de cores está relacionada com os teores de proteína, sendo que baixos valores estão associados com a cor amarela e altos teores com a cor azul escuro.

Clones	GtGH45	GtGH5
1	5.99	4.18
2	5.48	2.49
3	6.57	4.10
4	6.44	3.97
5	3.16	3.87
6	6.20	3.86
7	5.04	4.39
8	6.44	2.47
9	–	2.56

Fonte: Arquivo próprio.

A compilação dos dados apresentados na figura 16 e na tabela 11 permitiu selecionar a cepa n° 1 para estudos subsequentes da GtGH45 e a cepa n° 3 para a produção de GtGH5. Após a escolha dos clones em questão foi realizada a identificação das proteínas recombinantes empregando a técnica de digestão com proteases e análise de peptídeos por espectrometria de massas, conforme descrito no item 5.4.

5.3. CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTOMETRIA DE MASSAS

A identificação de proteínas por espectrometria de massas é um procedimento de grande relevância, pois possibilita que uma proteína seja identificada sem a necessidade do sequenciamento, utilizando a impressão digital do mapa peptídico (*peptide mass fingerprint*) (HENZEL; WATANABE; STULTS, 2003). Essa análise gera uma lista de polipeptídeos identificados em função da razão massa molar por carga (m/z) dos fragmentos. Os fragmentos para comparação são gerados *in silico* utilizando as sequências de amino-ácidos das proteínas previstas. Isso é possível, uma vez que, a clivagem das proteínas por tripsina ou quimiotripsina segue padrões pré-determinados. Dessa forma, pode se fazer a identificação da proteína em questão contra um banco de dados contendo várias proteínas ou mesmo contra a própria sequência (COTTRELL, 2011; HENZEL; WATANABE; STULTS, 2003; JAMES et al., 1993).

Os dados obtidos por MALDI-TOF/MS (figura 17) confirmaram a expressão da proteína GtGH45 em *A. nidulans*, uma vez que 25,7% da sequência prevista foi identificada nos polipeptídeos gerados, estando este valor dentro do limiar de confiabilidade de sobreposição que é de 20% (COTTRELL, 2011)

Figura 15: Indicação do procedimento de identificação da proteína GtGH45. (A) A banda mais intensa detectada por eletroforese na região de 18-19 kDa foi removida do gel e digerida com quimotripsina. (B) Os polipeptídeos gerados foram analisados por MALDI-TOF e identificados (fragmentos marcados em vermelho) por comparação com a sequência depositada no GenBank.

Fonte: Arquivo próprio.

A tentativa de identificação da GtGH5 por espectrometria de massas também foi conduzida empregando a proteína de massa molar 26-28 kDa expressa pelas cepas recombinantes. Contudo não houve confirmação da expressão heteróloga dessa proteína recombinante em *A. nidulans* A773, pois, os peptídeos identificados não corresponderam à proteína de interesse (dados não apresentados). Na tentativa de se expressar a GtGH5, o nosso grupo esta realizando novamente as etapas de clonagem, transformação em bactéria e fungo, para posteriormente expressá-la. No entanto, optou-se por dar continuidade à presente dissertação detalhando somente as características da GtGH45.

5.4. ANÁLISE FILOGENÉTICA

Para a classificação da proteína GtGH45, foi construída uma árvore filogenética (figura 18) com as sequências de amino-acidos descritas no trabalho de Igarashi et al. (2008) e com sequências que mostraram significância de alinhamento com a GtGH45 em uma busca utilizando o BLASTP. Essa análise foi realizada para avaliar o enquadramento da GtGH45 nas subfamílias descritas para as GHs45. A descrição atual de subfamílias aponta para a existência de subfamílias A, B e C.

Figura 16: Árvore filogenética de proteínas GH45. Estão apresentados os números de acesso das proteínas em bancos de dados públicos e também a identificação das espécies produtoras das enzimas, sendo que as 3 primeiras letras indicam o gênero e as 5 letras seguintes indicam a espécie. As cores mostram as divisões das subfamílias desse grupo de GHs e a seta indica a posição da proteína GtGH45 na árvore.

Fonte: Arquivo próprio.

Este resultado deixou claro que a proteína alvo GtGH45 ficou agrupada com as demais GH45 de basidiomicetos. Além disso, a posição da GtGH45 no mesmo *cluster* de *Phanerochaete chrysosporium* (PcGH45), um fungo de degradação branca, indica a importância evolutiva do gene que codifica esta proteína, que se manteve no genoma de fungos de degradação branca e parda.

Payne et al. (2015) discutem que a GH45 de *Mytilus edulis* (uma das poucas GH45 cuja estrutura foi estudada até o momento) apresenta maior similaridade com expansivas, SWOs e com as GHs45 da subfamília B, do que com as GHs45 da subfamília A. Diante disso, afim de observar a relação da GtGH45 com essas proteínas, foi feito o alinhamento da GtGH45 com um representante de cada subfamília (A, B e C), de SWO e de expansina (todas extraídas da árvore filogenéticas já apresentada) (figura 19). O alinhamento foi feito no software Geneious 4.8.5, sendo possível alinhar utilizando

os parâmetros pré definidos do MUSCLE, modificando apenas o número de alterações máximas para 8.

Figura 17: Alinhamento das sequências de amino-ácidos dos representantes das subfamílias A, B e C de GH45, SWO e expansina. Os organismos e os números de acesso das proteínas em bancos de dados estão padronizados. Depois do número de acesso esta a especificação à qual grupo a proteína pertence. Para *P. chrysosporium* foram anotados os amino-ácidos catalíticos (estrela vermelha) e os resíduos adjacentes, apontados como fundamentais para a atividade catalítica da GH45 em um estudo apresentado por Nakamura et al. (2015) que denominaram estes amino-ácidos de "Newton Cradle" numa alusão ao "caminho do próton" durante a hidrólise (marcações rosas) (ver também figura 5, página 40).

Fonte: Arquivo próprio.

A análise do alinhamento mostra que o resíduo do amino-ácido catalítico na posição 92 é conservado em todas as proteínas. Já o segundo amino-ácido catalítico na posição 114 é conservado na SWO, GH45subB e nas GH45subC, o que indica a similaridade entre essas subfamílias e a SWO. Além disso, quando observamos os outros 6 resíduos que estão envolvidos na catálise, apenas 1 é conservado na GH45subA (posição 105). Entre a GH45subC e GH45subB 3 resíduos estão conservados (96, 105 e 112). Entre a SWO e a GH45subC os 2 amino-ácidos catalíticos são conservados, assim como 4 resíduos adjacentes envolvidos na catálise. Com essas análises podemos sugerir que há um indício de maior similaridade da GH45subC com SWO, expansivas e com a GH45subB do que com a GH45subA.

