

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LIS SCHWARTZ MIOTTO

**Estudos moleculares, estruturais e funcionais da
Cel12A de *Gloeophyllum trabeum*, uma endo-1,4-
 β -glucanase da família 12 de hidrolases de
glicosídeos**

São Carlos

2014

LIS SCHWARTZ MIOTTO

Estudos moleculares, estruturais e funcionais da Cel12A
de *Gloeophyllum trabeum*, uma endo-1,4- β -glucanase
da família 12 de hidrolases de glicosídeos

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal de São Carlos
para obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Igor Polikarpov

Versão final

São Carlos

2014

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

M669em Miotto, Lis Schwartz.
Estudos moleculares, estruturais e funcionais da Cel12A de *Gloeophyllum trabeum*, uma endo-1,4- β -glucanase da família 12 de hidrolases de glicosídeos / Lis Schwartz Miotto.
-- São Carlos : UFSCar, 2014.
191 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Bioquímica. 2. Celulase. 3. Endoglucanase. 4. Biofísica.
5. Cristalografia de raio X. I. Título.

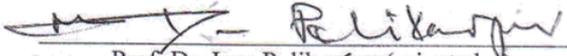
CDD: 574.192 (20^a)

Lis Schwartz Miotto

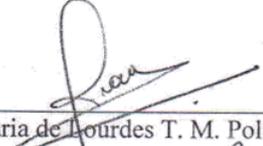
Tese de Doutorado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, da
Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia

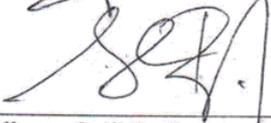
Aprovado em: 29/08/2014

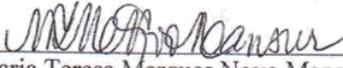
BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Igor Polikarpov (orientador)


Dr. Fabio Marcio Squina (CNPEN/CTBE)


Prof.ª Dr.ª Maria de Lourdes T. M. Polizeli (USP)


Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior (UFSCar)


Prof.ª Dr.ª Maria Teresa Marques Novo Mansur (UFSCar)

À minha família

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Gisele, por ser um exemplo de força, sucesso e superação e por ter investido em meus estudos e aprimoramentos sempre. Ao meu pai Adauto, por ser o meu grande incentivador, e por ter me estimulado a tentar ser a melhor em tudo que eu fizesse. “Filha, você pode escolher o que quiser pra sua vida, e eu te apoiarei, mas seja a melhor em tudo o que fizer”. “O mundo está cheio de pessoas medíocres, você tem que sair da média, ir além...”. Estas palavras jamais saíram de minha cabeça e é delas que eu me lembro quando penso em desistir de algo.

Às minhas filhas Catarina e Flora, pelo amor simples e puro. Ao meu marido Charli, pelo apoio, compreensão dos momentos de ausência, chegadas tardias em casa, almoços ausentes, etc, e por ouvir minhas queixas e reclamações de maneira atenciosa. Sem o teu apoio não teria sido possível.

Ao Prof. Igor, pela orientação e pelas oportunidades a mim apresentadas.

À **FAPESP**, pelo apoio financeiro para a realização do presente trabalho.

Ao IFSC, pela infraestrutura.

Ao PPGBIOTEC, pelo apoio sempre que precisei.

Ao Prof. Adrian Tsang do Grupo de Genômica Estrutural e Funcional da Universidade Concordia, em Montreal, Canadá, por ter me recebido em seu laboratório e permitido que eu pudesse ter tido uma experiência inesquecível e de muito aprendizado.

Ao laboratório de microscopia eletrônica (LME/LNNano/CNPEM) e ao LNLS pelo apoio técnico e por toda a estrutura e suporte.

Aos meus colaboradores que contribuíram para enriquecer esse trabalho, cada um com sua “expertise”: Obrigada Amanda e Camila pela atenção e disponibilidade. Ao Mario.

Ao meu amigo e colaborador Caio, pelas risadas, momentos de descontração e ajuda com os problemas de informática. Ao Bruno, pelas discussões científicas.

Ao Alessandro, pela leitura crítica desta tese.

Aos meus amigos do grupo de Biotecnologia Molecular, em especial, os do pioneiro “grupo dos fungos” do laboratório: Vivi, pelo companheirismo durante nossa estadia no Canadá e por ser um exemplo de determinação e profissionalismo; ao Flávio (momo, morenon), Renata (Rê), à Fran, Marisa, Malu e à “agregada” Ana pela amizade e por tantos momentos divertidos.

À Vanessa, pelas risadas, bolos compartilhados e por ser minha companheira da remanescente “dupla do niger”.

Aos meus companheiros da sala 8, os antigos e os novos, pelas conversas, risadas e tantos outros momentos compartilhados: Ivo “Almeida”, Leo, Dani, Fred, Simone, Livia, Daia, Teresa, Ivan, Fernanda, Heline, Michel, Carol, Marina, André, Renata F., Segato e Gabi.

Aos meus novos amigos do Canadá: Cássio, Humberto, Vanessa, Cristina, Fred, Amrita, Wen, Ingo e Tieling. Obrigada por tornar minha estadia mais prazerosa e pelos inúmeros ensinamentos.

À Maria, Livia, Josimar, João, Alexandre, Kelven, Susana e Bianca pelo apoio técnico e disponibilidade sempre que precisei.

Aos demais membros dos grupos de Biotecnologia Molecular e Cristalografia pelo companheirismo todos esses anos.

Muito obrigada!

“A Ciência não é, e nunca será, um livro terminado. Todo progresso importante levanta novas questões. Dificuldades novas e mais profundas são reveladas posteriormente a cada desenvolvimento”.

Albert Einstein

RESUMO

MIOTTO, L.S. **Estudos moleculares, estruturais e funcionais da Cel12A de *Gloeophyllum trabeum*, uma endo-1,4- β -glucanase da família 12 de hidrolases de glicosídeos.** 2014. 191p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.

A produção de etanol de segunda geração, a partir da hidrólise enzimática da biomassa vegetal é considerada uma alternativa viável e promissora para enfrentarmos a crise energética mundial e diminuirmos a dependência das fontes fósseis de energia. Para isso, é necessário que ocorra a degradação das moléculas constituintes da parede celular como a lignina, a celulose e a hemicelulose a açúcares fermentescíveis. No entanto, a utilização de enzimas para esse fim ainda apresenta um custo elevado, o que tem desencadeado, cada vez mais, estudos que busquem torná-las mais viáveis econômica e tecnicamente. O presente estudo visou à caracterização molecular, estrutural e funcional da endoglucanase Cel12A do fungo *Gloeophyllum trabeum* por diferentes técnicas. Os dados bioquímicos revelaram a especificidade por substratos da enzima, sendo que o melhor substrato para a atividade foi o β -glucano ($239,2 \pm 9,1 \text{ U mg}^{-1}$). As condições ótimas para a atividade foram pH 4,5 e temperatura de 50 °C. Os ensaios de estabilidade térmica indicaram uma meia-vida de $84,6 \pm 3,6$ horas a 50 °C. Os parâmetros cinéticos K_m ($3,2 \pm 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) e V_{max} ($0,40 \pm 0,02 \mu\text{mol min}^{-1}$) foram determinados utilizando-se β -glucano como substrato. Análises de microscopia eletrônica de varredura de amostras de papel de filtro e aveia submetidos à hidrólise pela GtCel12A evidenciaram os efeitos de degradação dos substratos em relação às amostras controle. Adicionalmente, o envelope de baixa resolução e a estrutura cristalográfica da GtCel12A foram obtidos. O modelo de alta resolução revelou um enovelamento do tipo sanduíche β , com duas folhas β (A e B) e três hélices α , sendo que a folha A apresentou cinco fitas e a B, nove fitas. Por meio de análises comparativas da sequência de aminoácidos e de estruturas homólogas identificamos os resíduos catalíticos Glu142 e Glu227 no sítio ativo da enzima. Tais resultados são importantes para a elucidação e compreensão do mecanismo molecular de atuação dessa enzima e de outras endoglucanases da família GH12.

Palavras-chave: Celulase. Endoglucanase. Bioquímica. Biofísica. Cristalografia de raios-X.

ABSTRACT

MIOTTO, L.S. **Molecular, structural and functional studies of the Cel12A from *Gloeophyllum trabeum*, an endo-1,4- β -glucanase from the family 12 of glycoside hidrolases.** 2014. 191p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.

The production of second-generation ethanol by enzymatic hydrolysis of biomass is considered a viable and promising alternative to face the global energy crisis and to decrease our dependence on fossil fuels. Therefore, it is necessary to degrade the constituent molecules of the plant cell wall such as lignin, cellulose and hemicellulose to fermentable sugars. However, the use of enzymes for this purpose is still expensive, leading to the increase on studies seeking to make them more feasible economically and technically. The present study aimed the molecular, structural and functional characterization of the endoglucanase Cel12A from the fungus *Gloeophyllum trabeum* by different techniques. Biochemical data revealed the substrate specificity for the enzyme and showed that β -glucan is the best substrate for its activity ($239.2 \pm 9.1 \text{ U mg}^{-1}$). Optimal conditions for activity were pH 4.5 and temperature of 50 °C. Thermal stability assay indicated a half-life of 84.6 ± 3.6 hours at 50 °C. The kinetic parameters K_m ($3.2 \pm 0.5 \text{ mg mL}^{-1}$) and V_{\max} ($0,40 \pm 0,02 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1}$) were determined using β -glucan as substrate. Analysis of scanning electron microscopy of oat spelts and filter paper samples submitted to the hydrolysis by GtCel12A evidenced the degradation effects of these substrates compared to control samples. Moreover, the low-resolution envelope and the crystallographic structure for GtCel12A were determined. The structure revealed a β -sandwich fold with two β -sheets (A and B) and three α -helices, while sheet A showed five strands and sheet B nine strands. The comparative analysis of the amino acid sequence and homologous structures prompted us to identify the catalytic residues, Glu142 and Glu227 in the active site of the enzyme. These results are important for understanding and elucidating the enzyme molecular mechanism of action and other glycoside hydrolase family 12 endoglucanases.

Keywords: Cellulase. Endoglucanase. Biochemistry. Biophysics. X-ray crystallography.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema representativo das principais moléculas constituintes da parede celular vegetal. O principal componente da lignocelulose é a celulose, uma cadeia de moléculas de glicose unidas por ligações β -1,4. A hemicelulose, o segundo componente mais abundante da lignocelulose, é composta por açúcares de 5 a 6 carbonos, como arabinose, galactose, glicose, manose e xilose. A lignina é composta principalmente por componentes fenólicos chamados álcool p-cumarílicos (H), álcool coniferílico (G) e álcool sinapílico (S). A celulose, a hemicelulose e a lignina formam estruturas chamadas microfibrilas, que estão organizadas em macrofibrilas, que por sua vez, medeiam a estabilidade estrutural na parede celular vegetal. Adaptado de ²¹ 41
- Figura 2** - Representação esquemática da molécula de celulose. A celulose é formada a partir de monômeros de glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo β -1,4 (evidenciadas em vermelho). 43
- Figura 3** - Representação esquemática de uma molécula de hemicelulose. Em destaque, alguns dos principais açúcares constituintes da hemicelulose, a xilose, a arabinose e o ácido 4-metilglucurônico. Adaptado de ³¹ 44
- Figura 4** - Modelo tridimensional da parede celular vegetal primária. Parede celular primária contendo microfibrilas de celulose, hemicelulose, pectina, lignina e proteínas solúveis, evidenciando a complexa interação entre as moléculas constituintes da parede celular vegetal. Adaptado de ³² 44
- Figura 5** - Representação esquemática da complexa molécula de lignina, tipicamente encontrada em coníferas. ³⁸ 46

- Figura 6** - Estrutura da parede celular primária com destaque para os domínios pectina. As microfibrilas de celulose (hastes roxas) são sintetizadas por grandes complexos hexaméricos na membrana plasmática, enquanto que hemiceluloses e pectinas, que compõem a matriz de polissacarídeos, são sintetizadas no aparelho de Golgi e são depositadas na superfície da parede por vesículas. A rede de celulose-hemicelulose é mostrada na parte esquerda da parede celular, sem pectinas, sendo estas enfatizadas na parte direita da figura. Na maioria das espécies, o principal componente da hemicelulose é o xiloglucano (azul), enquanto as hemiceluloses como os arabinoxilanos (cinza) e mananos (não mostrados) são encontradas em menor quantidade. O principal polissacarídeo da pectina é a ramnogalacturonana I e a homogalacturonana, com quantidades menores de xilogalacturonana, arabinana, arabinogalactana I (não mostrado) e ramnogalacturonana II. Adaptado de ²²47
- Figura 7** - Matriz energética brasileira em 2012. As fontes renováveis (hidroeletricidade, lenha e carvão vegetal, biomassa da cana-de-açúcar e outras fontes renováveis, como a lixo) correspondem a 44,1% da oferta interna de energia, já as não renováveis (petróleo e derivados, gás natural, carvão mineral e urânio) por 55,9%. Adaptado de ⁴⁷48
- Figura 8** - Produção de cana-de-açúcar no Brasil. A e B. Plantação de cana-de-açúcar. C. Usina de cana-de-açúcar onde o etanol é produzido. D. Tanques de fermentação dos açúcares para a produção de etanol. Adaptado de ⁵¹50
- Figura 9** - Bagaço de cana-de-açúcar. A e B - Bagaço gerado como resíduo nas usinas de açúcar e álcool.^{64- 65}. C e D. Detalhe do aspecto e morfologia do bagaço.
⁶⁶⁻⁶⁷53
- Figura 10** - Esquema representativo das principais etapas de conversão da biomassa vegetal em etanol. Adaptado de ⁷² 55
- Figura 11** - Diagrama esquemático evidenciando os polissacarídeos e as respectivas enzimas hidrolíticas utilizadas para a clivagem dos mesmos em moléculas menores e açúcares simples. Endoglucanases e exoglucanases são celulases, enquanto xilanases, arabinases, arabinofuranosidases, manases e galactanases são hemicelulases. Adaptado de ¹³58

- Figura 12** - Desenho esquemático demonstrando o sinergismo entre diferentes tipos de enzimas atuantes na degradação da celulose. A. Endoglucanases catalisam a clivagem da cadeia por meio de um mecanismo hidrolítico, gerando extremidades não oxidadas (hexágonos azuis). Oxidases líticas catalisam a clivagem oxidativa da cadeia, gerando extremidades oxidadas (hexágonos vermelhos). Celobiohidrolases hidrolisam a cadeia de celulose de uma maneira processiva para produzir celobiose ou celobiose oxidada, dependendo do estado de oxidação das extremidades da cadeia. A ação processiva das celobiohidrolases gera majoritariamente celobiose, que pode ser posteriormente clivada em glicose por β -D-glucosidases. B. Na ausência de clivagem oxidativa, a hidrólise da celulose ocorre apenas por meio de endoglucanases e celobiohidrolases processivas. Adaptado de ¹⁴². 64
- Figura 13** - Esquema simplificado da hidrólise da celulose amorfa e cristalina por sistemas celulolíticos não complexados (A) e complexados (B). Adaptado de ¹⁶². 67
- Figura 14** - Morfologia do fungo *G. trabeum*. A. Crescimento sobre madeira.¹⁷¹ B. Em placa de Petri contendo meio ágar-glicose. 69
- Figura 15** - Esquema simplificado das etapas requeridas para a clonagem por meio de LIC. 80
- Figura 16** - Sequência do gene *cel12A* de *G. trabeum* contendo 741 pares de bases. 81
- Figura 17** - Mapa do vetor ANIp7G adaptado para o método LIC. 84
- Figura 18** - Morfologia do fungo *A. niger*. A. Crescimento micelial em placa de Petri.¹⁸¹ B. Conidióforo de *A. niger* com conidiósporos na extremidade.¹⁸² 87
- Figura 19** - Esquema simplificado das etapas requeridas para a produção de proteínas recombinantes em *A. niger*. 88
- Figura 20** - Etapas do processo de obtenção de protoplastos de *A. niger*. A. Filtração do micélio obtido da cultura líquida. B. Cultivo após adição do coquetel comercial VinoTaste® Pro (Novozymes). C. Etapa de obtenção dos protoplastos após centrifugação para separação dos restos celulares contendo micélio. 89

- Figura 21** - Etapas de digestão do micélio de *A. niger* para a liberação dos protoplastos. A. Hifas íntegras antes do início da digestão com o coquetel comercial VinoTaste® Pro (Novozymes). B. 1 hora após a adição do coquetel. Nota-se que alguns protoplastos já foram liberados (flechas). C. Após 4 horas de digestão. Nesse estágio, o número de protoplastos liberados é bem maior e praticamente não há mais hifas íntegras.90
- Figura 22** - Transformação química em *Aspergillus sp.* Os conidiósporos são coletados e germinados em meio contendo nutrientes e, posteriormente, submetidos a um tratamento enzimático para a quebra da parede celular das células, liberando, dessa forma, os protoplastos, que são incubados com o DNA transformante. O plaqueamento em meio seletivo permite o crescimento dos transformantes. Adaptado de ¹⁸⁰91
- Figura 23** - Placas contendo colônias de *A. niger* após transformação e incubação em meio seletivo em estufa a 30 °C. A. Controle negativo do experimento, onde não foi observado crescimento de colônias em meio seletivo SRM. B. Controle positivo onde foi observado crescimento abundante do fungo em meio não seletivo. C. Placa de transformação com crescimento de colônias esparsas.92
- Figura 24** - Triagem da produção de proteínas recombinantes de *A. niger*. A. Coleta dos esporos das colônias. B. Inoculação dos esporos nos poços contendo meio MM J.93
- Figura 25** - Escalonamento da produção da proteína GtCel12A. À esquerda, testes iniciais em placa de 24 poços com volume de 1 mL e, à direita, produção em frascos do tipo *Erlenmeyer* com 500 mL de meio de cultivo.94
- Figura 26** - Princípio do método Thermofluor utilizado para o estudo da estabilidade de proteínas. A teoria se baseia no monitoramento de perfis de enovelamento da proteína, a partir do sinal de fluorescência do corante *SYPRO® Orange* à medida que esse interage com as moléculas de proteína. As proteínas corretamente enoveladas sofrem desenovelamento com o aumento da temperatura, resultando na exposição de regiões hidrofóbicas e, eventualmente, a agregação das moléculas. A temperatura de melting (T_m) representa a temperatura na qual 50 % das moléculas estão desenoveladas. Adaptado de ¹⁸⁸100

- Figura 27** - Espectro de CD no UV distante associado a vários tipos de estruturas secundárias. Adaptado de ¹⁹³ 103
- Figura 28** - Perfil de Kratky exemplificando estados de enovelamento ou desenovelamento de moléculas. A. Estado enovelado. B. Parcialmente desenovelado e (C) estado totalmente desenovelado. Observa-se que à medida que o grau de enovelamento diminui, ocorre o deslocamento do pico parabólico do início da curva e a inclinação da linha de base para altos valores de q , gerando uma região com perfil hiperbólico. Adaptado de ²⁰⁵ 107
- Figura 29** - Associação molecular reversível envolvida na formação dos cristais. Os monômeros inicialmente se combinam em pequenos agregados (ou cadeias). Essa associação leva à formação de agregados pré-núcleo, que continuam crescendo pela adição de outros monômeros ou cadeias. Quando um número suficiente de moléculas se associa em três dimensões, um núcleo crítico termodinamicamente estável é formado e, a partir desse, novos monômeros ou cadeias se juntam, levando à formação dos cristais. Adaptado de ²⁰⁸ 108
- Figura 30** - Métodos de cristalização de macromoléculas. A. Método da gota pendurada (*hanging drop*). A proteína (em rosa) é misturada à solução de cristalização (verde) e colocada em posição invertida sobre o reservatório contendo a solução de cristalização. B. Método da gota sentada (*sitting drop*). A proteína (rosa) é colocada juntamente com a solução de cristalização em um pedestal, sobre o reservatório contendo a solução de cristalização. Adaptado de ²¹⁰ 109
- Figura 31** - Representação esquemática simplificada das etapas de determinação da estrutura cristalográfica de proteínas por difração de raios-X. O cristal é submetido ao experimento de difração de raios-X, a partir do qual é obtido o padrão de difração. A partir desse, por meio de métodos computacionais, são obtidas as densidades eletrônicas que permitem a construção e o refinamento do modelo da proteína..... 112
- Figura 32** - Amplificação do gene *cell2A* a partir do cDNA de *G. trabeum*. Gel de agarose 1% evidenciando a banda de 741 pb correspondente ao gene *cell2A*. 117

- Figura 33** - Purificação da enzima GtCel12A. A. Cromatograma da segunda etapa de purificação por cromatografia de exclusão molecular, em coluna Superdex 75 16/60, onde o maior pico (indicado pela flecha) corresponde a eluição da GtCel12A. B. SDS-PAGE 15%, utilizado para análise da pureza da amostra, sendo: 1- marcador de massa molecular com destaque para a banda de 25 kDa. 2- Amostra de extrato bruto obtido por produção heteróloga da GtCel12A pelo fungo *A. niger*. 3-Fração obtida na etapa de purificação com coluna Q Sepharose FF. 4- Fração eluída da coluna Superdex 75 16/60 com a proteína pura.118
- Figura 34** - Sequência de aminoácidos de GtCel12A e os peptídeos identificados (vermelho) a partir da análise por LC/MS após tripsinização da banda obtida por SDS-PAGE. Os peptídeos identificados resultaram em 32% de cobertura da sequência.119
- Figura 35** - Gel nativo da enzima GtCel12A. 1- Marcador de massa molecular, com destaque para a banda de 66 kDa, 2- Amostra de GtCel12A em uma concentração de 0,5 mg mL⁻¹, 3- Amostra de GtCel12A em uma concentração de 1,0 mg mL⁻¹.....120
- Figura 36** - Perfil da especificidade por substratos da enzima GtCel12A. Histograma representado em termos de atividade relativa após 30 minutos de incubação da enzima sob condições ótimas (50 °C e pH 4,5), com os diferentes substratos. A maior atividade observada foi em β-glucano, seguida de liquenano, CMC, PASC (celulose amorfa), Sigmacell, Avicel e papel de filtro.....121
- Figura 37** - Perfil tridimensional da atividade relativa da GtCel12A sob diferentes valores de temperatura e pH. O intervalo de temperatura testado foi de 30 a 80 °C e de pH, de 1 a 10. A maior atividade observada foi em pH 4,5 a 50 °C, que correspondem às condições ótimas para a atividade de GtCel12A em β-glucano.....123
- Figura 38** - Resultado do ensaio colorimétrico de atividade da enzima GtCel12A em β-glucano, pelo método do DNS. ¹⁸² Da esquerda para a direita, pHs de 1 a 10 e de cima para baixo, destaque para os controles e as triplicatas da reação. Nota-se que a enzima apresenta alta atividade em pHs de 1 a 5, sem grandes diferenças de intensidade da cor e uma atividade menor em pH 6, quando a partir de então, passa a apresentar atividade desprezível até a total ausência de atividade em pH 10.123

- Figura 39** - Atividade residual da enzima GtCel12A. Os valores são apresentados em termos de atividade relativa. A enzima foi incubada por até 168 horas a 50 °C e posteriormente foi testada quanto a sua atividade no substrato (β -glucano) por 15 min, a 50 °C..... 124
- Figura 40** - Curvas de Thermofluor para a GtCel12A, obtidas por meio da análise da intensidade de fluorescência em função da temperatura. O intervalo de temperatura analisado foi de 25 a 90 °C, com incremento de 1 °C, para pHs de 1 a 10. 125
- Figura 41** - Variação da Temperatura de *melting* (T_m) em função do pH. Dentre os pHs testados (1 a 10), o maior valor de T_m foi observado para o pH 3 ($60,4 \pm 0,6$ °C)..... 126
- Figura 42** - Curva de Michaelis-Menten para a GtCel12A. O substrato utilizado foi o β -glucano em diferentes concentrações: 0,60; 1,25; 2,50; 5,00; 10,00 e 15,00 (mg mL^{-1}). A partir desse gráfico, pelo ajuste de Michaelis-Menten disponível no software Origin v 8.6 (OriginLab), foi possível determinar os parâmetros cinéticos K_m ($3,2 \pm 0,5$ mg mL^{-1}) e V_{max} ($0,40 \pm 0,02$ $\mu\text{mol min}^{-1}$). 127
- Figura 43** - Efeito da hidrólise de GtCel12A sobre papel de filtro analisado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). À esquerda, imagens em diferentes magnificações do controle da reação, no centro, efeito da hidrólise por 12 horas e, à direita, efeito da hidrólise por 24 horas a 50 °C e pH 4,5. A. Barra de escala de 200 μm . B. Barra de escala de 100 μm . C. Barra de escala de 10 μm 129
- Figura 44** - Efeito da hidrólise da GtCel12A sobre flocos de aveia, analisado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). À esquerda, imagens em diferentes magnificações do controle da reação e, à direita, efeito da hidrólise por 12 horas a 50 °C e pH 4,5. A. Barra de escala de 20 μm . B. Barra de escala de 10 μm . C. Barra de escala de 3 μm 130
- Figura 45** - Espectro de dicroísmo circular da GtCel12A em diferentes pHs. O espectro foi obtido em pHs de 1 a 10 a 10 °C e com varredura do comprimento de onda de 200 a 260 nm. 131

- Figura 46** - Espectro de dicrosímio circular da GtCel12A em diferentes temperaturas em pH 3. O monitoramento da mudança de elipticidade foi realizado em um intervalo de comprimento de onda de 200 a 240 nm sob temperaturas de 10 a 90 °C, com incremento de 5 °C.....133
- Figura 47** - Curvas de espalhamento experimental, do modelo de átomos *dummy* e predita para a estrutura cristalográfica da GtCel12A obtidas pela análise por SAXS. A curva de espalhamento experimental é representada por círculos e o ajuste da curva a partir de dados inferidos da estrutura cristalográfica da GtCel12A está representado em rosa. Já a obtida a partir do modelo de átomos *dummy* está em verde. Em detalhe, o perfil de Guinier utilizado para o cálculo do R_g134
- Figura 48** - Função de distribuição de distâncias computada a partir dos dados experimentais (preto) e estimada a partir da estrutura cristalográfica da GtCel12A (rosa), obtidas a partir da análise por SAXS.135
- Figura 49** - Estrutura cristalográfica da GtCel12A (rosa) sobreposta ao modelo de superfície obtido a partir dos dados de SAXS (verde) mostrado em três diferentes orientações. Os modelos do centro e da direita estão rotacionados 90° nos eixos y e x respectivamente, a partir do modelo da esquerda.....136
- Figura 50** - Perfil de Kratky [$I(q) \cdot q^2 \times q$] para a GtCel12A incubada em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 3,0, com variação de temperatura de 20 °C a 65 °C. A presença de um pico parabólico para cada temperatura considerada representa a manutenção da globularidade da enzima. A diminuição do pico, sem ter sua posição na horizontal modificada, demonstra a perda do enovelamento terciário. Já a partir de 60 °C ocorre, além do abaixamento do pico, um deslocamento na posição do pico para a esquerda. Isso sugere a perda parcial da globularidade e alteração no arranjo entre as enzimas em solução, o que resultou no aumento da massa molecular do conjunto formado e agregação das moléculas.137
- Figura 51** - Cristais obtidos nos ensaios de cristalização da GtCel12A. **A.** Cristais obtidos na condição composta por acetato de sódio 0,1 M, pH 4,6 e sulfato de amônio 1 M. **B.** Cristais obtidos na condição composta por acetato de sódio 0,1 M, pH 4,6 e PEG 3000 25% ($m \cdot v^{-1}$). **C.** Cristais obtidos na condição composta por ácido cítrico 0,1 M, pH 5,0 e sulfato de amônio 0,8 M.....138

Figura 52 - Padrão de difração obtido a partir do experimento de cristalografia de raios-X para a enzima GtCel12A.	139
Figura 53 - Conteúdo da unidade assimétrica modelado para os dados cristalográficos da GtCel12A. As moléculas correspondentes à proteína estão representadas em magenta, as moléculas de água em ciano, as de etileno glicol em verde e as de sulfato em amarelo.	142
Figura 54 - Representação esquemática da estrutura cristalográfica da GtCel12A. A. As duas folhas β são denominadas A e B e as fitas individuais que as formam estão numeradas (A2 a A6 e B1 a B9), de acordo com a posição em cada uma das folhas. B. Nessa imagem, percebe-se claramente a posição da folha A, externa e B, interna, sendo que esta última se curva para formar o sítio catalítico característico.	143
Figura 55 - Modelo de superfície para a GtCel12A. O sítio catalítico da GtCel12A apresenta o formato de fenda, típico de algumas hidrolases de glicosídeos. Os resíduos catalíticos Glu142 e Glu227 do sítio catalítico estão destacados em vermelho.	144
Figura 56 - Localização dos resíduos catalíticos da enzima GtCel12A. A. Em destaque, os resíduos catalíticos Glu142 e Glu227, separados por uma distância aproximada de 5,0 Å. B. Em destaque também, os resíduos Asp119 e Asp123, responsáveis pela formação de ligações de hidrogênio com esses resíduos catalíticos. A linha pontilhada vermelha representa as ligações de hidrogênio.	145
Figura 57 - Localização da ponte dissulfeto em estruturas homólogas de enzimas da família GH12. A. Estrutura da GtCel12A com a ponte dissulfeto (ciano) incomum, que conecta as fitas B1 e B2, da folha que se curva (B) para a formação da fenda catalítica. B. Sobreposição das estruturas homólogas (códigos PDB: 3VL8, 1KS5, 1OLR, 1OA3, 4HTM e 1H8V) com a GtCel12A, com destaque para as pontes dissulfeto (ciano) que normalmente conectam as fitas A1 e A2 ou um <i>loop</i> na região N-terminal com a fita A2 nas demais enzimas.	147

- Figura 58** - Estrutura cristalográfica da GtCel12A, com destaque para o *loop* que une as fitas B6 e B9. A. O “cordão”, como é chamado, possui 10 resíduos de aminoácidos e se estende do resíduo Gly149 da fita B6 à Ser158 da fita B9 (azul). B. A posição do cordão faz com que ele feche parcialmente uma das extremidades da fenda catalítica.....149
- Figura 59** - Alinhamento do modelo estrutural da proteína GtCel12A com estruturas depositadas no PDB que possuem maior identidade sequencial com a mesma. Os códigos PDB utilizados nesse alinhamento foram: 3VL8, 1KS5, 1OLR, 1OA3, 4H7M e 1H8V.150
- Figura 60** - Alinhamento sequencial das proteínas homólogas que possuem maior identidade com a GtCel12A, sendo todas de organismos eucariotos [*A. aculeatus* (código PDB 3VL8), *H. grisea* (1OLR), *T. citrinoviridae* (1OA3), *A. niger* (1KS4), *T. reesei* (1OA2), e *T. harzianum* (4HTM)]. Em destaque, os resíduos catalíticos (vermelho), a localização peculiar da ponte dissulfeto na estrutura da enzima GtCel12A (azul), das demais homólogas (ciano), do “cordão” (verde) e dos demais resíduos envolvidos na estabilização do substrato (laranja).151
- Figura 61** - Alinhamento das estruturas da GtCel12A e de uma GH12 de *H. grisea* (código PDB 1UU5) evidenciando que as moléculas de etileno glicol (verde) da estrutura da GtCel12A se sobrepõem ao substrato (laranja) da GH12 de *H. grisea*.152
- Figura 62** - Alinhamento da estrutura da GtCel12A com outras estruturas homólogas de organismos eucariotos (códigos PDB: 3VL8, 1KS5, 1OLR, 1OA3, 4H7M e 1H8V), evidenciando a posição dos resíduos catalíticos. A. Na estrutura da enzima GtCel12A os resíduos catalíticos em destaque são o Glu142 e Glu227. B. A possível posição dos demais resíduos importantes para a interação com o substrato nas posições 28, 43 e 137 da estrutura da GtCel12A.153

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Parâmetros estruturais da GtCel12A obtidos por SAXS.....	136
Tabela 2 -	Parâmetros e estatísticas de coleta e processamento dos dados cristalográficos da enzima GtCel12A.....	140
Tabela 3 -	Parâmetros e estatísticas resultantes do processo de refinamento dos dados cristalográficos da enzima GtCel12A.....	141
Tabela 4 -	Composição do meio de cultura CM (<i>Complete medium</i>).....	187
Tabela 5 -	Composição do meio de cultura SRM (<i>Selective Regeneration Medium</i>).....	188
Tabela 6 -	Composição do meio MM J.....	189

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de força atômica (do inglês <i>Atomic Force Microscopy</i>)
ATA	Ácido Aurintricarboxílico (do inglês <i>Aurintricarboxylic Acid</i>)
ATP	Adenosina trifosfato
Bis-Tris	Bis (2-hidroxietil) amino-Tris (hidroximetil) aminometano
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CBM	Módulo de ligação aos carboidratos (do inglês <i>Carbohydrate Binding Module</i>)
CBH	Celobiohidrolase
CBP	Bioprocesso consolidado (do inglês <i>Consolidated Bioprocessing</i>)
CCD	Dispositivo de carga acoplada (do inglês <i>Charge-Coupled Device</i>)
CCP4	<i>Collaborative Computational Project</i>
CD	Espectroscopia de dicroísmo circular (do inglês <i>Circular Dichroism</i>)
CM	Meio completo para <i>Aspergillus niger</i> (do inglês <i>Complete Medium</i>)
CMC	Carboximetilcelulose
DAM	Modelo de átomos simulados (do inglês <i>Dummy Atoms Models</i>)
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicidina trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucléico (do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)

DNS	Ácido dinitrosalicílico
dNTP	Desoxinucleosídeo trifosfato
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
EC	<i>Enzyme Commission</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês <i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>)
EG	Endoglucanase
ExG	Exoglucanase
FESEM	Microscópio eletrônico de varredura com fonte de elétrons por emissão de campo (do inglês <i>Field Emission Scanning Electron Microscope</i>)
FPLC	Cromatografia líquida de rápido desempenho (do inglês <i>Fast Performance Liquid Chromatography</i>)
GalA	Ácido α -D-galactopiranosilurônico (do inglês <i>Galactopiranosose acid</i>)
GH	Hidrolase de glicosídeo (do inglês <i>Glycoside hydrolase</i>)
GH12	Família 12 de hidrolases de glicosídeos (do inglês <i>Glycoside hydrolase family 12</i>)
GP	Grau de polimerização
HG	Homogalacturonana
IUBMB	<i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>
JGI	<i>Joint Genome Institute</i>
LC/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (do inglês <i>Liquid chromatography-Mass spectrometry</i>)
LIC	Clonagem independente de ligação (do inglês <i>Ligation Independent Cloning</i>)
LME/LNNano	Laboratório de Microscopia Eletrônica do Laboratório Nacional de Nanotecnologia
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
MEV	Microscopia eletrônica de varredura

MM J	Meio mínimo para <i>A. niger</i> suplementado com maltose (do inglês <i>Minimal Medium</i>)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
4NPC	4-nitrofenil- β -D-celobiosídeo (do inglês <i>4-nitrophenyl-β-D-cellobioside</i>)
4NPG	4-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (do inglês <i>4-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside</i>)
NSRM	Meio de regeneração não seletivo (do inglês <i>Non-selective Regeneration Medium</i>)
PASC	Celulose amorfa (do inglês <i>Phosphoric Acid Swollen Cellulose</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polietileno glicol
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>)
SAXS	Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (do inglês <i>Small Angle X-ray Scattering</i>)
SDS	Dodecil sulfato de sódio (do inglês <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SDS-PAGE	Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (do inglês <i>Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
Solução S/C	Solução de sorbitol e cloreto de cálcio
SEM	Microscopia eletrônica de varredura (do inglês <i>Scanning Electron Microscopy</i>)
SHF	Hidrólise separada da fermentação (do inglês <i>Separate Hydrolysis and Fermentation</i>)
SSCF	Sacarificação simultânea à cofermentação (do inglês <i>Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation</i>)

SSF	Sacarificação e fermentação simultânea (do inglês <i>Simultaneous Saccharification and Fermentation</i>)
SRM	Meio de regeneração seletivo (do inglês <i>Selective Regeneration Medium</i>)
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão (do inglês <i>Transmission Electron Microscopy</i>)
Tris-HCl	Tris (hidroximetil) aminometano-Ácido clorídrico
XEG	Endo- β -1,4-glucanase específica de xiloglucano
XGA	Xilogalacturonana

LISTA DE SÍMBOLOS

pH	potencial hidrogeniônico
°C	graus Celsius
μg	micrograma
μL	microlitro
rpm	rotações por minuto
U	unidade de atividade enzimática
M	molar (mol L^{-1})
mM	milimolar
ng	nanograma
kDa	quilodalton (10^3 g mol^{-1})
nm	nanômetro
ε	coeficiente de extinção molar
K_{av}	coeficiente de partição
μmol	micromol
μM	micromolar
T_m	temperatura de <i>melting</i>
K_m	constante de Michaelis-Menten
V_{max}	velocidade máxima
nM	nanomolar
keV	kilo elétron-volt
μm	micrômetro
mA	miliampère
Θ	elipticidade
UV	ultravioleta
D_{max}	dimensão máxima
R_g	raio de giro
p(r)	função de distribuição de distâncias
I(q)	intensidade do vetor de espalhamento
λ	comprimento de onda
Å	Ângstron
χ	parâmetro estatístico de discrepância

F_{calc} fator de estrutura calculado

F_{obs} fator de estrutura observado

R_{factor} fator R

SUMÁRIO

1 Introdução	39
2 Revisão de literatura	41
2.1 Energia de biomassa	41
2.2 Composição da biomassa	42
2.3 Energia no Brasil	48
2.4 Etanol como combustível	49
2.4.1 Etanol de primeira geração no Brasil	49
2.4.2 Etanol de segunda geração	50
2.5 O bagaço de cana como biomassa para a produção de etanol	52
2.6 Biorrefinarias	53
2.6.1 Pré-tratamento	56
2.6.2 Hidrólise enzimática	57
2.6.3 Fermentação alcoólica	59
2.7 Celulases	60
2.7.1 Endoglucanases	61
2.7.2 Exoglucanases	62
2.8 β -glucosidases	62
2.9 Sinergismo	63
2.10 Classificação das celulases	64
2.11 A família GH 12	66
2.12 Microorganismos produtores de celulases	66
2.12.1 Fungos produtores de celulases	68
2.12.2 O fungo <i>Gloeophyllum trabeum</i>	68
3 Justificativa	71
4 Objetivos	75
4.1 Objetivo geral	75
4.2 Objetivos específicos	75
5 Material e Métodos	79
5.1 Clonagem independente de ligação (LIC)	79
5.1.1 Obtenção do cDNA	82

5.1.2 Amplificação gênica	82
5.1.3 Tratamento com T4 DNA polimerase.....	83
5.1.4 Preparo do vetor	83
5.1.5 Transformação em <i>E. coli</i> DH5 α competentes	85
5.1.6 Confirmação das colônias positivas	85
5.2 Manipulações com <i>Aspergillus niger</i> py11	86
5.2.1 O gênero <i>Aspergillus</i> sp.....	86
5.2.2 Obtenção dos protoplastos	88
5.2.3 Transformação dos genes na cepa py11	90
5.2.4 Ensaio de expressão.....	92
5.3 Identificação da proteína.....	93
5.4 Escalonamento da produção de proteínas recombinantes em <i>A. niger</i> py11	93
5.5 Purificação	94
5.6 Caracterização Bioquímica e Biofísica da proteína recombinante	95
5.6.1 Estimativa da massa molecular real por cromatografia de exclusão molecular	95
5.6.2 Eletroforese em gel nativo (em condições não-desnaturantes).....	96
5.6.3 Especificidade por substratos.....	97
5.6.4 Determinação das condições ótimas	98
5.6.5 Atividade enzimática residual.....	98
5.6.6 Experimento de estabilidade térmica avaliado pela técnica de Thermofluor	99
5.7 Determinação dos parâmetros cinéticos.....	100
5.8 Microscopia eletrônica de varredura com fonte de elétrons por emissão de campo (FESEM).....	101
5.9 Espectroscopia de Dicroísmo circular.....	102
5.10 Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS).....	104
5.10.1 Estabilidade térmica avaliada por SAXS	106
5.11 Ensaio de cristalização	107
5.12 Coleta e processamento de dados de difração de raios-X.....	110
5.12.1 Obtenção das fases e refinamento das estruturas cristalográficas.....	113
6 Resultados e Discussão.....	117
6.1 Clonagem e produção em <i>A. niger</i> py11	117
6.2 Produção e purificação da proteína.....	117
6.3 Identificação por espectrometria de massas.....	118
6.4 Caracterização Bioquímica	119

6.4.1 Estimativa da massa molecular real por cromatografia de exclusão molecular	119
6.4.2 Eletroforese em gel nativo (em condições não-desnaturantes)	120
6.4.3 Especificidade por substratos	120
6.4.4 Determinação das condições ótimas para a atividade da enzima e atividade residual ..	122
6.4.5 Estabilidade térmica avaliada por Thermofluor	124
6.5 Cinética enzimática.....	127
6.6 Microscopia eletrônica de varredura com fonte de elétrons por emissão de campo	128
6.7 Dicroísmo circular	131
6.7.1 Estabilidade térmica avaliada por CD	132
6.8 SAXS	133
6.8.1 Estabilidade térmica avaliada por SAXS	136
6.9 Cristalização	138
6.10 Coleta e processamento dos dados de difração de raios-X.....	138
6.10.1 Obtenção das fases e refinamento das estruturas cristalográficas	140
6.11 Análise do modelo cristalográfico e a relação estrutura-função da GtCel12A	142
7 Conclusões e perspectivas	157
Referências	161
ANEXO I.....	187
ANEXO II.....	191

Introdução



“Querem que vos ensine o modo de chegar à ciência verdadeira? Aquilo que se sabe, saber que se sabe; aquilo que não se sabe, saber que não se sabe; na verdade é este o saber.”

Confúcio



1 Introdução

Nos últimos trinta anos, a população mundial enfrenta uma crise energética. O esgotamento das fontes fósseis de energia, a imposição de restrições ambientais a exploração de recursos e o constante aumento dos preços do petróleo são algumas das causas dessa crise.¹

Concomitantemente, observa-se um aumento da demanda energética mundial e a necessidade de expansão do acesso à energia pelo mundo. Sabe-se que pelo menos um quarto da humanidade não tem acesso a serviços modernos de distribuição de energia e, por isso carecem desse recurso.² Diante dessas necessidades, torna-se necessário diversificar e ampliar as fontes energéticas, principalmente, com o intuito de reduzir a dependência das fontes fósseis (e não renováveis) como petróleo, gás natural e carvão mineral.³

Fontes renováveis constituem uma solução viável para garantir um desenvolvimento econômico, social e ambiental sustentáveis. Adicionalmente, visa-se a redução da emissão dos gases-estufa responsáveis pelo aquecimento global, oriundos principalmente da queima de combustíveis fósseis e a expansão do acesso à energia pelo mundo.² Nesse âmbito, o uso de biomassa na produção de energia, como uma fonte renovável é considerado bastante promissor.⁴

Países tropicais, como o Brasil, possuem abundantes recursos de biomassa e estudos que visem o aproveitamento dessas fontes na produção de energia, tornam-se necessários e significantes.⁵ No entanto, o processo de obtenção de biocombustíveis a partir de biomassa ainda apresenta inúmeros desafios.⁶⁻⁷

A biomassa lignocelulósica é uma fonte de baixo custo e abundante que tem o potencial de suportar a produção em larga escala de combustíveis e produtos químicos.⁸ A celulose e a hemicelulose, duas das principais moléculas constituintes da biomassa vegetal, podem ser hidrolisadas a açúcares e estes, podem posteriormente ser convertidos tanto quimicamente, como enzimaticamente em etanol e butanol ou inúmeros outros produtos como ácidos orgânicos, acetona e glicerol.⁹

Um dos métodos de conversão da biomassa vegetal é a hidrólise enzimática, um processo que utiliza enzimas, catalisadores biológicos, para “quebrar” as moléculas maiores, como o polímero de celulose, em açúcares menores e é considerada uma alternativa promissora para o futuro da produção de biocombustíveis.¹⁰ No entanto, essa etapa ainda é um obstáculo na produção de biocombustíveis de segunda geração e inúmeros gargalos ainda

existem, como por exemplo, a recalcitrância da parede celular vegetal e a consequente inacessibilidade das enzimas hidrolíticas a seus substratos.^{7, 11-12}

Outros desafios incluem a seleção e a produção de enzimas mais eficientes, com alta atividade, estabilidade e especificidade, além da diminuição dos custos de produção das mesmas, que ainda é alto.¹³ Nesse contexto, inúmeros fatores devem ser considerados para alcançarmos o alto rendimento no processo, dentre eles, a natureza do substrato utilizado¹⁴ e as condições de reação, como pH de cultivo, temperatura, concentração de substrato, de enzima, e o sinergismo entre enzimas.¹⁵⁻¹⁶

Adicionalmente, para que a biomassa vegetal se torne disponível ao ataque enzimático é necessário aplicarmos um pré-tratamento, seja ele de natureza química, física ou biológica, para a remoção de algumas moléculas que podem eventualmente dificultar o processo, como a lignina e a hemicelulose, além da redução do grau de cristalinidade da celulose e do aumento da porosidade do material. Tais abordagens visam tornar o substrato celulósico mais acessível às enzimas.^{14,17} Além disso, na etapa de pré-tratamento é necessário utilizar condições suaves que minimizem o efeito da degradação dos açúcares e também da lignina em produtos inibidores do processo.¹⁸

No presente trabalho, o foco é a tecnologia de segunda geração de biocombustíveis, mais precisamente a etapa de hidrólise enzimática da biomassa. Para contribuir para esse processo, estudamos uma endoglucanase, a Cel12A que compõe o complexo celulolítico do fungo *Gloeophyllum trabeum*, um fungo basidiomiceto, conhecido por produzir inúmeras enzimas com capacidade de atuar na degradação tanto da celulose, quanto da hemicelulose.¹⁹

Os resultados aqui apresentados incluem a caracterização bioquímica, biofísica e estrutural dessa enzima por diferentes técnicas, o que pode contribuir de maneira substancial para a compreensão do mecanismo molecular de ação dessa enzima e de outras enzimas da família 12 de hidrolases de glicosídeos (GH12). Tais resultados podem ainda, contribuir para a otimização da etapa de hidrólise enzimática da biomassa vegetal, para a produção de combustíveis de segunda geração.