A GH45 de *P. chrysosporium*, com estrutura tridimensional depositada no banco de dados do PDB apresentou 76% de similaridade com a GtGH45 (dados não apresentados). Também nota-se que todos os amino-ácidos catalíticos e todos os resíduos adjacentes reportados por Nakamura et al. (2015) como envolvidos no

mecanismo de ação da PcGH45 estão conservados na GtGH45. Esta similaridade sugere, mais uma vez, que estas GHs45 são relevantes para o metabolismo de celulose nos fungos em questão, pois foi conservada mesmo em organismos que divergem quanto ao modo de degradação da biomassa, sendo *P. chrysosporium* um fungo de decomposição branca e *G. trabeum* um fungo de decomposição parda.

5.5. CONDIÇÕES IDEAIS PARA A EXPRESSÃO DE GtGH45

Confirmada a expressão heteróloga da GtGH45, foram realizados alguns cultivos variando a concentração de maltose no meio a fim de determinar condições de maior expressão da enzima. Os cultivos foram monitorados quanto ao açúcar consumido, o pH, a atividade de proteases, o teor de proteínas extracelulares totais e o perfil proteico revelado por eletroforese em SDS-PAGE. Os cultivos foram feitos em meio líquido contidos em placas de Petri. A figura 20 mostra o crescimento da cepa recombinante em diferentes concentrações de maltose ao longo de 4 dias. Visualmente é constatada a diferença do desenvolvimento do clone, ficando o micélio mais adensado em função do tempo de cultivo e da concentração inicial do açúcar.

Figura 18: Desenvolvimento de *A. nidulans* com o inserto para expressão da GtGH45 nas diferentes condições de cultivo (tempo e concentração de maltose). Em amarelo estão as concentrações iniciais de maltose.

Fonte: Arquivo próprio.

Na figura 21 estão apresentadas as eletroforeses em SDS-PAGE e o gráfico da concentração de proteínas totais nos cultivos. Com 1 dia de incubação o teor de proteínas totais variou moderadamente entre as diferentes porcentagens de maltose, mas a banda correspondente à proteína de interesse não se intensificou. No 2º dia de incubação foi detectada uma banda proteica marcante em 18-19 kDa, porém com 0,5% de maltose houve a formação de uma segunda banda, possivelmente relacionada com a degradação de alguma proteína. Com 8% de maltose a banda em 18-19 kDa ainda apresentava intensidade fraca. No 3º dia foi detectada uma possível degradação da proteína de

interesse (banda entre 18-19 kDa, correspondente à GtGH45) em todas as concentrações de maltose, assim como um decréscimo no teor de proteínas totais. Ao final do 4º dia de incubação, o teor de proteínas totais voltou a crescer, mas a banda em 18-19 KDa não se tornou acentuada, sugerindo que proteases começaram a acumular no meio extracelular, o que foi confirmado experimentalmente (figura 22).

Figura 19: Relação da secreção da proteína com variação do tempo de incubação e da concentração de maltose. (A) extratos enzimáticos concentrados dos cultivos, aplicando 10 µg de proteínas totais em SDS-PAGE 15%; (B) proteínas totais (µg/µL) acumuladas no meio extracelular.

Fonte: Arquivo próprio.

O pH e a atividade de proteases estão apresentados na figura 22. A variação do pH nos cultivos com 0,5% de maltose não foi significativa, todavia em todos os demais cultivos houve a alcalinização do meio extracelular com o passar do tempo. Da mesma forma ocorreu um aumento na atividade de proteases ao longo do período de incubação. Com 8% de maltose houve um aumento significativo na atividade de proteases.

Figura 20: (A) Variação do pH dos meios de cultivo; (B) atividade de proteases no meio extracelular.

Fonte: Arquivo próprio.

O consumo de açúcar também foi quantificado e está apresentado na figura 23. No cultivo com 0,5% de maltose, o fungo não cresceu de maneira satisfatória e o açúcar foi completamente consumido entre o primeiro e o segundo dia de cultivo. Com 2%, o açúcar foi esgotado no 2º dia de cultivo. Com 5%, o açúcar foi completamente consumido no 4º dia, mas o maior consumo foi verificado entre o 1º e o 2º dia. O mesmo perfil ocorreu com 8% de maltose.

Figura 21: Perfil do esgotamento do açúcar disponível no meio extracelular com o decorrer do cultivo de *A. nidulans* recombinante para secretar GtGH45.

Fonte: Arquivo próprio.

Com esses dados foi possível estabelecer qual o tempo ideal de incubação e a porcentagem de maltose que propicia o maior acúmulo da GtGH45 no meio extracelular. Com o decorrer do tempo de incubação houve a alcalinização do meio e o aumento da atividade de proteases, coincidindo com a diminuição do açúcar disponível no meio. Houve também o aumento do teor total de proteínas, mas a banda correspondente à GtGH45 não se intensificou e ainda houve a formação de uma nova banda com massa molar menor. O aumento da atividade de proteases também pode ser justificado pelo esgotamento do açúcar, sendo que o organismo começa a produzir proteases para utilizar as proteínas extracelular como fonte de carbono e nitrogênio.

Observamos que no 2º dia de incubação com 5% de maltose a banda da GtGH45 era intensa, o teor de proteínas totais era elevado, ainda havia açúcar disponível e a atividade de proteases era baixa. Somente o pH já havia aumentado, porém o organismo ainda estava ativo e secretando a proteína de interesse. Dessa maneira, optamos por fazer cultivos subsequentes com tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5, afim de minimizar a variação do pH e desta forma, manter a incubação por 3 dias, pois ainda havia açúcar disponível para o consumo do fungo.

5.6. PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA GtGH45 RECOMBINANTE

Com a condição de cultivo padronizada, a escala de produção da GtGH45 foi ampliada e foram conduzidas as etapas de filtração, concentração, diálise e purificação da enzima. Como descrito no item 4.6, após a etapa de ultrafiltração e concentração, o extrato enzimático foi injetado em uma coluna de troca aniônica (Resource Q 1 mL) acoplada ao sistema AKTA Purifier (*GE Healthcare*) equilibrada com o mesmo tampão utilizado para a diálise. O gradiente de eluição foi feito até atingir 100% de NaCl (concentração 1 M). O cromatograma detectado pela absorção em 280 nm está mostrado na figura 24A. A atividade enzimática medida com CMC como substrato das respectivas frações está mostrada na Figura 24B e o perfil protéico revelado por eletroforese em SDS-PAGE de cada fração está mostrado na figura 24C.

Figura 22: (A) Cromatograma da purificação da GtGH45 em coluna de troca aniônica; (B) gráfico das atividades relativas das frações coletadas e (C) eletroforese em SDS-PAGE das frações coletadas. Os números anotados nos picos cromatográficos correspondem aos números indicados na eletroforese. Cada fração coletada corresponde a 1 ml.

Fonte: Arquivo próprio.