2 Revisão de literatura

2.1 Energia de biomassa

O termo biomassa pode ser definido como todo recurso renovável, oriundo de matéria orgânica de origem animal ou vegetal, que pode ser transformado em energia mecânica, térmica ou elétrica.⁵

A biomassa vegetal é formada principalmente de celulose, hemicelulose e lignina (figura 1). A massa seca de uma parede celular consiste tipicamente de 35 a 50% de celulose, 20 a 35% de hemicelulose e 10 a 25% de lignina, com variações segundo a espécie de planta e o tipo celular.²⁰

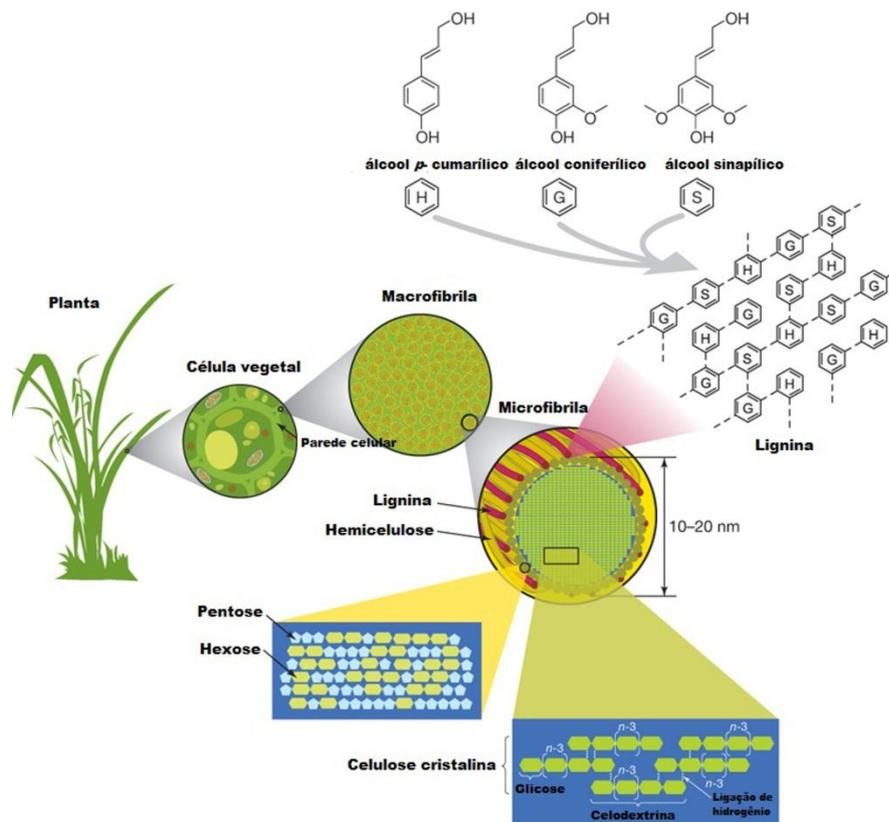


Figura 1 - Esquema representativo das principais moléculas constituintes da parede celular vegetal. O principal componente da lignocelulose é a celulose, uma cadeia de moléculas de glicose unidas por ligações β -1,4. A hemicelulose, o segundo componente mais abundante da lignocelulose, é composta por açúcares de 5 a 6 carbonos, como arabinose, galactose, glicose, manose e xilose. A lignina é composta principalmente por componentes fenólicos chamados álcool p-cumarílicos (H), álcool coniferílico (G) e álcool sinapílico (S). A celulose, a hemicelulose e a lignina formam estruturas chamadas microfibrilas, que estão organizadas em macrofibrilas, que por sua vez, medeiam a estabilidade estrutural na parede celular vegetal. Adaptado de ²¹.

A biomassa lignocelulósica é normalmente bastante resistente à ação de produtos químicos e enzimas.²² Essa recalcitrância se deve à natureza do tecido epidérmico da planta, particularmente, às ceras da cutícula e epicutícula, ao arranjo e à densidade dos feixes vasculares, à quantidade relativa de tecido esclerenquimatoso de parede grossa, ao grau de lignificação²² e à heterogeneidade e complexidade estrutural dos constituintes da parede celular, como as microfibrilas e os polímeros de matriz.²³

Tais características estruturais e químicas da biomassa afetam a penetração de líquidos, bem como a acessibilidade e a atividade das enzimas, influenciando os custos de conversão.⁷ Outra barreira relaciona-se aos desafios da atuação das enzimas sobre substratos insolúveis²⁴ e à presença de inibidores da posterior etapa de fermentação, que podem naturalmente estar presentes nas paredes celulares vegetais ou serem gerados durante os processos de conversão como produtos das reações.²⁵

2.2 Composição da biomassa

Na biomassa vegetal, a celulose, um polímero de moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -1,4 (figura 2) é arranjada em fibrilas formadas por várias moléculas de celulose paralelas e ligadas entre si por ligações de hidrogênio e forças de van der Waals, as quais se ligam à lignina e à hemicelulose.²⁶ As fibrilas de celulose geralmente possuem algumas áreas ordenadas e outras desordenadas, denominadas cristalinas e amorfas, respectivamente, e sabe-se que a porção cristalina das fibrilas de celulose é mais resistente à hidrólise enzimática.²⁷

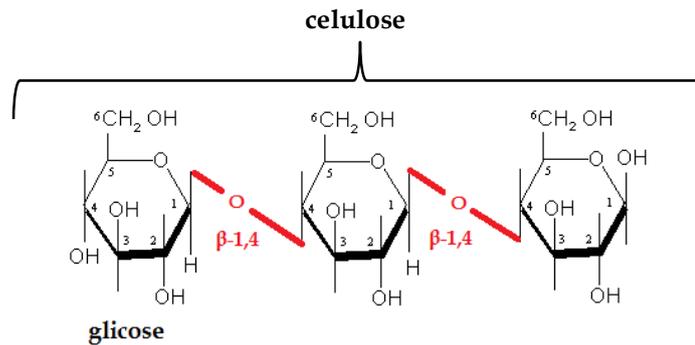


Figura 2 - Representação esquemática da molécula de celulose. A celulose é formada a partir de monômeros de glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo β -1,4 (evidenciadas em vermelho).

Em nível molecular, o núcleo de celulose cristalina das microfibrilas da parede celular é altamente resistente à hidrólise química e enzimática devido à sua estrutura, onde cadeias de celodextrinas estão precisamente arranjadas.²⁸ A conformação em cadeia dos resíduos de glicose na celulose dispõe os grupos hidroxila em uma orientação radial (equatorial) e os átomos alifáticos de hidrogênio em posições axiais. Como resultado, há uma forte interação de hidrogênios entre as cadeias adjacentes em uma folha de celulose e interações hidrofóbicas mais fracas entre as folhas de celulose.²⁹ A forte rede de interações de hidrogênio intercadeias contribui para tornar a celulose cristalina resistente à hidrólise enzimática, enquanto que a hemicelulose e a celulose amorfa são mais facilmente digeridas.²⁸ Adicionalmente, a face hidrofóbica das folhas de celulose torna a celulose cristalina resistente à hidrólise ácida, devido à formação de uma densa camada de água próxima à superfície da celulose hidratada.²⁹

As hemiceluloses são polímeros ramificados de baixa massa molar, compostos por unidades de monossacarídeos contendo cinco (pentoses) ou seis carbonos (hexoses). Os principais açúcares constituintes das hemiceluloses são a D-xilose, L-arabinose, D-glicose, D-galactose, D-manose, D-ácido glucurônico, ácido 4-O-metil-D-ácido glucurônico, entre outros (figura 3).³⁰

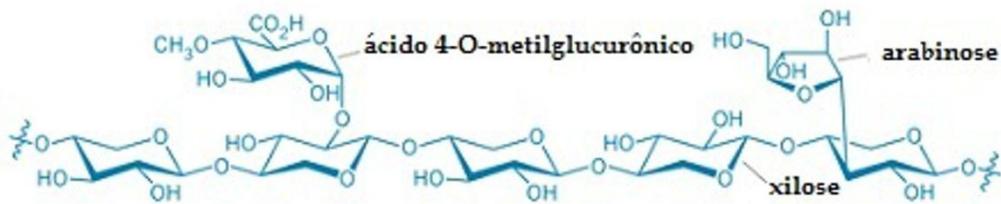


Figura 3 - Representação esquemática de uma molécula de hemicelulose. Em destaque, alguns dos principais açúcares constituintes da hemicelulose, a xilose, a arabinose e o ácido 4-metilglucurônico. Adaptado de ³¹.

Na parede celular primária, as moléculas de hemiceluloses se associam às moléculas de celulose nas ramificações (figura 4) e se entrecruzam com as moléculas de lignina na parede celular secundária, resultando numa complexa e resistente rede. ²¹

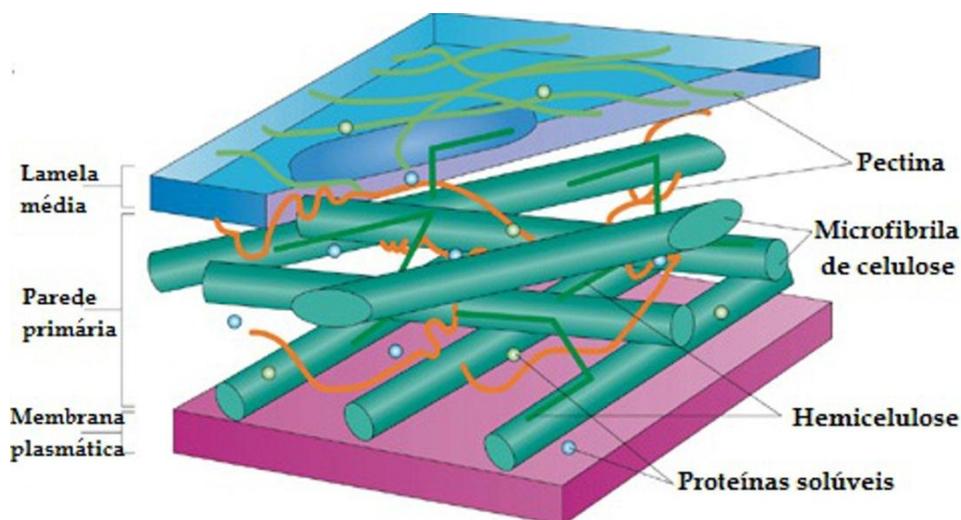


Figura 4 - Modelo tridimensional da parede celular vegetal primária. Parede celular primária contendo microfibrilas de celulose, hemicelulose, pectina, lignina e proteínas solúveis, evidenciando a complexa interação entre as moléculas constituintes da parede celular vegetal. Adaptado de ³².

O xiloglucano e o arabinoxilano são as hemiceluloses mais abundantes e detalhes de suas estruturas variam ligeiramente entre as espécies vegetais.²² O xiloglucano tem uma cadeia similar à da celulose e se associa com ramificações de xilose em três de quatro resíduos de glicose. A xilose por sua vez, também pode estar associada a resíduos de galactose e fucose.

O arabinoxilano é constituído de um esqueleto de (1,4)- β -D-xilano com ramos de arabinose. Outros resíduos, como os ésteres de ácidos glucurônicos e o ácido ferrúlico, também estão associados em arabinoxilanos que são, particularmente, abundantes em gramíneas, como algumas espécies de cereais. Os mananos também são encontrados em paredes celulares primárias e, provavelmente, funcionam do mesmo modo que o xiloglucano e o arabinoxilano.²²

A remoção da hemicelulose da parede celular tem sido associada ao aumento substancial da hidrólise da celulose, mesmo com um alto conteúdo de lignina. Isso ocorre porque a hemicelulose dificulta o contato físico das celulasas à superfície da celulose, ao adsorver tais enzimas. Consequentemente, a remoção da hemicelulose pode aumentar a área superficial e o volume do poro, tornando a celulose mais acessível ao ataque enzimático.³³⁻³⁴

A lignina é composta basicamente de unidades de fenilpropano, que formam uma molécula tridimensional e amorfa (figura 5) e que preenche os espaços na parede celular vegetal entre as moléculas de celulose, pectina e hemicelulose³⁵. Essa característica confere à lignina a capacidade de atuar como uma cola que mantém a matriz lignocelulósica coesa, conferindo suporte estrutural à planta, impermeabilidade e alta resistência da parede celular à degradação, além de proteger a planta da invasão de patógenos e predadores.^{21, 35-36}

O acoplamento das unidades de fenil-propano na molécula de lignina não ocorre de maneira regular e repetitiva, o que é atribuído ao mecanismo de biossíntese da mesma, um processo de acoplamento de radicais livres, a partir da reação de três diferentes alcoóis cinâmicos precursores.³⁵ Os diferentes tipos de acoplamento entre os precursores dão origem a vários tipos de ligação entre as unidades de fenilpropano, que são geralmente não hidrolisáveis sob condições biológicas.³⁷

A lignina é conhecida por limitar a degradação enzimática dos polissacarídeos no processo de bioconversão da biomassa e, por ser uma molécula hidrofóbica, impede a entrada de água nos polímeros internos da parede celular.³⁵ Dessa forma, a mesma limita a ação de enzimas hidrofílicas e, em alguns casos é tóxica para as enzimas devido aos compostos fenólicos presentes em sua composição.³⁵

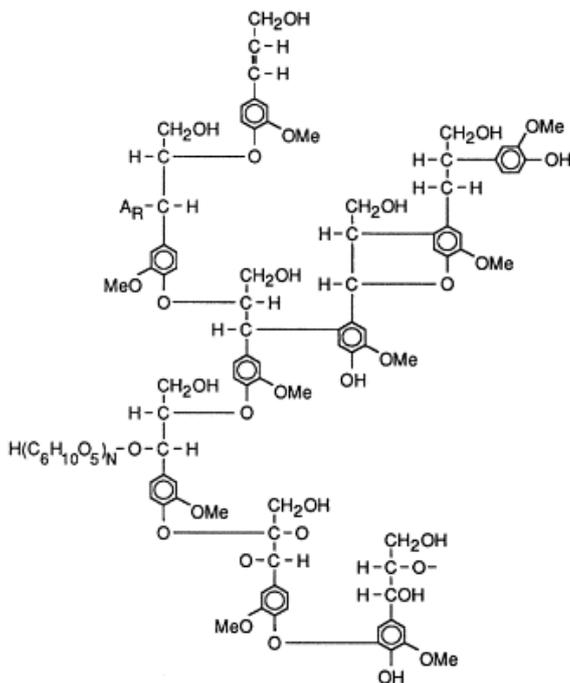


Figura 5 - Representação esquemática da complexa molécula de lignina, tipicamente encontrada em coníferas.³⁸

As pectinas compõem um grupo complexo, heterogêneo e bastante diverso de oligos e polissacarídeos da parede celular. O esqueleto péctico é primariamente um homopolímero de ácido galacturônico unido por ligações glicosídicas do tipo α -1,4, com grau variável de grupos carboxila metil esterificados e se encontra associado a outros componentes na parede celular vegetal.³⁹

As pectinas são formadas por dezessete diferentes monossacarídeos organizados em polissacarídeos distintos, a partir de mais de vinte diferentes ligações, formando uma rede quando unidos.^{39, 40} Essas redes se agrupam em diferentes tipos de cadeias constituídas por ácidos urônicos, hexoses, pentoses e metilpentoses (figura 6).⁴¹ Nas pectinas, diversas unidades estruturais podem ser substituídas por metanol, ácido acético e ácidos fenólicos.⁴¹ Os açúcares podem existir nas formas furanosídicas ou piranosídicas e com diferentes anômeros (α ou β), com diversos tipos de ligações entre os monômeros, tais como α -1,4; α -1,5; β -1,3; β -1,4 e β -1,6.⁴²

O polissacarídeo péctico mais abundante é a homogalacturonana (HG), que representa cerca de 60-65% do total da pectina^{39, 43} e consiste em um polímero linear de ácido α -D-galactopiranosilurônico (GalA) unido por ligações α -1-4. Nele, os grupos carboxila estão parcialmente metil-esterificados e as cadeias podem, em função da fonte vegetal, ser parcialmente O-acetiladas no C-3 ou C-2.^{40, 43-44}

Outros polissacarídeos pécnicos são consideravelmente mais complexos estruturalmente do que a HG e são eles, a ramnogalacturonana I e II, a xilogalacturonana, a arabinana, a arabinogalactana I e II e a apiogalacturonana, com características estruturais particulares e distintas.³⁹ A ramnogalacturonana, por exemplo, consiste de resíduos alternados de ácido galacturônico e ramnose e, provavelmente, possui ramificações laterais que contém outros domínios pectina.³⁹ Já a homogalacturonana é uma cadeia linear de resíduos de ácido galacturônico, enquanto que a xilogalacturonana (XGA) é modificada pela adição de ramificações de xilose. Os grupos carboxila da homogalacturonana e da xilogalacturonana são frequentemente metil-esterificados, uma modificação que bloqueia os grupos ácidos e reduz sua habilidade em formar géis.^{39, 45}

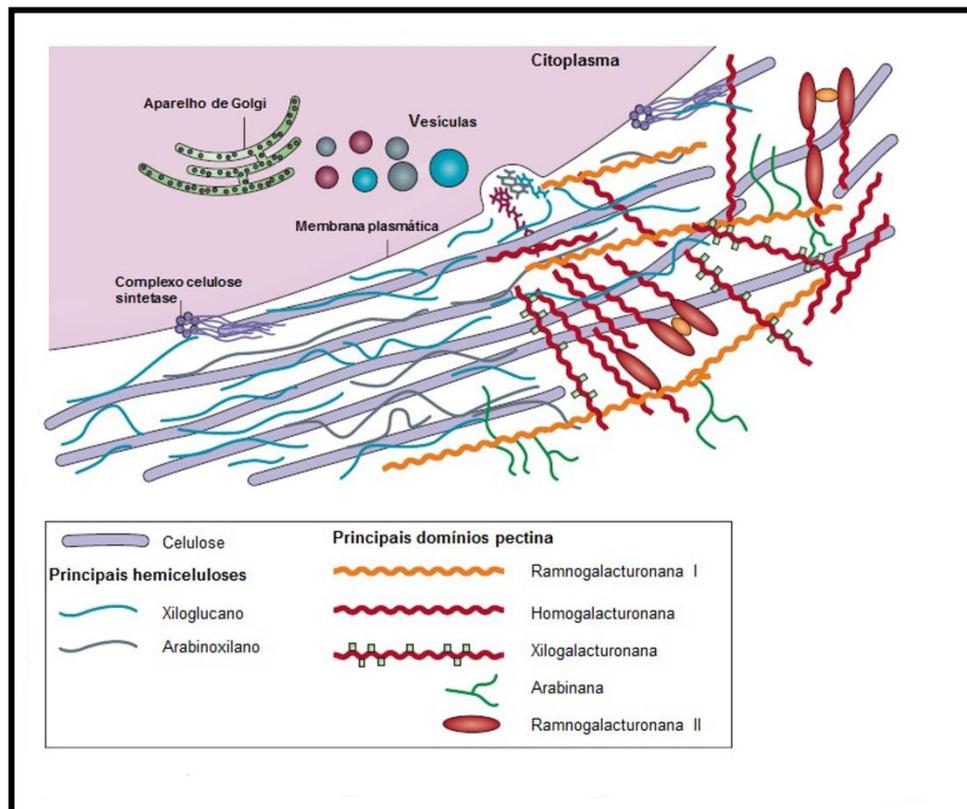


Figura 6 - Estrutura da parede celular primária com destaque para os domínios pectina. As microfibrilas de celulose (hastes roxas) são sintetizadas por grandes complexos hexaméricos na membrana plasmática, enquanto que hemiceluloses e pectinas, que compõem a matriz de polissacarídeos, são sintetizadas no aparelho de Golgi e são depositadas na superfície da parede por vesículas. A rede de celulose-hemicelulose é mostrada na parte esquerda da parede celular, sem pectinas, sendo estas enfatizadas na parte direita da figura. Na maioria das espécies, o principal componente da hemicelulose é o xiloglucano (azul), enquanto as hemiceluloses como os arabinoxilanos (cinza) e mananos (não mostrados) são encontradas em menor quantidade. O principal polissacarídeo da pectina é a ranogalacturonana I e a homogalacturonana, com quantidades menores de xilogalacturonana, arabinana, arabinogalactana I (não mostrado) e ranogalacturonana II. Adaptado de ²².