A proteína de interesse eluiu durante o processo de injeção mesmo estando com pH da solução ajustado para a proteína ficar carregada negativamente e adsorver na

coluna. Isso pode ser justificado em função da estrutura primária da proteína, sendo constituída por uma porcentagem significativa de amino-ácidos apolares, como alanina (11,5%), glicina (16,4%) e prolina (7,1%). Esses amino-ácidos apolares provavelmente prejudicam as interações entre os amino-ácidos polares (hidrofílicos) com a coluna e não permitiram que a enzima fosse adsorvida de maneira eficiente.

As frações que apresentaram simultaneamente atividade em CMC e uma banda próxima à 18,9 kDa foram reunidas. Esse extrato (volume total de 9 mL) foi concentrado em dispositivo de centrifugação Vivaspin com corte de 10 kDa (*GE Healthcare*) até um volume final de 2 mL e submetido à uma segunda etapa de purificação utilizando uma coluna de exclusão por tamanho, Superdex 75 (*GE Healthcare*).

Figura 23: (A) Cromatograma em gel Superdex 75 da fração contendo a proteína GtGH45 prépurificada por troca iônica; (B) Eletroforese em gel SDS-PAGE das frações coletadas.

Fonte: Arquivo próprio

A GtGH45 eluiu na região de baixa massa molar, conforme era esperado (fração 6), sendo que há uma segunda proteína de menor massa molar eluindo muito próximo (fração 5). Com base na medida de absorção em 280 nm da fração 6 e no coeficiente de extinção da GtGH45 calculou-se que a concentração da proteína recuperada correspondendo à 0.83 mg mL^{-1} (volume total de 2 mL). Esta solução foi empregada como fonte de GtGH45 purificada para a realização dos ensaios bioquímicos e para os testes de hidrólise de biomassa lignocelulósica subsequentes.

5.7. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E ATIVIDADE CATALÍTICA DA GtGH45

5.7.1. DESNATURAÇÃO TÉRMICA EM SOLUÇÃO EM DIFERENTES pHs

A manutenção ou não da estrutura enovelada da GtGH45 foi avaliada em diferentes pHs e temperaturas. Em algumas faixas de pH, mais de um tampão foi avaliado, pois o experimento também visou determinar um tampão adequado para uso nos processos de cristalização que permitirá um estudo futuro de caracterização estrutural feito por difratometria de raio-X em colaboração com o grupo de cristalografia do Prof. Dr. Igor Polikarpov do Instituto de Física de São Carlos, USP.

A técnica em estudo é denominada *Thermofluor* e emprega um equipamento de RT-PCR para aquecer uma solução da proteína até que ocorra a desnaturação (desenovelamento). Ao ter a estrutura alterada, a proteína deve expor amino-ácidos internos mais hidrofóbicos que então se ligam à uma sonda que, então, emite fluorescência. A fluorescência é detectada no equipamento de RT-PCR, sendo possível estabelecer até qual temperatura a proteína ainda se mantém enovelada e supostamente ativa (ERICSSON et al., 2006). A figura 26, apresenta o dados da análise obtida pela técnica *Thermofluor*. O eixo indicado como temperatura de "fusão" mostra em qual temperatura ocorreu a desnaturação térmica da proteína. No eixo com valores de pH estão indicados, além do pH de cada ensaio, também o tampão empregado. Barras verdes foram usadas para indicar que em um dado pH, houve um tampão que proporcionou maior estabilidade térmica à proteína.

Na faixa de pH 2 a 10, a proteína mantém sua estrutura enovelada em temperaturas sempre superiores à 45 °C. A tendência geral dos dados indica que a maior estabilidade térmica ocorre na faixa de pH entre 5,5 e 9,5, sendo que, nesta faixa, a estrutura protéica se manteve enovelada em temperaturas acima de 65 °C. A menor estabilidade térmica foi observada nos pHs abaixo de 5,5. Os tampões que asseguraram maior estabilidade térmica foram o fosfato e o ABF (tampão acetato-borato-fosfato), nos pHs entre 5,5 e 7,5.

Figura 24: Temperatura de desenovelamento da GtGH45 em diferentes pHs e condições tamponantes. Os dados foram obtidos a partir da técnica *Thermofluor* que detecta a proteína na forma desenovelada com o auxílio de uma sonda fluorescente.

Fonte: Arquivo próprio.

Para a cristalização da proteína, o tampão deve ser capaz de proporcionar estabilidade e minimizar a formação de agregados e de precipitados (ERICSSON et al., 2006). Os pHs e soluções tampão que proporcionam os maiores valores de T_f na técnica "Thermofluor" são aqueles mais indicados para preservar a proteína em solução homogênea por mais tempo. À vista disso, o pH e solução tampão que apresentaram melhor estabilização da estrutura da GtGH45 foi fosfato de sódio 0,05 M em pH 5,5, tendo sido a solução indicada para dar prosseguimento nos estudos de cristalização e determinação estrutural da GtGH45.

5.7.2. ATIVIDADE CATALÍTICA DA GtGH45

A especificidade catalítica da GtGH45 foi investigada frente a reação de hidrólise de xilana de "beechwood", arabinoxilana de trigo e PASC. Duas enzimas purificadas obtidas na Megazyme foram empregadas para estudo comparativo das atividades, sendo uma endoglucanase proveniente de *Talaromyces emersonii* (GH5) e uma xilanase proveniente de *Celvirio mixtus* (GH10). Os ensaios de atividade foram realizados com uma carga de proteína em solução correspondente à 30 µg/ml. Os dados mostrando a formação de açúcares redutores após 1 h de reação com cada substrato estão mostrados na tabela 12.

Tabela 11: Hidrólise de diferentes polissacarídeos catalisada por GtGH45. A escala de cores varia do amarelo mais claro para menor atividade até laranja mais escuro para maior atividade. Reação feita à 50 °C durante 1 hora em pH 4.8.

Substrato	Absorbância em 540 nm		
	GtGH45	EG	Xilanase
PASC	0.18	1.29	0.06
Xilana de <i>Beechwood</i>	0.27*	ND	1.67
Arabinosilana	0.97	0.02	0.02

*ensaio feito com metade da carga de proteína, com a absorbância multiplicada por 2 para ser possível a comparação; ND: não determinado.

Fonte: Arquivo próprio.

A GtGH45 apresentou atividade em PASC, o que é característico de endoglucanases, porém também mostrou atividade atipicamente elevada em hemiceluloses como a xilana de *beechwood* e arabinosilana de trigo. A atividade em xilana de *beechwood* (uma madeira de angiosperma) indica que a GtGH45 hidrolisa ligações β -1-4 indistintamente em estruturas polissacarídicas de hexoses (presentes em PASC) e pentoses (presentes na xilana). A xilana de *beechwood* apresenta poucas ramificações α -1,2 com ácido metil-glucurônico (proporção Xil:OMeGlu 97:3, segundo o fabricante Magazyme), sendo que este padrão de ramificação parece não afetar a capacidade hidrolítica da enzima. A hidrólise extensiva de arabinosilana de trigo causada pela GtGH45 representa um resultado de atividade diferenciada em hemiceluloses com elevado grau de ramificação, pois a arabinosilana em questão apresenta uma proporção Xyl:Ara de 62:38, sendo as ramificações do tipo α -1,2 e α -1,3 (informações do fabricante Magazyme). Este padrão hidrolítico difere de resultados apresentados por Vlasenko et al. (2010) para GHs45 provenientes de diversos organismos, pois a maior parte das GHs45 foram essencialmente inativas em xilana e arabinosilana.

A EG de *T. emersonii* empregada como referência apresentou uma atividade típica de endoglucanase, com atividade cerca de 7 vezes mais elevada em PASC do que a observada na GtGH45, comparadas numa mesma carga de proteína. No caso da xilanase de referência (de *C. mixtus*) houve atividade marcante em xilana de *beechwood* e baixa atividade nos demais substratos. Numa mesma carga de proteína, a comparação dos dados mostra que a xilanase de *C. mixtus* foi 7 vezes mais ativa do que a GtGH45.

O padrão de atividade hidrolítica da GtGH45 demonstra que a enzima apresenta um comportamento atípico, diferindo de EG convencionais como a de *T. emersonii*, bem como diferindo de uma xilanase, pois atua de forma expressiva em substratos com elevado grau de ramificação.

5.7.3. OLIGOSSACARÍDEOS GERADOS DURANTE A HIDRÓLISE DE PASC POR GtGH45

A formação dos produtos gerados pela catálise da GtGH45 utilizando PASC como substrato foi monitorada por TLC ao longo de 120 min. (figura 29).

Figura 25: TLC dos produtos gerados na hidrólise de PASC catalisada por GtGH45. Marcadores de celo-oligossacarídeos com DP 1 à 6 (M); sobrenadantes da reação com GtGH45 após 1 min (1), 60 min (2) e 120 min (3) de reação; Controles sem a presença de GtGH45 após 1 min (4), 60 min (5) e 120 min (6) de incubação; Solução controle contendo GtGH45 (E).

Fonte: Arquivo próprio

É possível notar que os *spots* correspondentes à celotetraose e celopentaose são intensos e, portanto, são estes os oligômeros produzidos em maiores quantidades pela ação de GtGH45 sobre PASC. Esse padrão de clivagem da GtGH45 segue o mesmo apresentado pela GH45 de *P. chrysosporium* reportada por Nakamura et al. (2015). Nesse trabalho os autores reportam a formação de β - e α -celo-oligômeros devido ao mecanismo de inversão utilizado pela PcGH45, com maior geração de celotetraose e celopentaose. Possivelmente, a GtGH45 também gere β e α celo-oligômeros, porém, para conclusão final dessa hipótese são necessárias análises em HPLC para separação e identificação dos oligossacarídeos gerados.

5.7.4. pH ÓTIMO

Foi avaliada a influência do pH na atividade hidrolítica da GtGH45 purificada (figura 28). As atividades foram mais elevadas em pHs ácidos (entre 2,5 e 4,0),

apresentando um decréscimo em pH 7,0 (aproximadamente 40% da atividade máxima) e praticamente nula em pH 8,0.

Figura 26: Efeito do pH na atividade enzimática em CMC da GtGH45 em termos de atividade relativa. A linha tracejada mostra a tendência de atividade influenciada pelo pH

Fonte: Arquivo próprio.

Uma característica marcante das enzimas hidrolíticas de fungos de degradação parda é apresentar atividade elevada em pHs entre 4,0 e 5,0 (BALDRIAN; VENDULA, 2008), o que condiz com nossos resultados. Além disso, o pH ótimo da GtGH45 corrobora com o resultado apresentado por Nakamura et al. (2015), no qual 3,0 foi o pH ótimo para a GH45 de *P. chrysosporium* (PcGH45).

5.8. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO PRÉ-TRATADO COM SULFITO ALCALINO E DE MEDULA DE CANA AUXILIADAS POR GtGH45.

Afim de avaliar a atuação da GtGH45 na sacarificação da biomassa vegetal lignificada, foram conduzidos ensaios de hidrólise enzimática utilizando bagaço de cana pré tratado com sulfito alcalino e medula de cana proveniente de um híbrido com baixo teor de lignina.

Os ensaios de hidrólise foram feitos em dois cenários diferentes. Um deles empregando uma elevada carga de enzimas comerciais (Cellulases de *T. reesei* a 10 FPU/g de substrato e β -glicosidase de *A. niger* a 15 UI/g de substrato) suplementada com 50 mg de GtGH45/g de substrato. No outro cenário, a carga de enzimas comerciais foi diminuída à um quarto da carga original (2,5 FPU/g e 3,75 UI de β -glicosidase/g), mantendo a suplementação com 50 mg de GtGH45/g de substrato. Ensaios de referência foram realizados substituindo a suplementação de GtGH45 por uma proteína inerte (BSA)

empregando igual carga proteica. Os dados para conversão de celulose e xilana na hidrólise de bagaço pré tratado com sulfito alcalino estão mostrados na figura 30.

Observamos que no cenário com carga elevada de enzimas comerciais a conversão de celulose atingiu $89 \pm 10\%$ e $87 \pm 10\%$ nos ensaios não suplementados e suplementados com BSA, respectivamente. Na reação suplementada com GtGH45 a conversão de celulose atingiu $94 \pm 8,6\%$ de conversão.

No cenário que empregou uma carga reduzida de enzimas comerciais, a reação suplementada com GtGH45 proporcionou elevados níveis de conversão de celulose, atingindo $75 \pm 1,7\%$. Nas mesmas condições, as reações que empregam somente enzimas comerciais e a referência com suplementação de BSA, proporcionaram conversões de celulose de $68 \pm 2,9\%$ e $63 \pm 3,5\%$, respectivamente (figura 30C). Com a redução da carga de enzimas comerciais foi possível notar de maneira mais evidente a ação cooperativa da GtGH45 na porcentagem final de conversão de celulose.

Figura 27: Gráficos com as porcentagens conversão dos polissacarídeos da hidrólise do bagaço de cana pré tratado com sulfito alcalino. (A) conversão de celulose com carga completa de enzimas comerciais; (B) conversão de xilana com carga completa de enzimas comerciais; (C) conversão de celulose com carga reduzida de enzimas comerciais e (D) conversão de xilana com carga reduzida de enzimas comerciais. ■ suplementada com GtGH45; ■ suplementada com BSA e ■ somente com as enzimas comerciais.

Fonte: Arquivo próprio.

A conversão de xilana observada nos mesmos experimento (figura 30B e 30D) seguiu o mesmo perfil da conversão de celulose, sugerindo que atividade da GtGH45 em hemicelulose também beneficiou a conversão deste polissacarídeos no substrato pré-tratado.