Inúmeras evidências indicam um papel fundamental da pectina no crescimento da planta incluindo o desenvolvimento, a morfogênese, a defesa, a adesão célula-célula, a estrutura da parede, a sinalização, a expansão celular, a porosidade da parede, a ligação de íons, os fatores de crescimento e enzimas, a hidratação da semente, o crescimento do tubo polínico, a abscisão da folha e o desenvolvimento dos frutos.^{43, 46}

2.3 Energia no Brasil

O Brasil é reconhecido mundialmente pelo forte componente renovável de sua matriz energética. Em 2012, aproximadamente 44,1% da toda a energia utilizada no país adveio de fontes renováveis (figura 7). O setor sucroenergético tem papel-chave nesse quadro: a cana-de-açúcar, matéria prima para a produção de etanol e bioeletricidade, é a segunda maior fonte de energia do país, respondendo por 18% de toda a energia consumida. Esses números são bem superiores a média mundial de 13,3%.⁴⁷

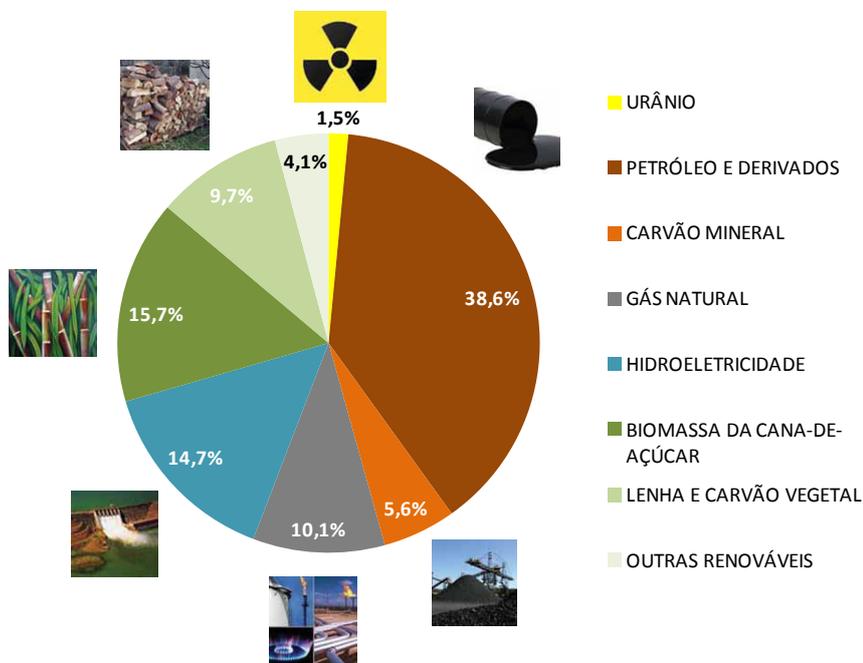


Figura 7 - Matriz energética brasileira em 2012. As fontes renováveis (hidroeletricidade, lenha e carvão vegetal, biomassa da cana-de-açúcar e outras fontes renováveis, como a lixívia) correspondem a 44,1% da oferta interna de energia, já as não renováveis (petróleo e derivados, gás natural, carvão mineral e urânio) por 55,9%. Adaptado de ⁴⁷.

Adicionalmente, o Brasil apresenta um elevado potencial na utilização de biomassa para a produção de energia. A principal fonte de biomassa utilizada no país, provém de produtos derivados da cana-de-açúcar, resíduos gerados pela prática da agricultura, madeira de reflorestamento e óleos vegetais.²

2.4 Etanol como combustível

Ao contrário dos combustíveis fósseis, o etanol é uma fonte de energia alternativa produzida por meio da fermentação de açúcares e, tem sido amplamente empregado como substituto da gasolina.¹⁴

O etanol de cana-de-açúcar, se produzido sob as devidas condições, é essencialmente um combustível renovável e tem uma grande vantagem em relação à gasolina, no que concerne a redução de gases do efeito estufa e o melhoramento da qualidade do ar em áreas metropolitanas.⁴⁸

Tecnicamente, o etanol é um excelente combustível para os motores. Ele apresenta octanagem número 98, enquanto o da gasolina é 80.⁴⁹ A octanagem é a medida de resistência de um combustível à autoignição e à detonação e permite inferir o comportamento de um motor alimentado com esse combustível.⁵⁰ Adicionalmente, o etanol possui pressão de vapor mais baixa que a da gasolina, o que reduz as emissões evaporativas. Além disso, seus gases de escape são menos tóxicos e com menor reatividade atmosférica do que os da gasolina. A inflamabilidade do etanol no ar, também é menor que a da gasolina, o que reduz o risco e a severidade dos incêndios em veículos.⁴⁹

2.4.1 Etanol de primeira geração no Brasil

Atualmente, a produção de etanol no Brasil é feita exclusivamente por meio de tecnologias de primeira geração, baseadas na utilização do conteúdo de sacarose presente no suco da cana (figura 8). No entanto, a sacarose representa apenas um terço do conteúdo

energético da planta, por isso, é imprescindível que se realize o aproveitamento energético das outras partes, como o bagaço e a palha, por meio de tecnologias alternativas.⁴⁸

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de etanol, atrás apenas dos EUA e no país, somente em 2012, a área plantada de cana de açúcar foi de 9,752,328 hectares, com destaque para o estado de São Paulo, liderando os estados produtores.⁵¹

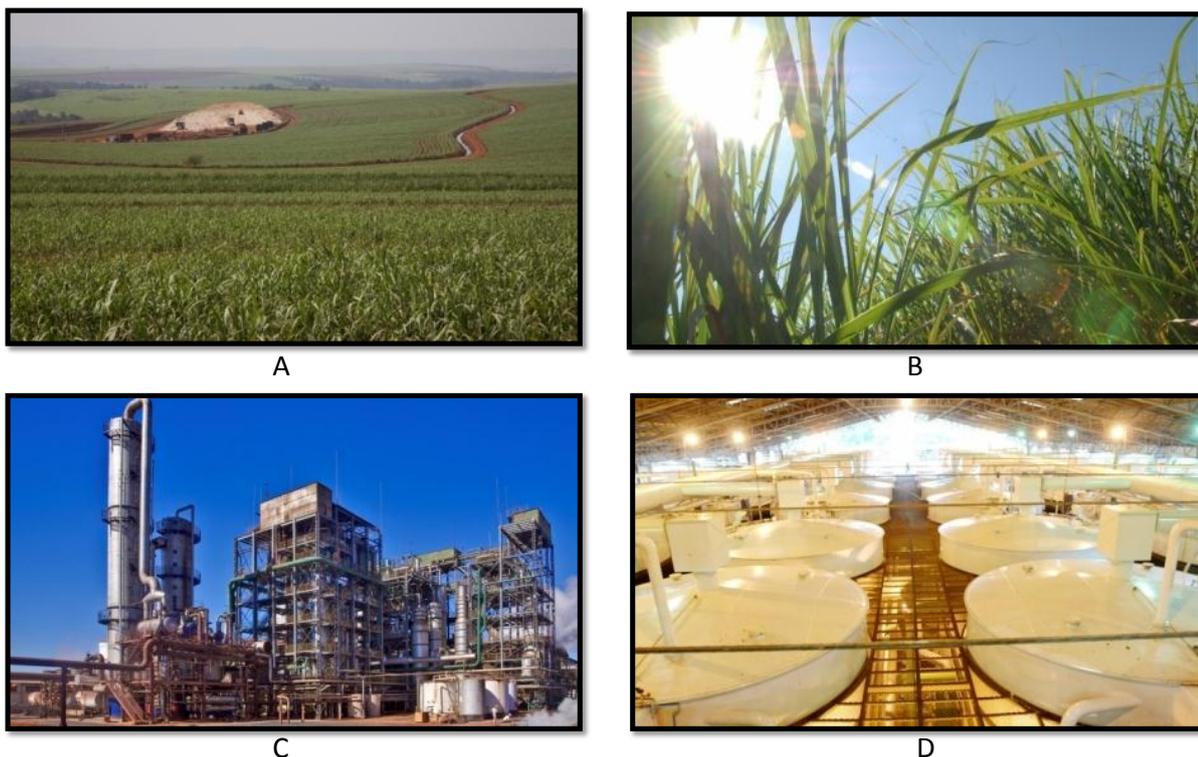


Figura 8 - Produção de cana-de-açúcar no Brasil. **A e B.** Plantação de cana-de-açúcar. **C.** Usina de cana-de-açúcar onde o etanol é produzido. **D.** Tanques de fermentação dos açúcares para a produção de etanol. Adaptado de⁵¹.

2.4.2 Etanol de segunda geração

Uma fonte potencialmente interessante para a produção de etanol a baixo custo consiste na utilização de materiais lignocelulósicos como resíduos de culturas e de sólidos animais, gramíneas, serragem, aparas de madeira, entre outros.¹⁴ Essa tecnologia de produção de etanol a partir desses materiais é denominada de segunda geração de biocombustíveis e

envolve duas etapas principais, a hidrólise da celulose a açúcares redutores fermentescíveis e a posterior fermentação alcoólica desses açúcares em etanol.⁵²

Essas duas etapas principais de conversão da celulose em etanol, a hidrólise enzimática e a fermentação alcoólica, podem ser realizados de maneira sequencial, no processo onde a hidrólise e a fermentação ocorrem separadamente (SHF), ou de maneira simultânea, por meio de outros dois processos: a sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) ou a sacarificação simultânea à cofermentação (SSCF).⁵² Ambas as técnicas requerem a aplicação de um extensivo pré-tratamento da matéria-prima celulósica, seguido da adição de coquetéis de enzimas celulolíticas com o intuito de hidrolisar a celulose e, dessa forma, liberar monômeros de glicose necessários para a fermentação alcoólica.⁵³

O processo SHF apresenta como principal vantagem, a possibilidade de ambas as etapas serem conduzidas em suas condições ótimas. No entanto, como desvantagens temos o acúmulo de açúcares intermediários da hidrólise, o que pode causar inibição às enzimas e a redução na conversão final de glicose devido à adsorção de parte do açúcar no sólido residual da hidrólise.⁵⁴

Nos processos simultâneos há um menor custo de investimento, pois neles as duas etapas estão agrupadas em um mesmo vaso reacional. Adicionalmente, nessa forma de condução as enzimas são menos passíveis de sofrer inibição pelos produtos da hidrólise, pois a glicose liberada é concomitantemente fermentada.⁵⁴ No processo SSCF, a cofermentação, que é a fermentação de pentoses e hexoses provenientes da fração hemicelulósica em um mesmo vaso reacional, ocorre concomitantemente à hidrólise do substrato.^{52, 55}

Uma estratégia alternativa de processamento é denominada Bioprocesso Consolidado (CBP), onde a produção de celulases, a hidrólise do substrato e a fermentação estão acopladas em um processo operado por microorganismos que produzem enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas.^{52, 56-57} O CBP tem o potencial de reduzir os custos da produção de bioetanol devido à simplificação do processamento da matéria prima, com menor gasto de energia (e consequentemente melhor balanço energético) e maior eficiência de conversão do que os processos baseados em SSF, o que o torna um processo economicamente atrativo para a produção de biocombustíveis.^{52, 56-57}

2.5 O bagaço de cana como biomassa para a produção de etanol

Atualmente, um dos recursos de maior potencial para a geração de energia no país é o bagaço de cana-de-açúcar. A alta produtividade alcançada pela lavoura canavieira disponibiliza uma enorme quantidade de matéria orgânica sob a forma de bagaço nas usinas e destilarias de cana-de-açúcar. Além disso, o período de colheita da cana coincide com o de estiagem das principais bacias hidrográficas do parque hidroelétrico brasileiro, tornando a opção ainda mais vantajosa, no caso da produção de energia elétrica.⁵

O bagaço de cana-de-açúcar consiste em um resíduo dos talos da cana (figura 9) após o esmagamento e a extração do suco,⁵⁸ e possui grande heterogeneidade morfológica devido à sua complexa estrutura de feixes de fibras e outros elementos estruturais, tais como vasos condutores, parênquima e células epiteliais.⁵⁹ O bagaço é composto de aproximadamente 19 a 24% de lignina, 27 a 32% de hemicelulose, 32 a 44% de celulose e 4,5 a 9% de cinzas. O restante é principalmente lignina misturada com quantidades menores de minerais, ceras e outros compostos.⁶⁰

As usinas de cana geram aproximadamente 270-280 kg de bagaço (com 50% de umidade) por tonelada de cana de açúcar⁶¹ e, a produção anual de bagaço é atualmente estimada em 186 milhões de toneladas.⁶²

Atualmente, a agroindústria da cana queima o bagaço em um processo chamado cogeração, oferecendo energia para os maquinários e calor para o processamento e a destilação. O excesso de energia na forma de calor é utilizado para gerar bioeletricidade, permitindo dessa forma à biorrefinaria ser autossuficiente na utilização de sua energia.⁵⁰

A implantação da tecnologia de etanol de bagaço de cana no Brasil é bastante favorável, porque o processo de produção pode ser feito de forma anexa às unidades produtoras de açúcar/etanol já existentes, o que requer menores investimentos, infraestrutura, logística e fornecimento de energia. Adicionalmente, o bagaço é gerado nas unidades industriais e, como tal, sem custos de transporte. Este cenário é promissor, porque para cada 10 milhões de toneladas de biomassa seca gerada, 600 milhões de galões de etanol poderiam ser produzidos, considerando o uso apenas da parte celulósica.⁶²

A conversão dessa biomassa excedente poderia aumentar o potencial econômico da cana, diminuindo as áreas de terra requeridas para as culturas agrícolas, o que também poderia

reduzir os impactos sociais e ambientais, como por exemplo a perda da biodiversidade e a utilização da água e da terra.⁶³

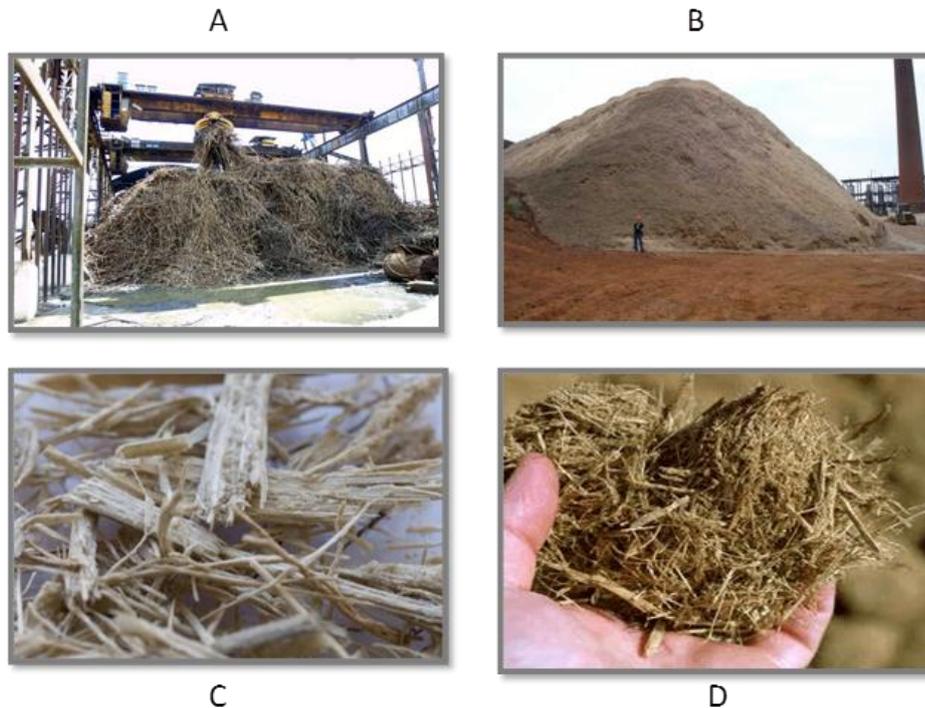


Figura 9 - Bagaço de cana-de-açúcar. **A e B** - Bagaço gerado como resíduo nas usinas de açúcar e álcool.^{64- 65}. **C e D**. Detalhe do aspecto e morfologia do bagaço.⁶⁶⁻⁶⁷

2.6 Biorrefinarias

Biorrefinarias são unidades produtivas que integram processos e equipamentos capazes de produzir biocombustíveis, eletricidade e produtos químicos de alto valor agregado, a partir de biomassa.⁶⁸ Nessas unidades, a plataforma bioquímica de produção de bioetanol envolve cinco passos-chave: pré-tratamento, produção de celulases, hidrólise enzimática, fermentação e recuperação do produto, como demonstrado na figura 10.⁶⁹

O principal obstáculo que ainda dificulta a difusão e a utilização da biomassa celulósica é a ausência de uma tecnologia de processamento de baixo custo e a necessidade de redução dos custos das etapas intermediárias (pré-tratamento, produção de celulases e

hidrólise enzimática), que são essenciais para tornar as biorrefinarias de celulose economicamente viáveis.⁷⁰

Nesse âmbito, outro desafio consiste no aperfeiçoamento da etapa de pré-tratamento da biomassa com o intuito de melhorar a eficiência de hidrólise, o que pode ser alcançado com a remoção da lignina e da hemicelulose da parede celular, visto que estas dificultam o acesso das celulasas a seu substrato. Outra abordagem, inclui a redução da cristalinidade da celulose e o aumento de sua porosidade.⁷¹

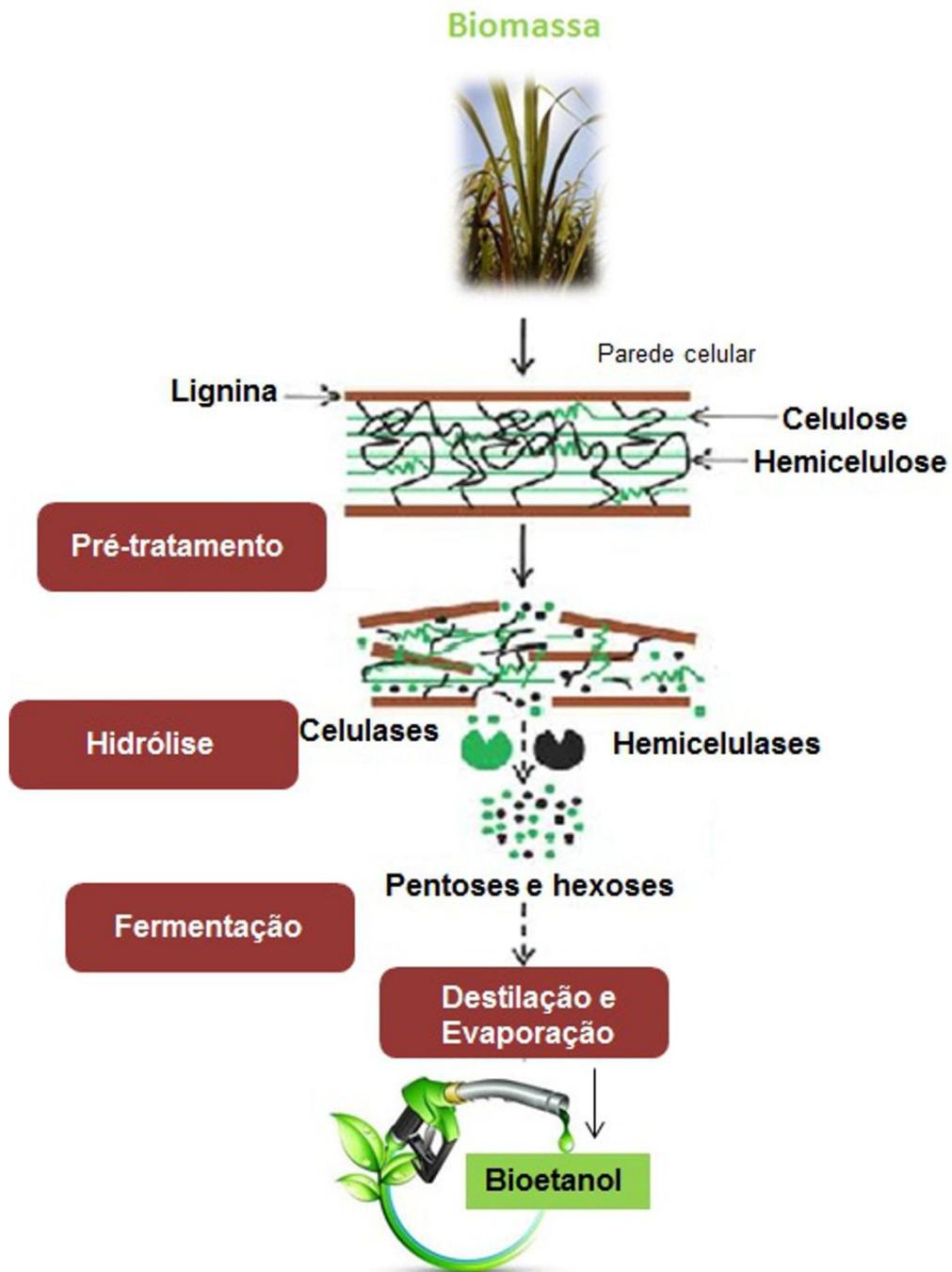


Figura 10 - Esquema representativo das principais etapas de conversão da biomassa vegetal em etanol. Adaptado de ⁷².