Na hidrólise de medula de cana (figura 31), a conversão de celulose com carga total de enzimas comerciais não apresentou diferença significativa entre as reações suplementadas com GtGH45 ($65 \pm 5,3\%$), com BSA ($70 \pm 11,8\%$) e sem suplementação ($67 \pm 4,5\%$). Mesmo com velocidade inicial de conversão inferior aos demais ensaios, a hidrólise suplementada com GtGH45 atingiu, praticamente, a mesma porcentagem de conversão final observada nos demais ensaios. O mesmo ocorreu nas hidrólises com baixa carga de enzimas, não sendo possível observar uma possível ação cooperativa da GtGH45 na desconstrução de um substrato mais rico em lignina que não passou por pré-tratamento.

Figura 28: gráficos com as porcentagens conversão de celulose de polissacarídeos resultantes da hidrólise da medula de cana. (A) conversão de celulose com carga completa de enzimas comerciais; (B) conversão de xilana com carga completa de enzimas comerciais; (C) conversão de celulose com carga reduzida de enzimas comerciais e (D) conversão de xilana com carga reduzida de enzimas comerciais.

■ suplementada com GtGH45; ■ suplementada com BSA e ■ somente com as enzimas comerciais.

Fonte: Arquivo próprio.

A conversão de xilana da medula de cana-de-açúcar seguiu o mesmo padrão de conversão da celulose, como demonstrado na figura 31. Não foram observadas variações significativas de conversão de xilose nos ensaios com as diferentes cargas enzimáticas e suplementações.

Comparando os resultados obtidos na hidrólise de bagaço pré-tratado com sulfito alcalino com os resultados da hidrólise de medula de cana, fica evidente a melhor atuação da GtGH45 no primeiro substrato. Essa diferença pode ser atribuída à lignina do bagaço pré-tratado estar sulfonada e carregada negativamente (MENDES et al., 2015). A medula de cana é um substrato mais complexo, no qual a lignina não sofreu nenhum tipo de modificação e talvez por isso a GtGH45 não teve um desempenho significativo nesse substrato.

Todavia, a pequena diferença observada nos ensaios suplementados com GtGH45 e os com BSA dificulta atribuir à GtGH45 uma atividade cooperativa expressiva com as celulasas comerciais empregadas nos experimentos. Serão necessários ensaios de hidrólise enzimática com as celulasas presentes nos coquetéis isoladas e purificadas, afim de compreender de maneira detalhada a atuação da GtGH45.

6. CONCLUSÕES

Este trabalho teve como principal objetivo clonar e expressar duas glicosil hidrolases provenientes do basidiomiceto *Gloeophyllum trabeum* (GtGH5 e GtGH45). Ambas proteínas estão descritas como endoglucanases no banco de dados do CAZy.

A clonagem da GtGH5 em *A. nidulans* A773 não foi bem sucedida pois não foram identificados peptídeos na caracterização por espectrometria de massas. Assim como não foi observada a formação de uma banda diferenciada da cepa A773 (com o vetor de clonagem vazio). Nosso grupo refez as etapas de clonagem e transformação em bactéria e em fungo mas ainda não temos os resultados destes novos clones.

Todavia, tivemos sucesso na clonagem, transformação e expressão da proteína GH45. O extrato enzimático obtido do cultivo do *A. nidulans* transformado com a sequência genética da GtGH45 teve seu perfil proteico revelado em eletroforese de SDS-PAGE e quando comparado com a cepa de *A. nidulans* A773 (cepa com o vetor de clonagem vazio), apresentou uma banda diferenciada. Essa enzima foi expressa em níveis considerados altos e sua identidade foi confirmada por espectrometria de massas. Essa proteína foi purificada e submetida a mais experimentos buscando elucidar o seu funcionamento.

Como resultado do ensaio da determinação do pH ótimo da enzima, observamos que a GtGH45 apresentou maior atividade catalítica na faixa de pH 2,5 à 4,5. Isso indica que a GtGH45 tem preferência por atuar em ambiente ácido, sendo essa uma características esperada das GHs de basidiomicetos. A GtGH45 apresentou maior estabilidade térmica ocorre na faixa de pH entre 5,5 e 9,5, sendo que, nesta faixa, a estrutura protéica se manteve enovelada em temperaturas acima de 65 °C.

A GtGH45 foi capaz de gerar celo-oligômeros a partir do PASC (observado em TLC) e apresentou o mesmo padrão de clivagem da GH45 de *P. chrysosporium*. Os resultados obtidos na determinação da especificidade da GtGH45 demonstraram que essa proteína possui atividade diferente das demais GH45s já estudadas, as quais eram essencialmente inativas em substratos hemicelulósicos. A GtGH45 teve maior atividade em arabinoxilana e xilana.

A suplementação de coquetéis enzimáticos comerciais com a GtGH45 possibilitou uma relativa melhora na conversão da xilana e da celulose de bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino. Essa melhora é mais perceptível nas hidrólises com carga de enzimas comerciais reduzida. Já a conversão de açúcares na hidrólise de medula de cana, não apresentou melhora quando adicionada a GtGH45. Este trabalho teve como principal objetivo clonar e expressar duas glicosil hidrolases provenientes do basidiomiceto

Gloeophyllum trabeum (GtGH5 e GtGH45). Ambas proteínas estão descritas como endoglucanases no banco de dados do CAZy.

7. PERSPECTIVAS

Um estudo mais completo das características da GtGH45, bem como atribuir a ela sinergismo com outras celulasas, contaria com as seguintes propostas:

- Realizar experimentos para avaliar se as mesmas condições de termo estabilidade da GtGH45 apontadas pelo *Thermoflour* se mantem quando colocamos a enzimas na presença de substrato;
- Determinar a temperatura ótima de catálise;
- Caracterizar cineticamente a GtGH45;
- Analisar se a ação da GtGH45 em CMC é capaz de reduzir a viscosidade do substrato CMC (característica de SWOs);
- Investigar a atividade de inversão da GtGH45 na formação de cello-oligossacarídeos (formação de β e α oligos);
- Determinar o sinergismo em ensaios de hidrólise de polissacarídeos complexos com CBHs e outras EGs comerciais isoladas.
- Determinação da estrutura tridimensional da GtGH45;