2.6.1 Pré-tratamento

O pré-tratamento da biomassa é um importante passo na conversão de materiais celulósicos a etanol³¹ e, tem como principal objetivo, a diminuição da interação entre os componentes da parede celular vegetal, para torná-los susceptíveis às etapas posteriores de sacarificação e fermentação.⁷³ Estimativas apontam que a etapa de pré-tratamento da biomassa representa de 16 a 19% do investimento na produção de etanol.⁷⁴

A íntima associação que existe entre os três principais componentes da parede celular vegetal (celulose, hemicelulose e lignina), é o fator determinante para a baixa acessibilidade aos carboidratos da planta nos processos biológicos.⁷³ Nesse âmbito, pré-tratamentos de natureza física, química e biológica são empregados com o intuito de destruir a heterogênea e cristalina matriz lignocelulósica e facilitar a conversão da celulose e da hemicelulose a açúcares, para posterior fermentação a etanol.¹⁷

Durante o pré-tratamento é favorável evitar a completa degradação da lignina, pois a mesma pode ser utilizada como liga para tijolos e pastilhas de ração, como dispersante para gasolina, pesticidas e cimento, bem como aditivo no tratamento da água.⁷⁵

Pré-tratamentos de natureza física, química ou biológica, assim como o fracionamento de solventes, podem ser utilizados em conjunto ou de forma individual⁷⁶. No entanto, algumas limitações estão presentes, como a formação de compostos tóxicos inibidores da fermentação, como a vanilina, o acetato, o siringaldeído, o hidroxibenaldeído, o hidroximetilfuraldeído e o furaldeído. A vanilina é o mais inibidor e afeta, principalmente a fermentação da xilose por espécies de leveduras, enquanto o acetato é o menos tóxico.⁷⁷

Pré-tratamentos físicos utilizam estresse mecânico para triturar a matéria-prima em partículas menores, aumentando dessa forma, a área superficial, o que contribui para melhorar a atividade enzimática.⁷⁸⁻⁸⁰ A radiação ultravioleta e outras formas de radiação também têm sido utilizadas para degradar e remover a lignina.⁸¹⁻⁸²

Tratamentos químicos empregam o uso de compostos ácidos, alcalinos ou oxidativos para degradar as ligações covalentes. A explosão a vapor emprega uma transição abrupta de alta para baixa pressão na presença de um catalisador ácido, sendo um exemplo de tratamento ácido.⁸³⁻⁸⁴ Similarmente, a amônia pode ser utilizada na expansão das fibras para solubilizar e extrair a lignina e decristalizar a celulose.⁸⁵ Pré-tratamentos oxidativos utilizam oxidantes como o peróxido de hidrogênio para remover a lignina e a hemicelulose, mas geram produtos inibidores.⁸⁶

Os métodos de fracionamento por solventes se baseiam na dissolução diferencial dos componentes da lignocelulose, por meio do rompimento das ligações de hidrogênio entre as microfibrilas de celulose.⁸⁷ O processo denominado Organosolv remove a lignina, tornando a celulose mais acessível e recupera o solvente alcoólico, mas requer grandes quantidades do solvente.⁸⁸⁻⁸⁹ O fracionamento por ácido fosfórico decompõe a parede celular em seus componentes e tem um custo moderado, mas tem como fator limitante a difícil recuperação do ácido fosfórico.⁹⁰⁻⁹¹ O fracionamento por líquidos iônicos tem como resultado uma celulose altamente digerível e requer calor moderado, mas possui um alto custo. Adicionalmente, nesse processo não existe a possibilidade de recuperação dos líquidos iônicos.⁹²⁻⁹³

O pré-tratamento biológico envolve a utilização de organismos, como fungos basidiomicetos e actinomicetos, para remover a lignina enzimaticamente, ao invés de utilizar produtos químicos nocivos. Embora as enzimas sejam um meio eficiente de hidrolisar esses carboidratos, os organismos também consomem a celulose, o que reduz o rendimento da hidrólise da mesma.⁷⁶ Adicionalmente, um número muito pequeno de microrganismos é capaz de degradar a lignina, a molécula mais resistente à degradação da parede celular dos vegetais.⁹⁴

Os microrganismos degradadores de lignina mais eficientes são conhecidos por “fungos da podridão branca” como o *Phanerochaete chrysosporium*, uma das espécies dotadas dessa capacidade mais bem estudadas.⁹⁵⁻⁹⁶

Nesse âmbito, técnicas de pré-tratamento biológico são uma alternativa promissora devido ao baixo consumo energético, às condições suaves de reação e aos benefícios ambientais.^{10,14}

2.6.2 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática da biomassa para a produção de etanol é realizada por enzimas produzidas por microrganismos (figura 11) e tem sido amplamente explorada e investigada como forma de aumentar a produção de etanol celulósico, tanto de forma isolada, ou combinada com pré-tratamentos da biomassa.⁹⁷

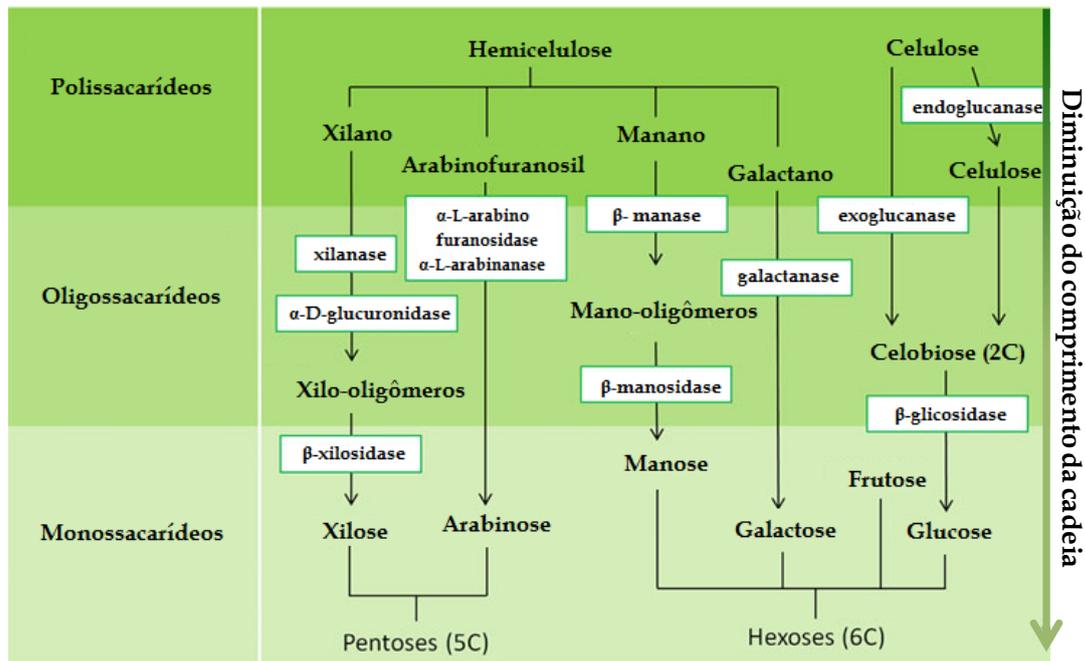


Figura 11 - Diagrama esquemático evidenciando os polissacarídeos e as respectivas enzimas hidrolíticas utilizadas para a clivagem dos mesmos em moléculas menores e açúcares simples. Endoglucanases e exoglucanases são celulases, enquanto xilanases, arabinases, arabinofuranosidases, manases e galactanases são hemicelulases. Adaptado de ¹³.

Enzimas de bactérias e fungos de diferentes fontes, incluindo o rúmen da vaca e o estômago de cupins, por exemplo têm sido investigadas para essa finalidade.^{62, 98-100}

O Brasil possui uma imensa biodiversidade que se acredita compreender cerca de 10 a 20% de todas as espécies conhecidas na Terra e inúmeros grupos de pesquisa nacionais estão se dedicando ao isolamento e à identificação de organismos capazes de produzir enzimas lignocelulolíticas.⁶² No entanto, a hidrólise enzimática da celulose apresenta-se ainda como um processo oneroso, devido à grande quantidade de enzimas necessárias e ao alto custo dessas enzimas no mercado. Outro obstáculo, relaciona-se ao grande consumo de energia requerido nos processos de pré-tratamento da biomassa.^{70, 101}

Nesse âmbito, novas tecnologias que visem o desenvolvimento e o aperfeiçoamento de enzimas têm sido desenvolvidas visando à redução dos custos de conversão da celulose a etanol. Estudos envolvendo o melhoramento de enzimas com potencial de degradação da biomassa, bem como a identificação de novas enzimas são bastante importantes.¹⁰²

2.6.3 Fermentação alcoólica

A conversão de açúcares simples em etanol e dióxido de carbono, sob condições anaeróbicas é um processo denominado fermentação alcoólica, usualmente realizado por microrganismos, comumente leveduras *Saccharomyces cerevisiae*.^{13, 103}

Organismos tanto selvagens quanto geneticamente modificados são comumente empregados. Os mesmos possuem eficiências de fermentação variadas e geram produtos de diferentes composições. Adicionalmente, a concentração de etanol também varia devido à utilização de diferentes vias metabólicas.¹⁰³

O etanol produzido também atua como inibidor do processo de fermentação por si só, interferindo na membrana celular e, ativando dessa forma vias de sinalização celular em um mecanismo de retroalimentação negativa. Em micróbios aeróbios essa inibição segue uma relação linear em relação à concentração de etanol, enquanto nos anaeróbios essa relação é exponencialmente correlacionada.¹⁰⁴

Os principais açúcares fermentescíveis obtidos após a hidrólise da celulose e da hemicelulose são a glicose, uma hexose e a xilose, uma pentose. A fermentação da glicose é um processo que pode ser realizado pelas leveduras *S. cerevisiae*. Porém, a fermentação da xilose é mais desafiadora, pois só alguns microrganismos podem fermentá-la devido ao fato de que poucos a utilizam como fonte de carbono.¹⁰⁵⁻¹⁰⁸

Adicionalmente, a levedura *S. cerevisiae* é capaz de produzir etanol com alta produtividade a partir das hexoses, incluindo glicose, manose e galactose, além de apresentar alta tolerância aos compostos inibidores comumente presentes em hidrolisados de biomassa lignocelulósica, após as etapas de pré-tratamento e hidrólise.¹⁰⁹⁻¹¹⁰ O principal inconveniente de se utilizar esse microrganismo para a fermentação lignocelulósica é a sua incapacidade de metabolizar e fermentar as pentoses xilose e arabinose em etanol.¹¹¹

Nesse âmbito, inúmeros desafios existem no que concerne a etapa de fermentação, como o baixo rendimento da produção de etanol, a formação de subprodutos, a exigência de valores específicos de pH para o crescimento dos microrganismos, a intolerância dos mesmos às altas concentrações de etanol¹¹² e o desenvolvimento de linhagens capazes de fermentar tanto as hexoses como as pentoses.¹¹³ Estratégias de engenharia genética e/ou adaptação têm sido, portanto, desenvolvidas e aparentam ser métodos promissores para otimizar a fermentação de açúcares simples em etanol.¹¹⁴

2.7 Celulases

Celulases são hidrolases que clivam ligações O-glicosídicas de oligos e polissacarídeos, sendo classificadas pela *Enzyme Commission* (EC) com a codificação 3.2.1.x, onde x varia com o tipo de celulose avaliada. Na molécula de celulose, as celulases são responsáveis pela clivagem das ligações β -1,4 que unem os monômeros de glicose e, são classificadas em famílias de hidrolases de glicosídeos.¹¹⁵

A pesquisa envolvendo celulases e outras polissacaridases teve início no começo dos anos 50, devido ao seu enorme potencial de converter a celulose, a mais abundante e renovável fonte de energia na Terra em glicose e açúcares solúveis.¹¹⁶⁻¹¹⁸ A contínua pesquisa com celulases, hemicelulases e pectinases revelou seu enorme potencial em várias indústrias, incluindo a alimentícia, de cerveja e vinho, alimentação animal, têxtil, de papel, agricultura, assim como de pesquisa e desenvolvimento.¹¹⁸⁻¹²²

Atualmente, as enzimas são comumente empregadas em inúmeros processos industriais e existe uma demanda por enzimas mais estáveis, altamente ativas e específicas.¹²³ Nesse âmbito, inúmeras abordagens têm sido utilizadas para identificar ou produzir celulases altamente ativas em celulose nativa, com o intuito de reduzir os custos da produção de biocombustíveis. Isso inclui a triagem de genomas, a utilização de estratégias de metagenômica para novas celulases, a engenharia de proteínas e a evolução dirigida.¹²⁴ Abordagens estruturais como mutagênese sítio-dirigida de resíduos-chave, modelagem molecular e técnicas de imageamento, também são extremamente importantes para investigar o processo de hidrólise enzimática da celulose.¹²⁴

Microrganismos são capazes de produzir múltiplas enzimas que degradam as células vegetais, os chamados sistemas enzimáticos.¹²⁵ Componentes dos sistemas celulolíticos foram primeiramente classificados com base no seu modo catalítico de ação e, mais recentemente estão baseados em suas propriedades estruturais.^{115, 126-127} Três tipos de atividade enzimática principais foram encontrados: a de endoglucanases (EGs) ou 1,4- β -D-glucana-4-glucanohidrolases (EC 3.2.1.4), exoglucanases (ExGs), incluindo 1,4- β -D-glucana-glucanohidrolases (também conhecidas como cello-dextrinas) (EC 3.2.1.74) e 1,4- β -D-glucano-celobio-hidrolases (EC 3.2.1.91) e as β -glucosidades ou β -glicosídeo-glucohidrolases (EC 3.2.1.21).⁵²

Celulases são distinguidas de outras hidrolases de glicosídeos, por sua habilidade em hidrolisar ligações β -1,4 entre os resíduos glicosil.¹²⁸ O rompimento enzimático das ligações

β -1,4 glicosídicas da celulose ocorre por um mecanismo de hidrólise ácida, que utiliza um doador de prótons e um nucleófilo ou base. Os produtos da hidrólise podem resultar, tanto na inversão ou retenção (mecanismo de substituição dupla) da configuração anomérica do carbono-1 na extremidade redutora.¹²⁹⁻¹³⁰

2.7.1 Endoglucanases

As endoglucanases são também conhecidas como endo β -1,4-glucanases e carboximetilcelulases e são as enzimas do complexo celulolítico responsáveis por iniciar a hidrólise. Estas enzimas que catalisam a hidrólise interna de ligações β -1,4-D-glucosídicas da celulose, também são capazes de hidrolisar ligações β -1,4 em D-glucanas que contenham ligações β -1,3.⁵²

As EGs atacam inicialmente e de forma aleatória, os múltiplos sítios internos das regiões amorfas da fibra de celulose, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (GP) e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor (quando a glicose possui uma hidroxila heterosídica livre) e um não redutor (quando a hidroxila heterosídica da molécula da extremidade participa da ligação com a glicose adjacente). Assim, as EGs disponibilizam sítios para o subseqüente ataque das celobiohidrolases.⁵²

O sítio ativo das endoglucanases possuiu a forma de fenda, o que possibilita a ação da enzima ao longo da cadeia de celulose e contribui para a redução considerável do seu grau de polimerização. As regiões de menor organização estrutural são mais facilmente atacadas, pois possuem cadeias que não estão envolvidas em interações de hidrogênio intermoleculares tão fortes quanto as que ocorrem nas regiões cristalinas. Como consequência, ocorre uma maior exposição das ligações glicosídicas mais internas das cadeias de celulose.^{8, 131}

As endoglucanases, devido ao seu modo de ação são responsáveis pela rápida solubilização do polímero celulósico (redução do GP), que ocorre por meio de sua fragmentação em oligossacarídeos, o que as torna extremamente importantes no processo de hidrólise da biomassa.¹³²

2.7.2 Exoglucanases

O grupo das exoglucanases é constituído por celobiohidrolases (CBH) e glucano-hidrolases. A glucano-hidrolase (EC 3.2.1.74) cujo nome sistemático é 1,4- β -D-glucana-glucano-hidrolase é pouco reportada, mas possui estratégia de hidrólise da fibra celulósica de elevada importância, pois é capaz de liberar glicose diretamente do polímero. Já a CBH (EC 3.2.1.94), possui o nome sistemático 1,4- β -D-glucana-celobio-hidrolase.⁵²

Embora a IUBMB defina a CBH como catalisadora da hidrólise apenas dos terminais não redutores da fibra celulósica e oligossacarídeos com GP maior que 3 em celobiose, há relatos do ataque de terminais redutores por essa enzima.^{52, 133} A CBH participa da hidrólise primária da fibra celulósica e é responsável pela amorfogênese, que é um fenômeno ainda não elucidado completamente, porém, sabe-se que envolve uma ruptura física do substrato, acarretando na desestratificação das fibras, pelo aumento das regiões intersticiais. A amorfogênese promove aumentos na taxa de hidrólise da celulose, por tornar amorfas as regiões cristalinas dos polímeros deixando-as mais expostas às celulases.¹³⁴

As CBHs podem ser classificadas em dois tipos: enzimas do tipo I (CBH I), que hidrolisam terminais redutores e as do tipo II (CBHII), que hidrolisam terminais não redutores. Essas enzimas geralmente sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise, a celobiose.¹³⁵

As exoglucanases atuam de uma maneira processiva nas extremidades reductoras ou não das cadeias de celulose, liberando tanto glicose (glucanohidrolases), como celobiose (celobiohidrolase) como produtos principais.⁶ Elas também podem atuar na celulose microcristalina, aparentemente “descascando” as cadeias de celulose da estrutura microcristalina.¹³⁶

2.8 β -glucosidases

As β -glucosidases têm a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis com GP menor que sete a glicose^{52, 136-137} e, também sofrem inibição por seu produto de hidrólise.¹³⁵

Tais enzimas constituem um grupo heterogêneo de hidrolases e são classificadas com base em vários critérios, pois não existe um método bem definido para a classificação dessas versáteis enzimas. Em geral, dois métodos para a sua classificação são descritos na literatura e se baseiam na especificidade por substratos e na identidade da sequência nucleotídica.¹³⁸

Estas enzimas são biologicamente importantes por catalisar a transferência de grupos glicosil entre nucleófilos de oxigênio. Essa reação de transferência resulta na hidrólise das ligações β -glicosídicas (β -1,4; β -1,3 e β -1,6), a partir da extremidade redutora de di e oligossacarídeos de cadeias pequenas, aril-amino ou alquil- β -D-glicosídios, glicosídios cianogênicos, oligossacarídeos de cadeia curta e dissacarídeos, sob condições fisiológicas, enquanto que sob condições definidas, a síntese de ligações glicosídicas entre diferentes moléculas também pode ocorrer.¹³⁹

2.9 Sinergismo

Sistemas celulolíticos exibem uma alta atividade coletiva, em detrimento da atividade individual de cada enzima, um fenômeno conhecido como sinergismo. Quatro tipos de sinergismo foram descritos: endo-exo sinergismo entre endoglucanases e exoglucanases, onde as endoglucanases, ao atuar nas regiões amorfas da fibra, disponibilizam terminais redutores e não redutores para a atuação da CBH I e CBH II, respectivamente; exo-exo sinergismo, entre exoglucanases, onde CBH I e CBH II atuam simultaneamente na hidrólise dos terminais redutores e não redutores das cadeias de celulose; sinergismo entre exoglucanases ou endoglucanases e β -glicosidases para a remoção de celobiose e oligossacarídeos, como produtos de hidrólise, que são substratos para as β -glicosidases, além do sinergismo intramolecular entre domínios catalíticos e módulos de ligação aos carboidratos (CBMs) (figura 12).^{52, 120, 140-141}

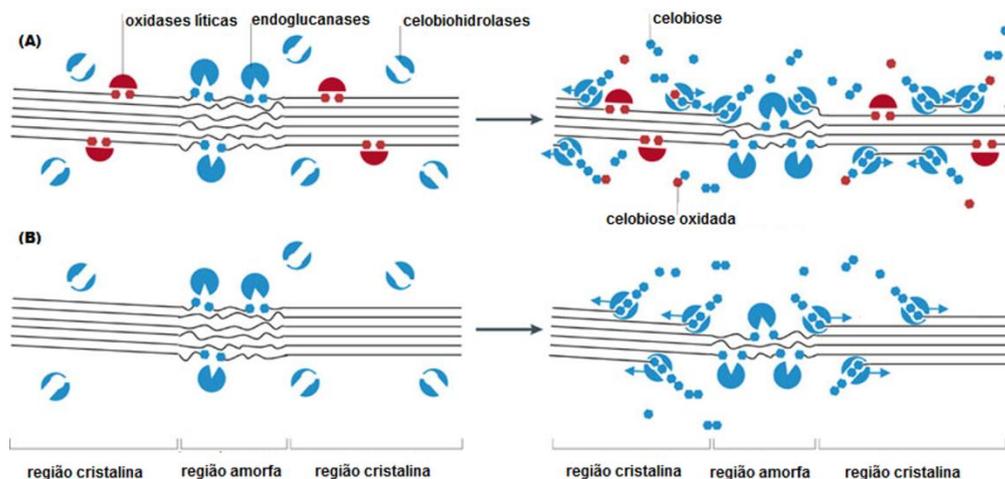


Figura 12 - Desenho esquemático demonstrando o sinergismo entre diferentes tipos de enzimas atuantes na degradação da celulose. **A.** Endoglucanases catalisam a clivagem da cadeia por meio de um mecanismo hidrolítico, gerando extremidades não oxidadas (hexágonos azuis). Oxidasas líticas catalisam a clivagem oxidativa da cadeia, gerando extremidades oxidadas (hexágonos vermelhos). Celobiohidrolases hidrolisam a cadeia de celulose de uma maneira processiva para produzir celobiose ou celobiose oxidada, dependendo do estado de oxidação das extremidades da cadeia. A ação processiva das celobiohidrolases gera majoritariamente celobiose, que pode ser posteriormente clivada em glicose por β -D-glicosídeos. **B.** Na ausência de clivagem oxidativa, a hidrólise da celulose ocorre apenas por meio de endoglucanases e celobiohidrolases processivas. Adaptado de ¹⁴².