8. REFERÊNCIAS

- ADSUL, M. G. et al. Development of biocatalysts for production of commodity chemicals from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 6, p. 4304–4312, 2011.
- ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851–4861, 2010.
- AMORIM, H. V. et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, p. 1267–1275, 2011.
- ANDBERG, M.; PENTTILÄ, M.; SALOHEIMO, M. Swollenin from *Trichoderma reesei* exhibits hydrolytic activity against cellulosic substrates with features of both endoglucanases and cellobiohydrolases. **Bioresource Technology**, v. 181, p. 105–113, 2015.
- ARANTES, V.; JELLISON, J.; GOODELL, B. Peculiarities of brown-rot fungi and biochemical Fenton reaction with regard to their potential as a model for bioprocessing biomass. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 94, p. 323–338, 2012.
- ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for biofuels**, v. 3, p. 1–11, 2010.
- ASLANIDIS, C.; JONG, P. J. DE. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-POR). **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 20, p. 6069–6074, 1990.
- ASPEBORG, H. et al. Evolution, substrate specificity and subfamily classification of glycoside hydrolase family 5 (GH5). **BMC Evolutionary Biology**, v. 12, n. 1, p. 186–202, 2012.
- BALDRIAN, P.; VENDULA, V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. **FEMS Microbiol Lett**, v. 32, p. 501–521, 2008.
- BHOOMIKA, K.; PYNGROPE, S.; DUBEY, R. S. Effect of aluminum on protein oxidation, non-protein thiols and protease activity in seedlings of rice cultivars differing in aluminum tolerance. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, n. 7, p. 497–508, 2014.
- BINDER, J. B.; RAINES, R. T. Fermentable sugars by chemical hydrolysis of biomass. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 10, p. 4516–4521, 2010.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- CANNELLA, D. et al. Production and effect of aldonic acids during enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high dry matter content. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 26, p. 1–10, 2012.
- COHEN, R. et al. Processive endoglucanase active in crystalline cellulose hydrolysis by the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 5, n. 71, p. 2112–2417, 2005.
- COSTA, T. H. F. et al. The enzymatic recalcitrance of internodes of sugar cane hybrids with contrasting lignin contents. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 202–211, 2013.
- COTTRELL, J. S. Protein identification using MS / MS data. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 10, p. 1842–1851, 2011.
- DAMÁSIO, A. R. D. L. et al. Heterologous expression of an *Aspergillus niger* xylanase GH11 in *Aspergillus nidulans* and its characterization and application. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1236–1242, 2011.
- DASHTBAN, M. et al. Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. **Critical reviews in biotechnology**, v. 30, p. 302–309, 2010.

DAVIES, G.; HENRISSAT, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure**, v. 3, p. 853–859, 1995.

DEL RIO J. C., et al. Differences in the chemical structure of the lignins from sugarcane bagasse and straw. **Biomass and Bioenergy**, v. 81, p. 322 - 338, 2015.

DIAS, M. O. D. S. et al. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**, v. 15, p. 35–51, 2015.

EASTWOOD, D. C. et al. The plant cell wall-decomposing machinery underlies the functional diversity of forest fungi. **Science**, v. 333, p. 762–765, 2011.

EIA. Annual Energy Outlook 2015. 2015. Disponível em: <[http://www.eia.gov/forecasts/aeo/pdf/0383\(2015\).pdf](http://www.eia.gov/forecasts/aeo/pdf/0383(2015).pdf)>. Acesso em 23/11/2015

EIA. Annual Energy Outlook 2015. 2014. Disponível em: <[http://www.eia.gov/forecasts/aeo/pdf/0383\(2014\).pdf](http://www.eia.gov/forecasts/aeo/pdf/0383(2014).pdf)>. Acesso em: 12/07/2014

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

FLOUDAS, D. et al. The Paleozoic Origin of Enzymatic Lignin Decomposition from 31 Fungal Genomes. **Science**, v. 336, n. June, p. 1715–1719, 2012.

FERRAZ, A. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia, In: Espósito, A. **Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos**. Caixas do Sul, EDUCS, cap,6 p, 215-242, 2004.

GASTEIGER, E. et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. **The Proteomics Protocols Handbook**, v. 52, p. 571–607, 2005.

GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuels industry. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, p. 1–7, 2008.

GOODELL, B. et al. Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood. **J Biotechnol**, v. 53, 1997.

GLOULAY, K. et al. Swollenin aids in the amorphogenesis step during the enzymatic hydrolysis of pretreated biomass. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 498 - 503, 2013.

GUPTA; JUNG; BRUNACK 2004 NETNGLYC

HAMMEL, K. E. et al. Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. **Enzyme Microbial Technol**, v. 30, p. 445–453, 2002.

HANNIG, G.; MAKRIDES, S. C. Strategies for optimizing heterologous protein expression in Escherichia coli. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 54–60, 1998.

HARRIS, P. V et al. Stimulation of Lignocellulosic Biomass Hydrolysis by Proteins of Glycoside Hydrolase Family 61 : Structure and Function of a Large , Enigmatic Family †. **Biochemistry**, v. 49, p. 3305–3316, 2010.

HARRIS, P. V et al. New enzyme insights drive advances in commercial ethanol production. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 19, p. 162–170, 2014.

HENRIKSSON, G.; LENNHOLM, H. Hemicellulose In: EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. **Pulp and Paper Chemistry and Technology** . Stockholm. Deutsche Nationalbibliothek. v. 1, cap. 4, p. 72 - 99., 2009.

HENRIKSSON, G. Lignina. In: In: EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. **Pulp and Paper Chemistry and Technology** . Stockholm. Deutsche Nationalbibliothek. v. 1, cap. 6, p. 121 - 145., 2009.

HENZEL, W. J.; WATANABE, C.; STULTS, J. T. Protein Identification: The Origins of Peptide Mass Fingerprinting. **American Society for Mass Spectrometry**, v. 0305, n. 03, p. 931–042, 2003.

HIRVONEN, M.; PAPAGEORGIOU, A. C. Crystal structure of a family 45 endoglucanase from *Melanocarpus albomyces*: Mechanistic implications based on the free and cellobiose-bound forms. **Journal of Molecular Biology**, v. 329, n. 3, p. 403–410, 2003.

HO, D. P.; NGO, H. H.; GUO, W. A mini review on renewable sources for biofuel. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 742–749, 2014.

HORN, S. J. et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 45, n. 5, p. 1–12, 2012.

HU, J.; ARANTES, V.; PRIBOWO, A. Substrate factors that influence the synergistic interaction of AA9 and cellulases during the enzymatic hydrolysis of biomass. **Energy & Environmental Science**, v. 7, p. 2308–2315, 2014.

IGARASHI, K. et al. Characterization of an endoglucanase belonging to a new subfamily of glycoside hydrolase family 45 of the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 18, p. 5628–5634, 2008.

INOUE et. Preparation and transformation of ultra competent *E. coli* cells. **Gene**, v. 96, p. 23–28, 1990.

JAMES, P. et al. Protein identification by mass profile fingerprinting. **biochemical and biophysical research communications**, v. 195, p. 58–64, 1993.

JENSEN, K. A. et al. Pathways for Extracellular Fenton Chemistry in the Brown Rot Basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2705–2711, 2001.

JONKER, J. G. G. . et al. Outlook for ethanol production cost in Brazil up to 2030, for different biomass crops and industrial technologies. **Applied Energy**, v. 147, p. 593–610, 2014.

KADOWAKI, M. A. S. . et al. Functional characterization and low-resolution structure of an endoglucanase cel45a from the filamentous fungus *Neurospora crassa* OR74A: thermostable enzyme with high activity toward lichenan and β -glucan. **Molecular Biotechnology**, n. 57, p. 574–588, 2015.