2.10 Classificação das celulases

As enzimas são designadas com base na sua especificidade por substratos, de acordo com as diretrizes da *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB). As celulases estão agrupadas juntamente com inúmeras hemicelulases e outras polissacaridasas como hidrolases de glicosídeos (EC 3.2.1.x).¹¹⁵

As hidrolases de glicosídeos (GHs), incluindo as glicosíases e as transglucosíases são enzimas capazes de hidrolisar ligações glicosídicas entre duas ou mais moléculas de carboidratos, ou entre carboidratos e outras biomoléculas. No entanto, algumas das enzimas auxiliares envolvidas particularmente na hidrólise da hemicelulose também pertencem ao grupo das transferases de glicosídeos (EC 2.4.1.x).¹¹⁵

Tradicionalmente, as GHs e seus genes foram nomeados aleatoriamente. No entanto, com o passar dos anos essa classificação tornou-se insuficiente, pois inúmeras novas GHs foram identificadas. Uma classificação alternativa dessas enzimas em famílias foi sugerida e, é baseada na similaridade de sua sequência de aminoácidos.¹¹⁵ Essa classificação tem sido

atualizada inúmeras vezes^{126, 138, 143}, mas com o número exponencial de novas GHs identificadas, um novo banco de dados de classificação dessas enzimas foi criado, o *Carbohydrate-Active Enzymes Database (CAZY)*.¹⁴⁴

Além da similaridade entre sequências de aminoácidos, existe uma relação direta entre essa característica e a forma de enovelamento da enzima e, como as estruturas terciárias de muitas proteínas foram adicionadas, ficou evidente que as famílias contêm enovelamentos básicos em comum.¹⁴⁵

A classificação de GHs em famílias, considerando características estruturais, provê informações importantes que ampliam e complementam a classificação funcional proposta pela IUBMB. Essa classificação em famílias, que reflete as características estruturais das enzimas é muito mais informativa do que a especificidade por substratos por si só, uma vez que a completa gama de substratos é raramente determinada para enzimas individuais. Se uma estrutura tridimensional de uma família é conhecida, ela pode ser usada para inferir a estrutura dos demais membros da família. Isso também clarificou a evolução das GHs.¹⁴³⁻¹⁴⁶

O grande número de estruturas tridimensionais de GHs disponíveis na literatura nos últimos anos permitiu a observação de que os membros de uma determinada família GH compartilham do mesmo tipo de enovelamento global, um sítio catalítico comum e o mesmo mecanismo de reação: de retenção ou inversão. Apesar das similaridades, membros de uma mesma família podem ser originários de fungos, bactérias, plantas e animais, com diferentes atividades e especificidades por substratos e baixa similaridade entre sequências de aminoácidos. Em contrapartida, a mesma atividade enzimática pode ser encontrada em diferentes famílias, sendo que as celulases podem ser encontradas em apenas algumas das inúmeras famílias. Adicionalmente, várias famílias GH foram agrupadas em clãs.^{52, 147}

Algumas famílias contêm enzimas com diferentes especificidades por substratos, por exemplo, na família 5, podemos encontrar celulases, xilanases e manases. Isso sugere uma evolução divergente de um enovelamento básico nos sítios ativos para acomodar diferentes substratos. Ao mesmo tempo, celulases podem ser encontradas em inúmeras famílias, sugerindo também uma evolução convergente de diferentes enovelamentos, resultando na mesma especificidade por substratos.⁵²

2.11 A família GH 12

Atualmente são descritas 132 famílias responsáveis pela hidrólise e/ou transglicosilação das ligações glicosídicas, de acordo com o portal CAZY.^{115, 144}

Membros da família GH12 hidrolisam as ligações glicosídicas do tipo β -1,4 da celulose, via uma reação de duplo deslocamento, gerando uma glicosil-enzima intermediária, que resulta na retenção da configuração anomérica do produto^{129, 148} e também são classificados em subfamílias.¹⁴⁴ Nessa família podem ser encontradas enzimas com atividade de endoglucanase, xiloglucano hidrolase, β -1,3-1,4-glucanase e xiloglucano endoglicosilase.¹⁴⁴

Inúmeros organismos produzem enzimas da família GH12, incluindo espécies extremófilas como o *archeon Pyrococcus furiosus*¹⁴⁹, a bactéria hipertermofílica *Thermotoga neapolitana*¹⁵⁰, a eubactéria termofílica *Rhodothermus marinus*¹⁵¹ e a bactéria acidofílica termotolerante *Acidothermus cellulolyticus*.¹⁵²

Enzimas da família 12 provenientes de fungos são consideradas incomuns e, ao contrário da maioria das celulasas, geralmente não possuem CBM.¹⁵³ Estruturas cristalográficas de exemplares dessa família foram descritos nos últimos anos, tanto provenientes de bactérias¹⁵⁴⁻¹⁵⁵, quanto de fungos^{153, 156}, o que nos permite ter um panorama geral das características estruturais para toda a família. Tais estudos revelam uma estrutura do tipo β -sanduíche compacto que se curva para criar um sítio de ligação à celulose na face côncava das folhas- β .¹⁵⁷

2.12 Microrganismos produtores de celulasas

Os microrganismos desenvolveram inúmeras estratégias adaptativas para degradar materiais celulósicos de maneira eficiente, sendo que estes naturalmente ocorrem como partículas insolúveis ou estão embebidos nos polímeros de lignina e hemicelulose.¹⁵⁸

Os fungos filamentosos celulolíticos e as bactérias actinomicetes possuem a habilidade de penetrar nos substratos celulósicos por meio das extensões das hifas, expondo dessa forma, seus sistemas celulolíticos em cavidades nas partículas de celulose.¹⁵⁹ A produção de

celulases livres, com ou sem CBMs pode, por conseguinte, ser suficiente para a hidrólise da celulose sob essas condições. As enzimas nesses sistemas não formam complexos estáveis de alta massa molecular, sendo assim chamados de sistemas não complexados.⁵² Em contraste, bactérias anaeróbicas não possuem a habilidade de penetrar os materiais celulósicos de maneira eficiente, e, por isso, tiveram que desenvolver mecanismos alternativos para degradar a celulose e conseguir acessar os produtos da hidrólise, devido à competição com outros microrganismos e uma quantidade limitada de adenosina trifosfato (ATP) para a síntese de celulases. Isso permitiu o desenvolvimento dos chamados sistemas celulolíticos complexados ou celulosomas (figura 13), com células produtoras de celulases posicionadas no sítio da hidrólise, como observado para bactérias clostridia e para os ruminantes.⁵²

Microrganismos detentores de celulosomas são normalmente encontrados em ambientes anaeróbicos, onde vivem na presença de outros microrganismos, celulolíticos ou não.¹⁶⁰⁻¹⁶¹ Celulosomas são protuberâncias produzidas na parede celular das bactérias celulolíticas, quando crescidas em materiais celulósicos. Tais protuberâncias são complexos enzimáticos estáveis que se ligam firmemente à parede celular bacteriana, mas que são flexíveis o bastante para se ligar à celulose microcristalina.¹⁶¹

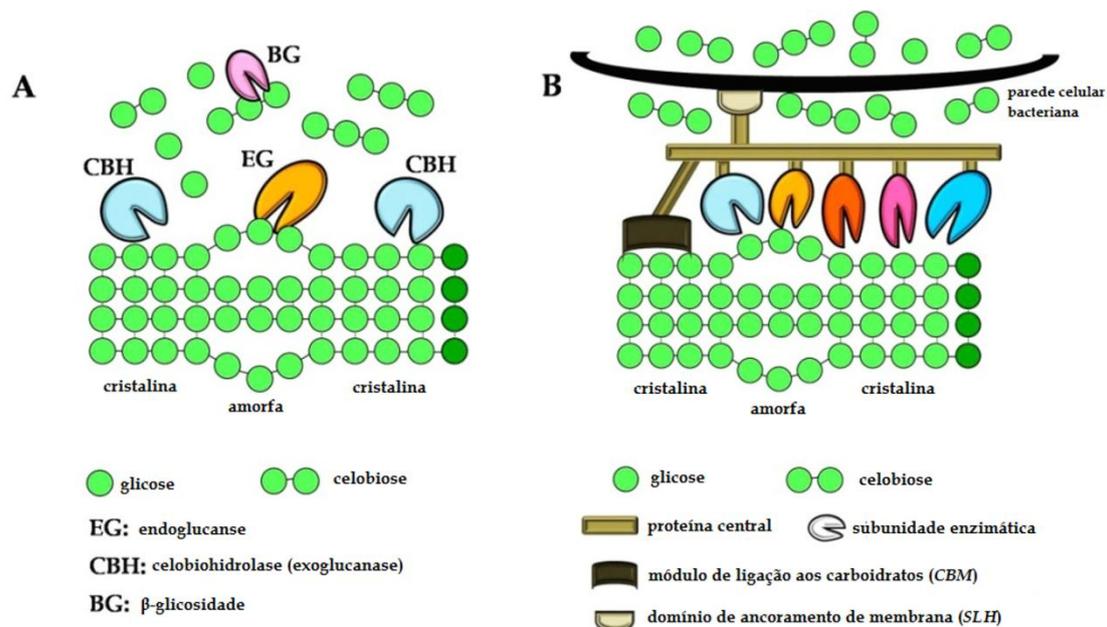


Figura 13 - Esquema simplificado da hidrólise da celulose amorfa e cristalina por sistemas celulolíticos não complexados (A) e complexados (B). Adaptado de ¹⁶².

2.12.1 Fungos produtores de celulases

Inúmeros microrganismos capazes de utilizar a celulose e a hemicelulose como fonte de carbono e energia, bem como degradá-las por meio da ação de enzimas, foram descritos nos últimos anos.^{11, 94} Nesse contexto, os fungos são os principais organismos responsáveis pela degradação da lignocelulose, sendo que as espécies de basidiomicetos o fazem da maneira mais rápida e eficiente.¹⁶³⁻¹⁶⁴

Essa importante habilidade de degradar a lignocelulose de maneira eficiente parece estar associada ao hábito de crescimento micelial, o que permite ao fungo transportar nutrientes limitantes como nitrogênio e ferro no substrato lignocelulósico pobre em nutrientes, que é a sua fonte de carbono.¹⁶⁵

Fungos com essa capacidade possuem dois tipos de sistemas enzimáticos extracelulares, o sistema hidrolítico, que produz hidrolases responsáveis pela degradação de polissacarídeos e um sistema ligninolítico extracelular e oxidativo único, que degrada a lignina, o que os torna importantes agentes produtores de enzimas para a degradação da biomassa.¹⁶⁶⁻¹⁶⁸

2.12.2 O fungo *Gloeophyllum trabeum*

Os fungos da podridão parda são assim apelidados pela forma peculiar com que a madeira se apresenta após ser submetida à degradação por esse tipo de fungo. Nesse caso, a celulose e a hemicelulose da madeira são degradadas e a lignina permanece praticamente intacta, o que mantém a cor marrom típica observada na madeira.¹⁶⁹

O *Gloeophyllum trabeum*, um fungo basidiomiceto que integra o grupo dos fungos da podridão parda (figura 14) é conhecido por produzir inúmeras enzimas extracelulares relacionadas com a degradação da hemicelulose e da celulose amorfa, sendo que a atividade predominante em culturas líquidas é a de endoglucanases e xilanases.¹⁹

A despolimerização da celulose e da hemicelulose por *G. trabeum* ocorre por meio da geração de radicais hidroxila via reação de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$), um processo assistido por hidroquinonas (compostos catequol), além da secreção de peptídeos de baixa massa

molecular. Os radicais hidroxila por sua vez, se tornam aptos a despolimerizar os polissacarídeos da parede celular vegetal devido à forte capacidade oxidante dos mesmos.¹⁷⁰



Figura 14 - Morfologia do fungo *G. trabeum*. **A.** Crescimento sobre madeira.¹⁷¹ **B.** Em placa de Petri contendo meio ágar-glicose.

3 Justificativa

A sobrevivência das gerações atuais e futuras depende da nossa habilidade em desenvolvermo-nos economicamente, com o intuito de suprir as crescentes necessidades humanas, sem comprometermos a capacidade do meio-ambiente de atender às necessidades das futuras gerações. Para isso, é imprescindível que consigamos diminuir a emissão de gases de efeito-estufa, bem como ampliar a distribuição de energia pelo mundo.

O desenvolvimento de fontes alternativas e, principalmente renováveis de energia, é uma das soluções viáveis para atender a crescente demanda por energia. Tais fontes precisam ser não somente sustentáveis, mas também ambientalmente viáveis e economicamente competitivas. Nesse âmbito, destaca-se o uso do etanol como um combustível eficiente, economicamente viável e renovável de energia. O Brasil, sendo um dos líderes mundiais na produção de etanol, apresenta um potencial muito grande de obtenção desse combustível a partir do aproveitamento de resíduos lignocelulósicos, principalmente o bagaço de cana-de-açúcar, que é um resíduo abundante gerado pela indústria canavieira. Adicionalmente, a eficiência energética da produção de etanol a partir do bagaço é superior à obtida com o método convencional, que o produz a partir da fermentação do caldo de cana e que gera o bagaço como resíduo.

Estima-se que, em um futuro próximo, a geração de energia a partir de biomassa vegetal seja a principal fonte de recursos para fins energéticos. Com isso, o estudo de microrganismos com o potencial de degradar as moléculas constituintes da parede celular vegetal como a lignina, a celulose e a hemicelulose, por meio de suas enzimas é de extrema importância nas pesquisas relacionadas aos biocombustíveis.

O fungo *G. trabeum* faz parte de um grupo de fungos que degrada a celulose e a hemicelulose da parede vegetal de maneira eficiente. No complexo celulolítico desse fungo, inúmeras enzimas estão presentes e com diferentes atividades, por isso, é importante a identificação, a produção e a caracterização estrutural das mesmas, para compreendermos os mecanismos moleculares de atuação dessas enzimas.

Atualmente, dispomos de importantes técnicas de caracterização enzimática, análise molecular e estrutural de proteínas, bases universais de dados, além de técnicas avançadas de sequenciamento genético e programas computacionais de análise que proporcionam ferramentas científicas importantes para o estudo integrado dos complexos enzimáticos de microrganismos, um dos objetivos desse estudo.

Objetivos



*“Não basta darmos os passos que nos
devem levar um dia ao objetivo; cada
passo deve ser ele próprio um objetivo
em si mesmo; ao mesmo tempo que
nos leva adiante”*

Johann W. von Goethe



4 Objetivos

4.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente estudo é compreender o mecanismo molecular de atuação da endoglucanase Cell12A do fungo *G. trabeum*, bem como elucidar suas características estruturais e funcionais, com o intuito de contribuir para a otimização do processo de hidrólise enzimática da biomassa vegetal, uma das etapas da produção de biocombustíveis.

4.2 Objetivos específicos

- ✚ Clonagem do gene *cell12A* de *G. trabeum*, a partir do DNA complementar (cDNA) do fungo;
- ✚ Produção heteróloga da enzima na linhagem py11 de *A. niger*;
- ✚ Purificação da enzima a partir do extrato enzimático;
- ✚ Identificação da enzima por espectrometria de massas;
- ✚ Caracterização bioquímica, incluindo a determinação da massa molecular, a especificidade por substratos e as condições ótimas de atividade;
- ✚ Determinação dos parâmetros cinéticos;
- ✚ Análise por microscopia eletrônica de varredura do efeito da hidrólise de substratos naturais pela enzima, como papel de filtro e aveia;
- ✚ Caracterização biofísica por meio de técnicas como dicroísmo circular (CD) e espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS);
- ✚ Cristalização e estudos de difração de raios-X;
- ✚ Determinação da estrutura cristalográfica da enzima e estudo da relação estrutura-função da mesma;

Material e Métodos



Vincent Van Gogh

*“A vida sem ciência é uma espécie
de morte”*

Sócrates



5 Material e Métodos

5.1 Clonagem independente de ligação (LIC)

A clonagem independente de ligação não requer o uso de enzimas de restrição, nem de DNA ligase. Nesse método, sequências específicas com cerca de quinze a vinte nucleotídeos são adicionadas às extremidades de genes e vetores por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), com oligonucleotídeos especificamente desenhados para LIC. Tais sequências são complementares entre si, o que permite a interação de ambos por complementaridade, de forma não covalente, garantindo dessa forma a integração do gene ao vetor. Posteriormente, ambos são submetidos a um tratamento com a enzima T4 DNA polimerase.¹⁷²

A atuação da enzima T4 DNA polimerase é essencial nesse processo, visto que ela possui duas atividades enzimáticas: a atividade de polimerase 5'-3' e a atividade de exonuclease 3'-5'. A atividade de exonuclease se inicia em uma extremidade 3' livre e atua removendo nucleotídeos um a um. Normalmente, a atividade de polimerase equilibra a atividade de exonuclease, adicionando nucleotídeos na extremidade 3'. O resultado é que, na presença de todos os quatro desoxinucleosídeos trifosfato (dNTPs), cada vez que a exonuclease remove um nucleotídeo, a polimerase o substitui por uma nova base. No método LIC, o sistema é desequilibrado para forçar a atividade de exonuclease da T4 DNA polimerase, com o intuito de criar as extremidades complementares. Nesse caso, o vetor para LIC é tratado com a T4 na presença de apenas um único nucleosídeo, a desoxiguanosina trifosfato (dGTP), no nosso caso. O sítio de clonagem do vetor é projetado de modo que, a partir da extremidade 3' exposta após a PCR, não haja nucleotídeos guanina até cerca de vinte nucleotídeos internos. Isso significa que a exonuclease remove os nucleotídeos, mas como não há desoxitimidina trifosfato (dTTP), desoxiguanosina trifosfato (dCTP) ou desoxiadenosina trifosfato (dATP) disponíveis, a polimerase não consegue equilibrar sua atividade até atingir uma base dGTP, criando assim extremidades coesivas.¹⁷²

O gene de interesse é amplificado com oligonucleotídeos desenhados para LIC e projetados para criar saliências complementares as do vetor. O tratamento com T4 DNA polimerase é feito de forma semelhante, exceto pelo fato de que agora, a base adicionada é dCTP.

A molécula vetor + inserto é então transformada em *E. coli*, onde posteriormente ligases da célula hospedeira reparam o esqueleto de ligações fosfodiéster para uni-lo de forma covalente.

As vantagens inerentes a esse método são a simplicidade e a rapidez em comparação com a clonagem convencional, a viabilidade de adaptação do protocolo para a clonagem em alta performance e o alto índice de sucesso obtido.¹⁷²

O esquema simplificado das etapas requeridas para a clonagem pelo método LIC está descrita na figura 15, a seguir:



Figura 15 - Esquema simplificado das etapas requeridas para a clonagem por meio de LIC.

O vetor utilizado para expressão em *A. niger* foi o ANIp7G, um vetor não comercial construído a partir do vetor ANIp7¹⁷³, compatível com o sistema de expressão em *A. niger* py11, desenvolvido e gentilmente cedido pelo prof. Adrian Tsang do grupo de Genômica estrutural e Funcional da Universidade Concórdia no Canadá.

A sequência gênica de *G. trabeum* foi obtida do banco de dados *GenBank* (número de acesso: HQ163778) do *National Center for Biotechnology information* (NCBI) por meio da

ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST)¹⁷⁴, utilizando sequências conhecidas de enzimas hidrolíticas envolvidas no processo de degradação da biomassa vegetal.

A sequência do gene *cel12A* de *G. trabeum* é mostrada na figura 16.

```

ATGTTCCGCTTCATCTCTGCTTTGCCCTTGGCGCATTAAAGCTTGCATC
CGCGGCGACCGTGCTCACTGGTCAATACACCTGTGACACTGCTGGAGATTATACC
CTCTGCAATGACCAGTGGGGTATTGCCAACGGTGTGGGCTCCCAGACCTCGACT
TTGATCAGTGCTTCTGGCAGCACCATCTCCTGGTCGACCAACTACACTTGGGCTA
ACAACCCGAATGACGTCAAGACCTATGCCAATGTTCTCTCCAACACCGCCAAGG
GAGTGCAGATCAGTCAAATTAGCAGCTTCCCCACCACCTGGGATTGGTACTACGA
GACTCAGTCGTCTGGCCTCCGCGCTGATGTTTCGTACGACATGTGGACCGGTACT
GCGCAGACCGGCACAGCTGCCAGTTCCTCTTCATCCTACGAGATCATGATCTGGC
TTTCCGGCAAGGGCGGAATCCAACCCGTTGGCTCTCTGAAGACCTCTGGAATCA
GTCTTGCCGGCTATACCTGGAACCTTGTGGAGCGGAACCACCGAGACCTGGACCA
CCCTGTCTTCGTTTCGGCTGACGGGGATATCACTAGCTTCAACGCCGAGCTGAC
TCCCTTCTCCAGTACTTGGTCGAGAATGAGGGTGTCTCCGCCAGCCAGTATATC
CAGGCCATTAGACCGGCACGGAAGCCTTCACTGGCACTGCTGAGCTTGTCCT
ACCTCGTTCAGCGTCAGCTTGAGCGGGTGA

```

Figura 16 - Sequência do gene *cel12A* de *G. trabeum* contendo 741 pares de bases.

Os oligonucleotídeos sintéticos específicos foram desenhados com base na sequência gênica e utilizados para amplificar o gene em questão, a partir de amostras de cDNA. Para isso, utilizamos um oligonucleotídeo *forward* e dois *reverse*. Nos oligonucleotídeos também foram adicionados uma cauda de poli-histidina (6X His).

As sequências dos oligonucleotídeos utilizados para amplificar o gene foram:

Oligonucleotídeo *forward*:

5'-TACTTCCAATCCAATCCATTTGACGATATGTTCCGCTTCATCTCTGCTTTGCCCTTG- 3'

Oligonucleotídeo *reverse* 1:

5'-ATGATGATGATGATGATGGGATCCACGCGGAACCAGCCCGCTCAAGCTGAC- 3'

Oligonucleotídeo *reverse* 2:

5'-TTATCCACTTCCAATCCATTTGTTAATGATGATGATGATGATGGGATCCACGCGGAACCA- 3'

5.1.1 Obtenção do cDNA

O cDNA de *G.trabeum* da linhagem Madison 617, ATCC 11539 foi obtido por transcrição reversa do ácido ribonucleico (RNA) total extraído a partir do cultivo do fungo em meio de cultivo TDM¹⁷⁵, suplementado com alfafa e cevada 1% (m v⁻¹) a 34 °C por 32 horas.

5.1.2 Amplificação gênica

O gene *cell2A* de *G. trabeum* foi amplificado com os oligonucleotídeos específicos *forward* e *reverse* 1 e, em uma segunda PCR, com os oligonucleotídeos *forward* e *reverse* 2 visando adicionar a cauda de LIC requerida para inserção do gene no vetor ANIp7G. Um controle negativo foi feito sob as mesmas condições, porém, sem a adição do molde de cDNA, onde se esperaria portanto, que não ocorresse nenhuma amplificação. Para essas reações foi utilizada a enzima Phusion DNA Polymerase (Finnzymes). O resultado da amplificação dos genes foi verificado por eletroforese em gel de agarose a 1% (m v⁻¹).

5.1.3 Tratamento com T4 DNA polimerase

O produto da segunda PCR dos genes foi incubado com a enzima T4 DNA polimerase (New England BioLabs) a 22 °C por 30 minutos, juntamente com o dCTP, seguido da posterior inativação da enzima a 75 °C por 20 min. O produto dessa reação foi conservado a 4 °C até a etapa seguinte.