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

KEREM, Z.; JENSEN, K. A.; HAMMEL, K. E. Biodegradative mechanism of the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*: evidence for an extracellular hydroquinone-driven fenton reaction. **FEBS Letters**, v. 446, n. 1, p. 49–54, 1999.

KIM, M. H. et al. Characteristics of bifunctional acidic endoglucanase (Cel5B) from *Gloeophyllum trabeum*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 1081–1089, 2012.

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

KOENIGS, J. W. Production of hydrogen peroxide by wood-rotting fungi in wood and its correlation with weight loss, depolymerization, and pH changes. **Archives of Microbiology**, v. 99, n. 1, p. 129–145, 1974.

LEITE, D. C. et al. Can Brazil replace 5 % of the 2025 gasoline world demand with ethanol ? **Energy**, v. 34, p. 655–661, 2009.

LEVASSEUR, A. et al. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. **Biotechnology for biofuels**, v. 41, p. 1–14, 2013.

MANSFIELD, S. D.; SADDLER, J. N.; GUBITZ, G. M. Characterization of endoglucanases from the brown rot fungi *Gloeophyllum sepiarium* and *Gloeophyllum trabeum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 0229, n. 98, p. 133–140, 1998.

MENDES, F. M. et al. Topochemical characterization of sugar cane pretreated with alkaline sulfite. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 60–67, 2015.

MEYER, V. et al. Fungal gene expression on demand: an inducible, tunable, and metabolism-independent expression system for *Aspergillus niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 9, p. 2975–2983, 2011.

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

MISHRA, N. C.; TATUM, E. L. Non-Mendelian inheritance of DNA-induced inositol independence in *Neurospora*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 12, p. 3875–3879, 1973.

NAKAMURA, A. et al. “Newton ’ s cradle ” proton relay with amide – imidic acid tautomerization in inverting cellulase visualized by neutron crystallography. **Science Advances**, v. 1, n. 7, p. 1–7, 2015.

NEVALAINEN, K. M. H.; TE’O, V. S. J.; BERGQUIST, P. L. Heterologous protein expression in filamentous fungi. **Trends in biotechnology**, v. 23, n. 9, p. 468–474, 2005.

NILSON, T. Biological wood degradation. In: EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. **Pulp and Paper Chemistry and Technology**. Stockholm. Deutsche Nationalbibliothek. v. 1, cap. 10, p. 219 - 244., 2009.

PAYNE, C. M. et al. Fungal cellulases. **Chemical Reviews**, v. 115, p. 1308–1448, 2015.

PETERSEN, T. N. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, n. 10, p. 785–786, 2011.

PRADE, R. A.; SEGATO, F. A biologia molecular dos sistemas de expressão desenvolvidos para a produção de enzimas de interesse industrial. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. .L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto. Legis Summa. cap. 3, p. 19 - 40, 2014.

PUCHART, V.; BIELY, P. Simultaneous production of endo- β -1,4-xylanase and branched xylooligosaccharides by *Thermomyces lanuginosus*. **Journal of Biotechnology**, v. 137, n. 1-4, p. 34–43, 2008.

PUNT, P. J.; VAN DEN HONDEL, C. A. Transformation of filamentous fungi based on hygromycin b and phleomycin resistance markers. **Methods in enzymology**. v. 216, p. 47-57, 2008.

RENNIE, E. A.; SCHELLER, H. V. Sciencedirect xylan biosynthesis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 100–107, 2014.

RILEY, R. et al. Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 27, p. 9923–9928, 2014.

RODRIGUES, J. A. R. Do engenho à biorefinaria. A usina de açúcar como empreendimento industrial para a geração de bioquímicos e biocombustível. **Química Nova**. v. 34, p. 1242-1254, 2011.

RYTIOJA, J. et al. Plant-Polysaccharide-Degrading Enzymes from Basidiomycetes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 4, p. 614–649, 2014.

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.

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

SEGATO, F. et al. Genomics review of holocellulose deconstruction by *Aspergilli*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 4, p. 588–613, 2014.

SHEVCHENKO, A. et al. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. **Anal. chemistry**, v. 68, n. 5, p. 850–858, 1996.

SIMS, R. E. H. et al. An overview of second generation biofuel technologies. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1570–1580, 2010.

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

STEENTOFT, C. et al. Precision mapping of the human O -GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. **The EMBO Journal**, v. 32, n. 10, p. 1478–1488, 2013.

TILBURN, J. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. **Gene**, v. 26, p. 205–221, 1983.

VAN DEN BRINK, J.; DE VRIES, R. P. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 6, p. 1477–1492, 2011.

VLASENKO, E. et al. Substrate specificity of family 5, 6, 7, 9, 12, and 45 endoglucanases. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2405–2411, 2010.

WESTERENG, B. et al. The Putative Endoglucanase PcGH61D from *Phanerochaete chrysosporium* Is a Metal-Dependent Oxidative Enzyme that Cleaves Cellulose. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. 1–11, 2011.

APÊNDICE A

Solução de Sais (Clutter Buck)

12% de NaNO_3 ,

1,4% de KCl ,

1,4% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

3,4% de KH_2PO_4

Elementos Traços

2,2% de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,

1,1% de H_3BO_3 ,

0,5% de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$,

0,5% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,

0,16% de $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$,

0,16% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$,

0,11% de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

5% de Na_2EDTA

Gel Agarose 1% (Gel de DNA)

Agarose 1%

Tampão TAE

Meio LB

1% de triptona,

0,5% de extrato de levedura,

1% de NaCl , pH 7,0

Para meio sólido acrescentar 2% de agar.

Meio SOB

2% de triptona,

0,5% de extrato de levedura,

0,24% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,06% de NaCl 10mM,

após dissolver, acrescentou-se 0,02% de KCl e corrigiu o pH para 7,0 com NaOH 5M, em seguida foi autoclavado, e adicionou-se 0,2% de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ estéril

Meio SOC

triptona 20 g/L,
extrato de levedura 5 g/L,
NaCl 10 mM,
KCl 2,5 mM,
MgCl₂ 20 mM e
glicose 20 mM

Meio para expressão (1 L)

Elementos traços 1mL
Solução de sais 50mL
Maltose 3% (podendo variar)
Piridoxina 0,1 mg/L
pH 6,5

SDS-PAGE 15%

Gel de corrida (para 10 mL)
Água 2,3 mL
Acrimalida 30% 5,0 mL
1,5M Tris-HCl (pH 8,8) 2,5mL
10% SDS 0,1 mL
10% persulfato de amônia 0,1mL
TEMED 0,004 mL

Gel de empilhamento (para 3 ml)

Água 2,1 ml
Acrimalida 30% 0,5 ml
1,0M Tris-HCl (pH 6,8) 0,38ml
10% SDS 0,03 ml
10% persulfato de amônia 0,03ml
TEMED 0,003 ml

Corante Prata SDS-PAGE

Ao termino da corrida, o gel foi mantido overnight em solução fixadora (50% methanol 95%, 12% ácido acetic e 38% água destilada) em agitação 70 rpm.