5.1.4 Preparo do vetor

O vetor ANIp7G (figura 17) foi amplificado por PCR utilizando-se oligonucleotídeos específicos desenhados para o método LIC, visando à adição da sequência requerida para LIC no sítio de clonagem. Posteriormente, o produto desta PCR foi incubado com a enzima DpnI (New England BioLabs) a 37 °C *overnight*, seguido da inativação da enzima por 20 minutos a 80 °C. O intuito da utilização desta enzima é a digestão de quaisquer moléculas do vetor que ainda estejam fechadas após a amplificação por PCR. Isso prejudicaria o sucesso da ligação com os genes e a posterior transformação em bactérias *E. coli*.

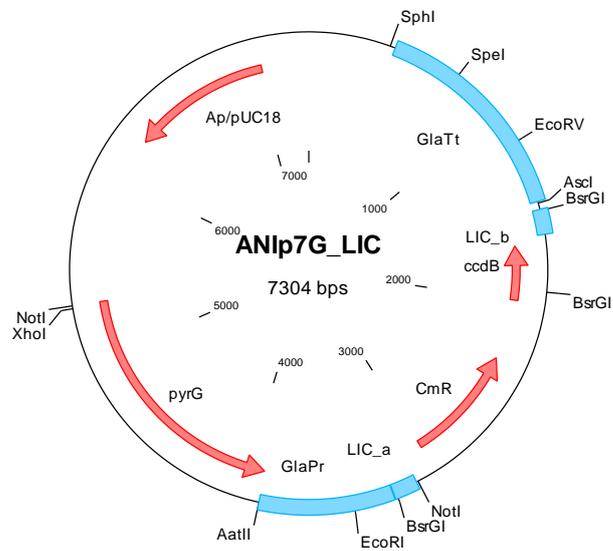


Figura 17 - Mapa do vetor ANIp7G adaptado para o método LIC.

As sequências dos oligonucleotídeos utilizados para amplificar o vetor e adicionar a sequência requerida para clonagem por LIC foram:

Oligonucleotídeo *forward*:

5'-AAATGGATTGGAAGTGGATAACTTAACTGCAGGTCCGCGAATATTCCG- 3'

Oligonucleotídeo *reverse*:

5'AAATGGATTGGATTGGAAGTACTGATATGCAAGCTTGGCACTGGC-3'

A reação com a enzima T4 DNA polimerase (New England BioLabs) foi feita em condições semelhantes às descritas para o gene, exceto pelo fato de que agora, a base nitrogenada adicionada foi dGTP.

Posteriormente, o vetor ANIp7G e o inserto foram incubados juntos por 30 min à temperatura ambiente para que ocorresse a integração dos mesmos.

5.1.5 Transformação em *E. coli* DH5 α competentes

A transformação em células competentes da linhagem DH5 α foi feita por choque térmico¹⁷⁶ e, posteriormente, a mistura foi incubada em meio de cultura 2YT [bacto-triptona 1,6%, NaCl 0,5% e extrato de levedura 1% (m v⁻¹)] em um incubador rotativo a 37 °C por 1 hora. A mistura foi então, distribuída em placas de Petri contendo meio de cultura sólido 2YT-ágar [1,5% (m v⁻¹)] acrescido de antibiótico ampicilina (100 μ g ml⁻¹). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C *overnight* para permitir o crescimento das colônias.

5.1.6 Confirmação das colônias positivas

Algumas colônias foram escolhidas aleatoriamente e inoculadas em 1 mL de meio 2YT contendo ampicilina (100 μ g ml⁻¹). Essa cultura foi incubada em um incubador rotativo a 37 °C, 200 rpm *overnight*.

Posteriormente, realizamos uma minipreparação de DNA, com o intuito de extrair o DNA plasmidial das bactérias. Para isso, a cultura foi centrifugada a 20 °C e 3750 rpm por 10 minutos e, ao *pellet* resultante, adicionamos 100 μ l de uma solução contendo: D-glicose 0,9%, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,3%, Tris base 0,3% acrescida da enzima RNase A (Qiagen) (17,5 U mL⁻¹) para ressuspender as células. Posteriormente, adicionamos 200 μ l de uma solução contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% (v v⁻¹) e NaOH 10M a 2% (v v⁻¹), seguido de suave homogeneização. Esse passo é essencial para a lise da bactéria e a liberação do conteúdo interno das células. A essa mistura adicionamos 150 μ l de uma solução contendo acetato de potássio 29,4% (m v⁻¹) e ácido acético glacial 11,5% (v v⁻¹) pH 4,8, para

a precipitação das proteínas presentes. A mistura foi centrifugada a 4 °C e 3750 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e novamente centrifugado nas mesmas condições anteriores, com o intuito de remover a maior quantidade possível de proteínas. O sobrenadante foi igualmente coletado e a esse, adicionamos 315 µl (0,7 volumes) de isopropanol 100%, seguido da centrifugação a 20 °C e 3750 rpm por 20 minutos. O isopropanol foi descartado e o *pellet* foi lavado com 500 µl de etanol 70% e, posteriormente, centrifugado a 4 °C e 3750 rpm por 5 minutos. O etanol foi então descartado e o *pellet* obtido foi incubado em estufa a 37 °C por 30 minutos para a completa evaporação do etanol. O DNA resultante do processo foi ressuscitado em 20 µl de tampão Tris-HCl 10 mM pH 8.

Uma PCR com os plasmídeos extraídos foi realizada para confirmar o sucesso da transformação.

5.2 Manipulações com *A. niger* py11

Os fungos filamentosos têm sido utilizados com sucesso para a produção de proteínas recombinantes, principalmente devido às facilidades de cultivo e adaptação dos mesmos a diversas condições ambientais. Esses organismos podem produzir e secretar de maneira excepcional, grandes quantidades de proteína, processar RNAs mensageiros eucarióticos, além de possuírem a capacidade de realizar modificações pós-traducionais nas proteínas, como a glicosilação e a formação de pontes dissulfeto.¹⁷⁷

Outra vantagem de se utilizar esses organismos para a produção de proteínas inclui o fato dos mesmos secretarem as proteínas para o meio de cultivo, mecanismo interessante tanto para o caso de proteínas com efeito tóxico quando acumuladas, quanto pela facilidade de purificação dos produtos desejados diretamente do meio de cultura, uma vez que sua morfologia filamentosa contribui para tal.¹⁷⁸

5.2.1 O gênero *Aspergillus sp.*

O gênero *Aspergillus sp* (figura 18) é composto de aproximadamente 180 espécies, muitas das quais com importante valor comercial, além de inúmeras outras com importância médica por serem consideradas patogênicas. As espécies desse gênero são altamente adaptáveis, visto que crescem em um amplo intervalo de temperatura, de 10 a 50 °C, valores de pH variando entre 2 e 11 e uma osmolaridade desde a pureza da água até cerca de 34% de sal.¹⁷⁹

A complexidade de sua regulação gênica representa um desafio para a ciência, uma vez que essas espécies são capazes de explorar uma vasta gama de condições ambientais e utilizar diversas fontes nutricionais, fato que pode ser vantajoso, porém complexo.¹⁸⁰

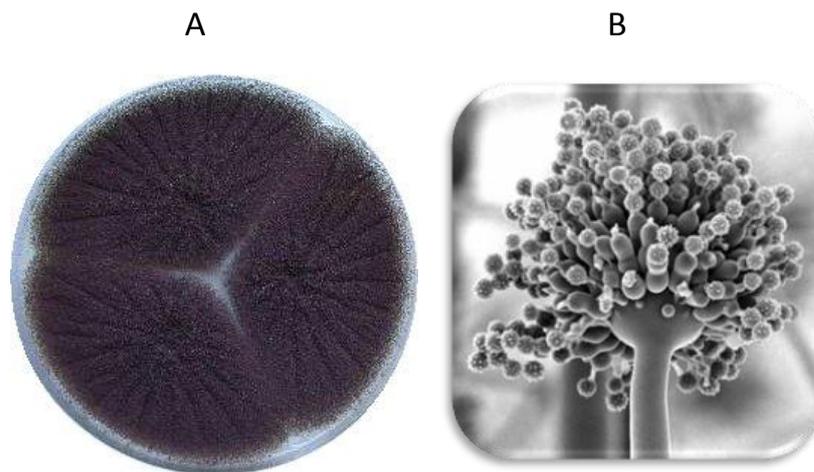


Figura 18 - Morfologia do fungo *A. niger*. **A.** Crescimento micelial em placa de Petri.¹⁸¹ **B.** Conidióforo de *A. niger* com conidiósporos na extremidade.¹⁸²

Para a produção heteróloga de proteínas em *A. niger*, as seguintes etapas são requeridas, conforme esquematizado na figura 19.

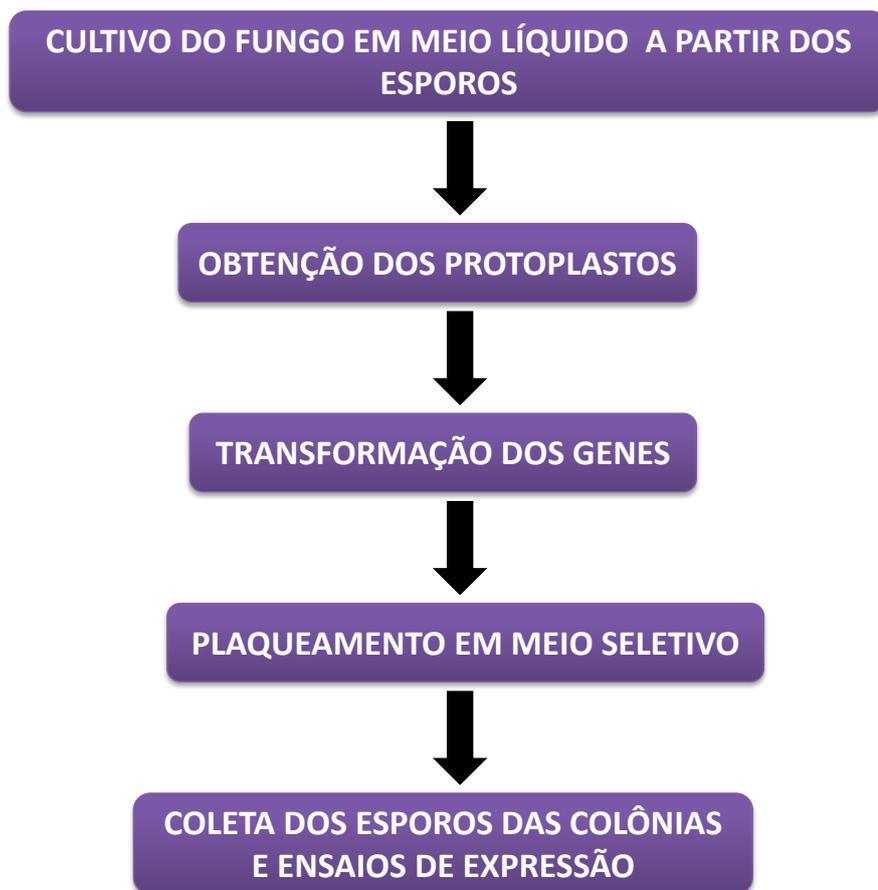


Figura 19 - Esquema simplificado das etapas requeridas para a produção de proteínas recombinantes em *A. niger*.

5.2.2 Obtenção dos protoplastos

Para a obtenção dos protoplastos de *A. niger* utilizados na transformação dos genes, um inóculo de 500 mL contendo 2×10^6 esporos mL^{-1} foi feito em meio líquido completo para *A. niger* (CM) e incubado em um incubador rotativo a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 150 rpm, *overnight*. Posteriormente, sob condições estéreis, o micélio fúngico obtido nesse cultivo foi filtrado a vácuo utilizando-se a membrana Miracloth (EMD Millipore). O micélio foi então, lavado com três volumes de solução de MgSO_4 0,6 M e digerido com o coquetel enzimático comercial VinoTaste® Pro (Novozymes) (0,25 g/grama de micélio obtido), com atividade de pectinase e β -1,3-1,6 glucanase, diluído em uma solução osmótica contendo $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ 0,5M 0,3% (v v^{-1}), $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-2H}_2\text{O}$ 0,5M 1,6% (v v^{-1}) e $\text{MgSO}_4\text{-7H}_2\text{O}$ 29,5% (m v^{-1}) (10 mL para cada 5 g de micélio). Para que a ação da enzima ocorresse de modo eficiente, a mistura foi incubada

em um incubador rotativo a 30 °C, com agitação de 150 rpm na primeira hora e 100 rpm nas demais, até a completa digestão da parede celular das hifas, após cerca de quatro horas de incubação (figura 20). A verificação do grau de digestão se deu por observação ao microscópio ótico (figura 21).

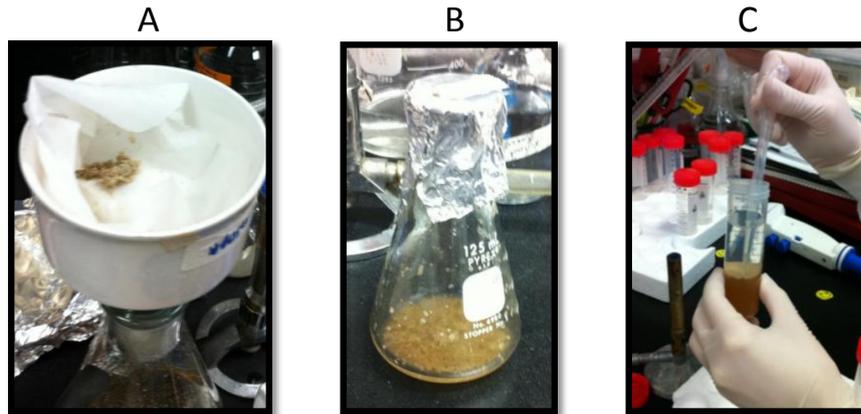


Figura 20 - Etapas do processo de obtenção de protoplastos de *A. niger*. **A.** Filtração do micélio obtido da cultura líquida. **B.** Cultivo após adição do coquetel comercial VinoTaste® Pro (Novozymes). **C.** Etapa de obtenção dos protoplastos após centrifugação para separação dos restos celulares contendo micélio.

Após a digestão da parede celular, coletamos os protoplastos acrescentando-se 1 volume de uma solução contendo sorbitol 11% (m v⁻¹), Tris-HCl 1M pH 7,5 10% (v v⁻¹), seguido de centrifugação a 4 °C e 3750 rpm por 20 minutos. Uma camada intermediária de protoplastos foi coletada após centrifugação e transferida para um tubo *falcon* estéril. Os protoplastos foram então lavados com solução de sorbitol e cloreto de cálcio (S/C), composta por sorbitol 1M e CaCl₂-2H₂O a 50mM e posteriormente centrifugados a 4 °C e 3750 rpm por 5 minutos. Esse processo foi repetido três vezes com o intuito de eliminar quaisquer resquícios de micélio, porém, antes de centrifugar o conteúdo da última lavagem, uma alíquota foi retirada para a contagem dos protoplastos em microscópio ótico, utilizando-se uma câmara de Neubauer. Após a centrifugação, o *pellet* obtido foi ressuscitado em solução de glicerol 10M para preparar o estoque de protoplastos a uma concentração final de 2x10⁷ protoplastos mL⁻¹.

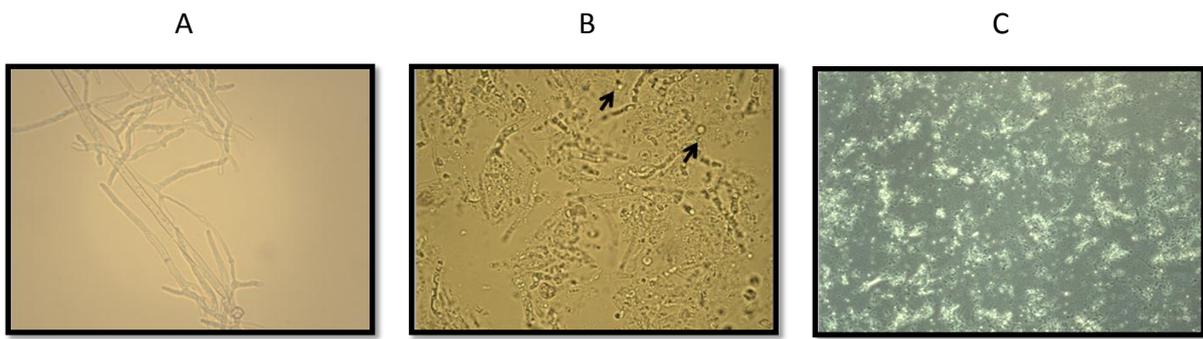


Figura 21 - Etapas de digestão do micélio de *A. niger* para a liberação dos protoplastos. **A.** Hifas íntegras antes do início da digestão com o coquetel comercial VinoTaste® Pro (Novozymes). **B.** 1 hora após a adição do coquetel. Nota-se que alguns protoplastos já foram liberados (flechas). **C.** Após 4 horas de digestão. Nesse estágio, o número de protoplastos liberados é bem maior e praticamente não há mais hifas íntegras.

5.2.3 Transformação dos genes na cepa py11

A cepa py11 ($cspA^- pyrG^- \Delta Gla :: hiG$) é derivada da linhagem N593 ($cspA^- pyrG^-$) por silenciamento do gene *Gla*, o que a faz possuir as seguintes características: auxotrofia para uracila e uridina, amido não ramificado como fonte de carbono para seu crescimento e estrutura dos conídios mais curta. Esta cepa foi desenvolvida no Centro de Genômica Estrutural e Funcional da Universidade Concórdia e gentilmente cedida pelo prof. Adrian Tsang.

O método de transformação utilizado é baseado na utilização de protoplastos por digestão enzimática da parede celular de micélio jovem. A transformação é feita por incubação dos protoplastos em meio osmótico contendo $CaCl_2$, com DNA e polietilenoglicol (PEG). Os transformantes são selecionados por plaqueamento dos protoplastos em meio de regeneração seletivo, que não contém uridina nem uracila (figura 22).

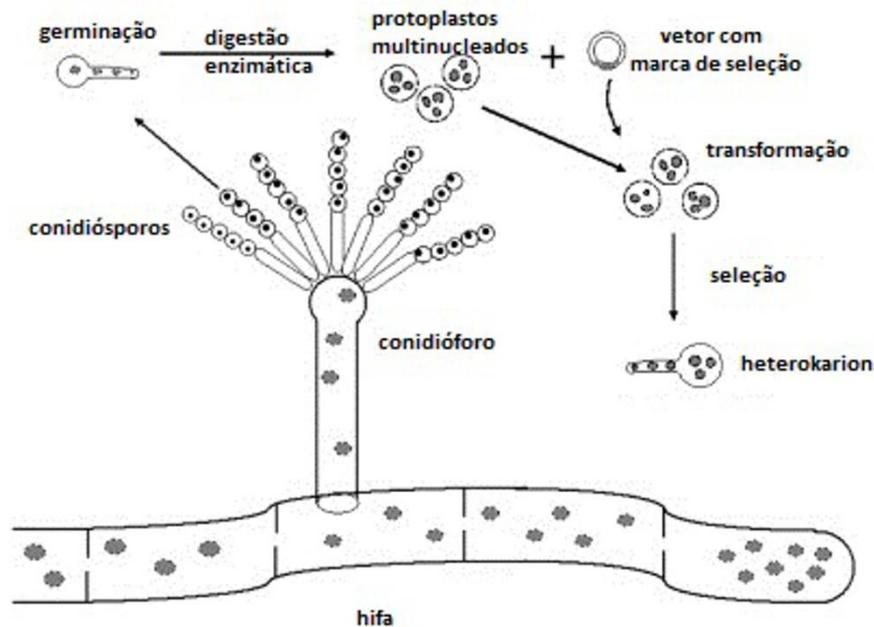


Figura 22 - Transformação química em *Aspergillus sp.* Os conidiósporos são coletados e germinados em meio contendo nutrientes e, posteriormente, submetidos a um tratamento enzimático para a quebra da parede celular das células, liberando, dessa forma, os protoplastos, que são incubados com o DNA transformante. O plaqueamento em meio seletivo permite o crescimento dos transformantes. Adaptado de ¹⁸⁰.

Para a transformação dos genes, 10 ng de DNA foram incubadas com 100µl de PEG 20%, 20 µl de solução de ácido aurintricarboxílico (ATA) 0,4 M e 200 µl da preparação de protoplasto à temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, adicionamos à mistura 1,5 mL de PEG 60%, que foi homogeneizada suavemente e incubada em temperatura ambiente por 20 minutos. Adicionamos então, 5 mL de sorbitol 1,2 M, seguido da centrifugação a 20 °C e 37500 rpm por 10 minutos. O *pellet* obtido foi ressuscitado em 0,5 mL de sorbitol 1,2 M e a mistura resultante foi plaqueada em placas de Petri contendo meio de regeneração seletivo (SRM) (figura 23). As placas foram incubadas em estufa a 30 °C por 6 a 10 dias. Um controle negativo foi feito sob as mesmas condições descritas anteriormente, porém, utilizando-se o vetor ANIp7G sem o inserto. Esse controle foi plaqueado em meio SRM. Nesse controle, idealmente, não se deve observar nenhuma colônia após o período de incubação.

Um controle positivo dos protoplastos também foi feito com o intuito de verificar a viabilidade dos protoplastos utilizados. Para isso, plaqueamos os protoplastos em placas com

meio de regeneração não seletivo (NSRM), onde idealmente deveríamos observar uma abundância de colônias, já que os protoplastos nesse caso não são recombinantes e, portanto, não possuem nenhuma marca de seleção.