Descartou-se a solução fixadora e foram realizadas três lavagens de 8 minutos com etanol 50%.

O gel foi incubado em solução de tiosulfato de sódio 0,02% durante 1 minuto sob agitação;

Realizou 3 lavagens de 20 segundos com água destilada;

O gel foi incubado novamente durante 25 minutos em solução de nitrato de prata (0,2g de nitrato de prata, 0,037 ml de formaldeído 37% e 100 ml de água destilada);

Descartou-se a solução de nitrato de prata e foram realizadas 3 lavagens de 20 segundos com água destilada;

Aplicou a solução reveladora (2g de carbonato de sódio, 1 ml da solução tiosulfato de sódio 0,02%, 0,025 ml de formaldeído 37%, completar para 50 ml) sobre o gel;

Assim que o gel atingiu o padrão desejado de coloração, a reação foi parada com a adição de 3ml de ácido acético.

Corante com azul brilhante de comissie

2 g de azul brilhante de comassie

400 mL de água destilada

Agitar por 1 hora para dissolver

500 mL de metanol

100 mL de ácido acético 100%

A solução foi filtrada em papel de filtro e acondicionada em tubos de 50 mL

APÊNDICE B

Curva padrão para obtenção da equação da reta para medição de açúcares redutores totais pelo método de Tanaka, (1981).

Curva padrão para obtenção da reta para medição de proteínas totais pela método de Bradford (1986). O padrão foi feito utilizando albumina de soro bovino em várias concentrações.

APÊNDICE C

Tabelas apresentando os tampões e pHs explorados pela técnica de Termofluor

Tampão (50 mM)	pH	Tampão (50 mM)	pH
Água	-	Cacodilato de Sódio	6,5
HCl	1,2	Bis-Tris	6,5
HCl	2,0	Mes	6,5
ABF	2,0	Bis-Tris	6,7
Ácido Cítrico	3,0	Fosfato de Potássio	7,0
ABF	3,0	Hepes	7,0
Ácido Cítrico	3,0	Bis-Tris	7,0
Citrato de Sódio	4,0	ABF	7,0
ABF	4,0	Acetato de Amônio	7,3
Acetato de Sódio	4,5	Fosfato de Sódio	7,5
Acetato de Sódio	4,5	Tris	7,5
Citrato de Sódio	4,7	Imidazol	8,0
Acetato de Sódio	5,0	Hepes	8,0
Fosfato de Potássio	5,0	Tris	8,0
ABF	5,0	Bicina	8,0
Citrato de Sódio	5,5	ABF	8,0
Fosfato de Sódio	5,5	Tris	8,5
Mes	5,8	Bicina	9,0
Fosfato de Potássio	6,0	ABF	9,0
Bis-Tris	6,0	Carbonato de Sódio	9,5
ABF	6,0	Carbonato de Sódio	10,0
Mes	6,2	ABF	10,0
Fosfato de Sódio	6,5		

APÊNDICE D

Resultado do sequenciamento das bases de nucleotídeos da GtGH5. As bases foram geradas pelo sequenciador e os amino-ácidos transcritos foram preditos pelo software Geneious Basic 4.8.5. O cromatograma avalia a qualidade do sequenciamento, sendo que os picos mais pontuados representam os resultados de melhor resolução. A escala de cor das bases sequenciadas também mostra a qualidade obtido pelo sequenciamento, sendo que o azul mais escuro estão as bases de baixa qualidade variando até o azul mais claro estão as de mais qualidade.

Resultado do BLASTX utilizando as bases sequenciadas na busca de proteínas. A figura indica o primeiro *hit* da busca, mostrando que foi identificadaa GtGH5, o que confirma a expressão dessa proteína em *A. nidulans* A773.

.

glycoside hydrolase [Gloeophyllum trabeum ATCC 11539]
Sequence ID: [ref|XP_007867902.1](#) Length: 358 Number of Matches: 2
[▶ See 2 more title\(s\)](#)

Range 1: 57 to 143		GenPept	Graphics	▼ Next Match ▲ Previous Match		
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
174 bits(440)	1e-80	Compositional matrix adjust.	85/105(81%)	86/105(81%)	18/105(17%)	+1
Query 1	GAYPPLTQYYXCFHPSYLDYGSR*VRAGADGAGQMXHFVNDDGYNLFRLPVGHQYLTNG	180				
	GAYPPLTQYY		GADGAGQM HFVNDDGYNLFRLPVGHQYLTNG			
Sbjct 57	GAYPPLTQYY-----GADGAGQMXHFVNDDGYNLFRLPVGHQYLTNG	98				
Query 181	VVGGTLNSTNFDKYDALVQACLNTGAYCIIDIHNYARINGEVIGQ	315				
	VVGGTLNSTNFDKYDALVQACLNTGAYCIIDIHNYARINGE+IGQ					
Sbjct 99	VVGGTLNSTNFDKYDALVQACLNTGAYCIIDIHNYARINGEIIIGQ	143				

Resultado do sequenciamento das bases de nucleotídeos da GtGH45. As bases foram geradas pelo sequenciador e os amino-ácidos transcritos foram preditos pelo software Geneious Basic 4.8.5. O cromatograma avalia a qualidade do sequenciamento, sendo que os picos mais pontuados representam os resultados de melhor resolução. A escala de cor das bases sequenciadas também mostra a qualidade obtido pelo sequenciamento, sendo que o azul mais escuro estão as bases de baixa qualidade variando até o azul mais claro estão as de mais qualidade.

Resultado do BLASTX utilizando as bases sequenciadas na busca de proteínas. A figura indica o primeiro *hit* da busca, mostrando que foi identificadaa GtGH45, o que confirma a expressão dessas proteína em *A. nidulans* A773.

endoglucanase V-like protein [Gloeophyllum trabeum ATCC 11539]
Sequence ID: [reflXP_007865302.1](#) Length: 204 Number of Matches: 1
[▶ See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 32 to 103			GenPept		Graphics		▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Method	Identities		Positives		Gaps	Frame
83.6 bits(205)	4e-17	Compositional matrix adjust.	59/90(66%)		61/90(67%)		18/90(20%)	+2
Query 8	QNPLRICLLPMYSGCGSPGE*RIXRGSHPSAEHPPACGXTASGYTAAMNQLSFGAGPGA						187	
	QNP MYSGCGSP ACG TASGYTAAMNQLSFGAGPGA							
Sbjct 32	QNPSGSASFTHYSGCGSP-----ACGETASGYTAAMNQLSFGAGPGA						73	
Query 188	gagbpCGRCFXLXGTADPYSPSYTGPFHTL 277							
	GAG+ CGRCF L GTADPYSPSYTGPFHT+							
Sbjct 74	GAGDACGRCFALTGTADPYSPSYTGPFHTI 103							