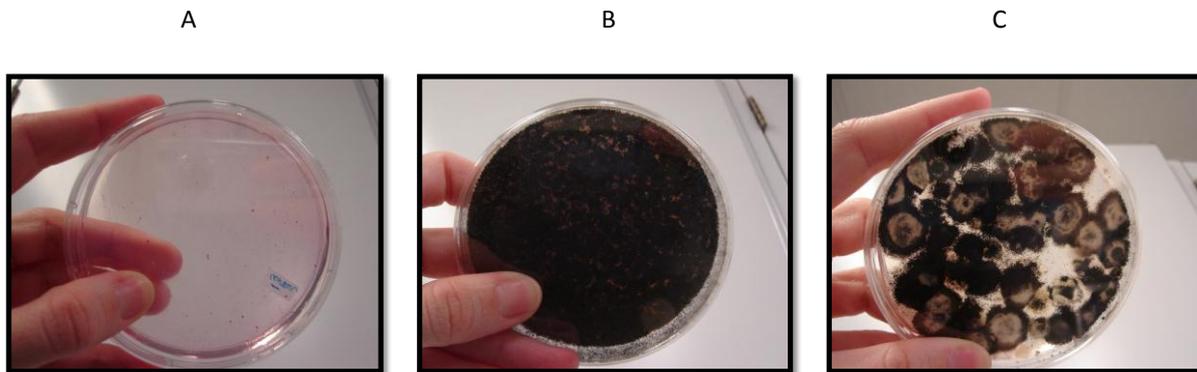


Figura 23 - Placas contendo colônias de *A. niger* após transformação e incubação em meio seletivo em estufa a 30 °C. **A.** Controle negativo do experimento, onde não foi observado crescimento de colônias em meio seletivo SRM. **B.** Controle positivo onde foi observado crescimento abundante do fungo em meio não seletivo. **C.** Placa de transformação com crescimento de colônias esparsas.

5.2.4 Ensaio de expressão

Para a triagem inicial da produção de proteínas, adicionamos os esporos de algumas colônias de *A. niger* escolhidas aleatoriamente a 1 mL de meio mínimo indutor (MM J), em placas de acrílico de 24 poços (figura 24). As placas foram incubadas em estufa a 30 °C por 5-6 dias. Após o período de incubação, coletamos e centrifugamos a cultura a 4 °C e 13000 rpm por 5 minutos, com o intuito de eliminar quaisquer resquícios de esporos e micélio. O sobrenadante foi então analisado por *Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) 15%, sob condições desnaturantes¹⁸³ utilizando-se o marcador de massa molecular All Blue (Bio-Rad) de 250 kDa. Posteriormente, os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue R-250* para a visualização das bandas.

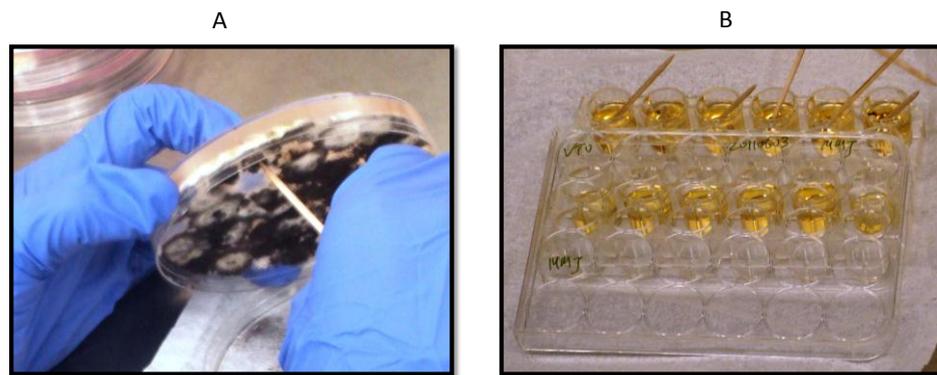


Figura 24 - Triagem da produção de proteínas recombinantes de *A. niger*. **A.** Coleta dos esporos das colônias. **B.** Inoculação dos esporos nos poços contendo meio MM J.

5.3 Identificação da proteína

A confirmação da identidade da proteína obtida foi feita pelo método da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS). A banda referente à enzima GtCel12A foi cortada do gel de poliacrilamida e digerida com 0,5 μg de tripsina modificada (Promega) por 16 horas. A extração dos peptídeos foi realizada com uma solução contendo ácido fórmico 5% e acetonitrila 50% e os mesmos foram posteriormente submetidos à análise por LC/MS em um equipamento MicroTOF-QII (Bruker Daltonics). O espectro de massa dos peptídeos foi obtido por meio das massas mono-isotópicas dos mesmos e interpretado por meio da ferramenta computacional Mascot.¹⁸⁴

A sequência dos peptídeos obtidos foi posteriormente comparada com uma base de dados de fungos filamentosos disponível no *Joint Genome Institute (JGI)* do *U.S Department of Energy*.

5.4 Escalonamento da produção de proteínas recombinantes em *A. niger* py11

Para a produção da proteína GtCel12A em maior escala, 2×10^6 esporos mL^{-1} , obtidos das colônias positivas após a transformação dos genes, foram inoculados em meio MM J

contendo maltose 4% ($m v^{-1}$), em frascos *erlenmeyers* de 2 litros e mantidos em cultura estacionária em estufa a 30 °C por 6 dias (figura 25).

Posteriormente, o extrato fúngico foi filtrado em membrana Miracloth (EMD Millipore) e o conteúdo proteico foi precipitado com sulfato de amônio a 80% ($m v^{-1}$) de saturação *overnight* a 10 °C. No dia seguinte, o extrato foi centrifugado a 9000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante foi descartado. O precipitado de proteína foi então ressuscitado em tampão Bis-Tris 50 mM, pH 6,0, adequado para os passos seguintes de purificação da proteína.

Após ressuscitar o precipitado, a amostra foi dessalinizada em um concentrador vivaspin (Amersham Bioscience), com ciclos de concentração e ressuspensão da mesma em tampão Bis-Tris 50 mM, pH 6,0.

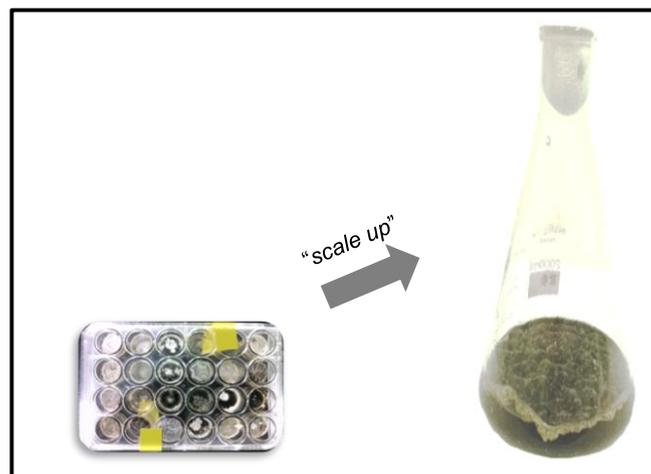


Figura 25 - Escalonamento da produção da proteína GtCel12A. À esquerda, testes iniciais em placa de 24 poços com volume de 1 mL e, à direita, produção em frascos do tipo *Erlenmeyer* com 500 mL de meio de cultivo.

5.5 Purificação

A amostra dessalinizada foi submetida ao primeiro passo de purificação por técnicas de cromatografia em um equipamento AKTA Purifier *Fast Performance Liquid Chromatography* (FPLC).

Na primeira etapa de purificação, a amostra foi pré-purificada em uma coluna de troca aniônica Q-sepharose FF 16/60, equilibrada com o mesmo tampão da amostra, Bis-Tris 50 mM, pH 6,0. A amostra foi submetida a um gradiente em etapas de 0 a 100% (em 10 volumes de coluna) de NaCl 1 M no mesmo tampão. A enzima de interesse foi eluída com 10 a 20% de NaCl e, posteriormente, submetida a outra etapa de purificação.

O tampão da amostra obtida foi trocado e a mesma foi posteriormente concentrada em um concentrador vivaspin (Amersham Bioscience) até um volume final de 1 mL. Essa solução proteica concentrada foi então aplicada em uma coluna de exclusão molecular, a Superdex 75 16/60, equilibrada com o tampão citrato de sódio 50 mM, pH 3,0, como um segundo passo de purificação.

A pureza da amostra foi analisada por SDS-PAGE 15% sob condições desnaturantes¹⁷⁸. O gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250* e o conteúdo protéico foi determinado espectrofotometricamente, por meio do equipamento NanodropTM (Thermo Scientific), com leitura da absorbância a 280 nm.

5.6 Caracterização Bioquímica e Biofísica da proteína recombinante

5.6.1 Estimativa da massa molecular real por cromatografia de exclusão molecular

Para se determinar a massa molecular da proteína e confirmar seu estado oligomérico em solução, uma curva de calibração foi obtida aplicando-se na coluna de exclusão molecular Superdex 75 16/60, proteínas-padrão com massas conhecidas e, posteriormente, sob as mesmas condições, a proteína GtCel12A. As proteínas utilizadas como padrão foram: conalbumina (75,0 kDa), ovoalbumina (44,0 kDa), anidrase carbônica (29,0 kDa), ribonuclease A (13,7 kDa) e aprotinina (6,5 kDa) do kit “*Gel Filtration Calibration Kit*” (GE Healthcare) de baixa e alta massa molecular. O corante Blue Dextran (2000 kDa) foi utilizado para a determinação do volume morto (V_o) da coluna.

Com base nos volumes de eluição de cada proteína foi possível calcular o K_{av} , um parâmetro relacionado ao perfil de migração de cada molécula, de acordo com a seguinte equação:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o} \quad (1)$$

Onde,

V_e é o volume de eluição da proteína;

V_o é o volume morto da coluna;

V_t é o volume total da coluna.

Para a construção da curva de calibração, os valores obtidos para os K_{avs} foram plotados em um gráfico contra o logaritmo da massa das proteínas padrão. A equação da reta obtida por regressão linear, foi utilizada para o cálculo da massa molecular da proteína em estudo.

5.6.2 Eletroforese em gel nativo (condições não-desnaturantes)

A eletroforese em gel nativo é uma técnica que permite determinar a homogeneidade da amostra de proteína, bem como seu estado oligomérico em solução. Nessa técnica, as proteínas são separadas com base em alguns parâmetros como carga, massa e conformação. O experimento foi realizado no equipamento Phast System (Amersham Biosciences), utilizando um gel não desnaturante, o Phast Gel 8-25 com gradiente de 8 a 25% de acrilamida (GE) e um padrão de proteínas de alta massa molecular: tiroglobulina bovina (669 kDa), ferritina de cavalo (445 kDa), catalase (232 kDa), aldolase (140 kDa) e soro-albumina bovina (66 kDa). O gel foi corado com *Comassie Blue* em solução aquosa de metanol 25% (v v⁻¹) e ácido acético 5% (v v⁻¹).

5.6.3 Especificidade por substratos

A enzima GtCel12A pura foi submetida a um ensaio de atividade com vinte e um substratos com o intuito de determinar sua especificidade por substratos. Os substratos testados foram: 4-nitrophenyl- β -D-cellobioside (4NPC), 4-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (4NPG), Sigmacell 20 (celulose microcristalina), carboximetilcelulose (CMC), xilano de madeira de faia (Sigma Aldrich), arabinoxilano de trigo e centeio, β -glucano de cevada, liquenano de musgo islandês, xilano de aveia, arabinano não ramificado de beterraba, 1-5- α -L arabinano de beterraba, arabinogalactano de *Larix sp*, 1-4- β -D manano, laminarina, galactomanano e xiloglucano de tamarindo (Megazyme), Avicel PH-101 (celulose microcristalina) e hidroxietilcelulose (Fluka), disco de 0,7 cm papel de filtro Whatman N^o 1 (Whatman) e PASC (celulose amorfa)¹⁸⁶.

Cada ensaio foi realizado em triplicata, em um volume final de 100 μ L, dos quais 50 μ L eram do substrato a 1% (m v⁻¹), 5 μ L de enzima em concentração de 0,3 mg mL⁻¹ e 45 μ L de citrato de sódio a 50 mM, pH 4,5. No controle da reação, o volume de enzima foi substituído por 5 μ L do mesmo tampão. A mistura foi incubada a 50 °C por 30 minutos e, posteriormente, adicionamos 100 μ L de uma solução a base de ácido dinitrosalicílico (DNS)¹⁸⁷. Novamente a mistura foi incubada, porém, dessa vez a 95 °C por 5 minutos. A leitura das absorvâncias foi registrada a 540 nm.

Para os testes com 4NPC e 4NPG, após o tempo de incubação de 30 minutos, adicionamos 100 μ L de Na₂CO₃ 1M e realizamos a leitura das absorvâncias a 400 nm.

Para o cálculo da atividade enzimática, uma curva padrão foi construída, utilizando diferentes concentrações de glicose. Com base nessa curva padrão, a quantidade de açúcares redutores totais para os experimentos foi obtida e a atividade em unidades de atividade enzimática por volume de extrato enzimático foi calculada (μ mol de glicose equivalente min⁻¹ mL⁻¹).

5.6.4 Determinação das condições ótimas

O perfil de atividade em função de pH e temperatura foi determinado utilizando β -glucano de cevada a 1% ($m v^{-1}$) como substrato. O volume final da reação foi de 100 μL , dos quais 5 μL eram de enzima a 0,03 $mg mL^{-1}$, 45 μL de cada tampão a 50 mM com valores de pH de 1 a 10 e 50 μL do substrato. No controle da reação, o volume de enzima foi substituído por tampão.

As seguintes soluções foram utilizadas: ácido clorídrico a 50 mM para pH 1, ácido clorídrico equilibrado com cloreto de potássio para pH 2, ácido cítrico equilibrado com citrato de sódio para pHs 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 e 6,0; fosfato de sódio equilibrado com hidróxido de sódio para pH 7,0, Tris equilibrado com ácido clorídrico para os pHs 8,0 e 9,0 e carbonato de sódio equilibrado com bicarbonato de sódio para pH 10,0.

Os ensaios foram realizados em triplicata em um termociclador (BioRad) com a função gradiente de temperatura, em um intervalo de 30 a 80 °C para todos os pHs, totalizando 768 amostras.

5.6.5 Atividade enzimática residual

A atividade residual da GtCel12A foi obtida sob as condições ótimas da enzima, de acordo com os resultados do experimento anterior, por meio da incubação da enzima diluída em tampão citrato de sódio, pH 4,5 a 50 °C, por 168 horas. Alíquotas de 5 μL foram retiradas e ensaiadas para a atividade em β -glucano de cevada a 1% ($m v^{-1}$). A meia-vida da enzima foi determinada por meio da construção de um gráfico de atividade *versus* tempo, após a regressão linear dos dados e determinação da equação da reta.

5.6.6 Experimento de estabilidade térmica avaliado pela técnica de Thermofluor

A técnica de Thermofluor tem o intuito de monitorar a estabilidade térmica das proteínas e se baseia no processo de desnaturação induzida por temperatura. Para isso, utiliza um fluoróforo, a *SYPRO® Orange* (Invitrogen), que interage com a região hidrofóbica central da proteína. À medida que a proteína começa a se desenovelar devido ao aumento da temperatura, seu núcleo hidrofóbico é exposto, o que resulta em um aumento de fluorescência dessa molécula (figura 26).

Essa técnica é usualmente utilizada para se determinar condições ideais para a estabilidade das proteínas, por meio da triagem de diferentes tampões, ligantes, cofatores, etc, o que pode aumentar as chances de sucesso da purificação e cristalização das mesmas.

Nesse experimento, investigamos a estabilidade da proteína em diferentes valores de pH. Utilizamos 10 μM de proteína em cada condição, que explorou diferentes tampões (pH de 1 a 10) e 1 μL de *SYPRO® Orange* (Invitrogen) em concentração final de 1000 x na reação. O volume final da reação foi de 20 μL em todos os casos. As reações foram realizadas em triplicata e a variação de temperatura do experimento foi de 25 a 95 $^{\circ}\text{C}$, com incremento de 1 $^{\circ}\text{C}$. As seguintes soluções foram utilizadas para os diferentes valores de pH: ácido clorídrico a 50 mM para pH 1, ácido clorídrico equilibrado com cloreto de potássio para pH 2, ácido cítrico equilibrado com citrato de sódio para pHs 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 e 6,0; fosfato de sódio equilibrado com hidróxido de sódio para pH 7,0, Tris equilibrado com ácido clorídrico para os pHs 8,0 e 9,0 e carbonato de sódio equilibrado com bicarbonato de sódio para pH 10,0.

As amostras foram colocadas em placas de PCR de 96 poços (BioRad) e seladas com um adesivo transparente, o Optical-Quality Sealing Tape (Bio-Rad). As placas foram incubadas em um termociclador do tipo iCycler iQ Real Time PCR Detection System (Bio-Rad) e as mudanças do sinal de fluorescência foram monitoradas por meio de um dispositivo de carga acoplada (CCD).

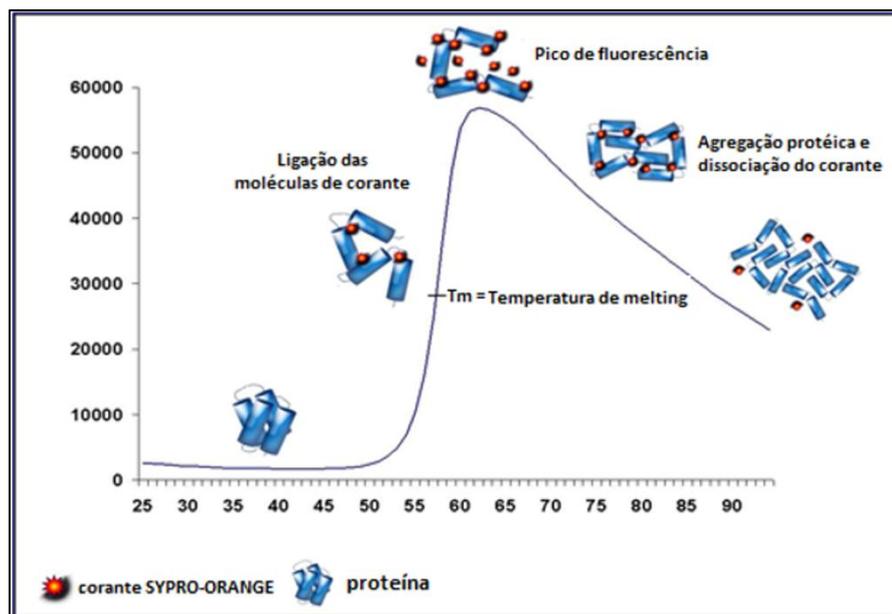


Figura 26 - Princípio do método Thermofluor utilizado para o estudo da estabilidade de proteínas. A teoria se baseia no monitoramento de perfis de enovelamento da proteína, a partir do sinal de fluorescência do corante *SYPRO® Orange* à medida que esse interage com as moléculas de proteína. As proteínas corretamente enoveladas sofrem desenovelamento com o aumento da temperatura, resultando na exposição de regiões hidrofóbicas e, eventualmente, a agregação das moléculas. A temperatura de melting (T_m) representa a temperatura na qual 50 % das moléculas estão desenoveladas. Adaptado de 188

5.7 Determinação dos parâmetros cinéticos

A determinação dos parâmetros cinéticos também foi realizada com a utilização de β -glucano de cevada a 1% (m v^{-1}), que foi o melhor substrato para a atividade da GtCel12A. As reações foram realizadas em triplicata, em um volume final de 100 μL , dos quais 50 μL eram de substrato em uma concentração final de 0,6; 1,25; 2,5; 5; 10 e 15 (mg mL^{-1}) na reação, 45 μL de tampão citrato de sódio pH 4,5 e 5 μL de enzima. A concentração final de enzima na reação foi de 30 nM.

O volume reacional de 100 μL foi incubado em placas de PCR de 96 poços a 50 °C. Triplicatas foram removidas após 1, 2, 5, 10, 12 e 15 minutos de reação e foram imediatamente testadas para a determinação da quantidade de açúcares redutores pelo método do DNS. Os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} foram determinados por meio do ajuste de Michaelis-Menten, disponível no software Origin v 8.6 (OriginLab).

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

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica bem estabelecida para a obtenção de imagens superficiais de sólidos orgânicos e inorgânicos utilizada em diversas áreas, sobretudo em biologia, geologia e ciência dos materiais. As imagens obtidas são formadas a partir da interação de um feixe de elétrons focalizado sobre a amostra que varre a sua superfície ponto a ponto. Importantes características da amostra são reveladas com esse método, como composição elementar, topografia, cristalinidade, potencial elétrico, campo magnético local, entre outras.¹⁸⁹⁻¹⁹⁰

A microscopia eletrônica de varredura proporciona imagens com alta resolução, que podem chegar a 5 nm nos microscópios de emissão de campo (FESEM). Essa resolução é muito superior à obtida em microscópios óticos, de 0,5 μm .¹⁹¹ Além disso, as imagens têm aparência tridimensional, um resultado da alta profundidade de campo que pode ser obtida e dos efeitos de contraste produzidos pelos elétrons secundários e retroespalhados.^{190, 191} A aparência tridimensional facilita muito a interpretação das imagens, por exemplo, quando comparadas com as obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM).

Amostras de papel de filtro (disco de 0,7 cm, Whatman N° 1) e flocos de aveia *in natura* submetidos à hidrólise enzimática pela GtCel12A por 12 horas (e 24 horas para o papel de filtro) a 50 °C, foram submetidos à análise por MEV. O volume reacional utilizado para a preparação das amostras foi de 100 μL , dos quais 95 μL eram tampão citrato de sódio (pH 4,5) e 5 μL de solução de enzima (15 mg mL⁻¹). Os ensaios foram realizados em triplicata e na amostra de controle da reação, o volume de enzima foi substituído por tampão. Posteriormente, as amostras foram secas em estufa a 37 °C por 12 horas e revestidas com ouro em um metalizador SCD 050 (Bal-Tec, USA), utilizando uma corrente de 40 mA durante 60 s.

As análises de microscopia foram realizadas em colaboração com a Prof^a. Dr^a Camila A. Rezende, no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LME/LNNano) em Campinas/SP, em um microscópio eletrônico de varredura equipado com um canhão de emissão de campo (FEI Quanta 650 FEG). Um mínimo de 20 imagens foi obtido em diferentes regiões de cada amostra para garantir a reprodutibilidade dos resultados.

5.9 Espectroscopia de Dicroísmo circular

A luz plano-polarizada possui duas componentes circularmente polarizadas de igual magnitude, uma que gira no sentido anti-horário (à esquerda, ou L) e outra no sentido horário (à direita, ou R). A Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) é uma técnica que se baseia na absorção diferenciada dessas duas componentes da luz, que é circularmente polarizada, por moléculas assimétricas e opticamente ativas.¹⁹³ Se após a passagem pela amostra, os componentes L e R não forem absorvidos ou forem absorvidos igualmente, a recombinação de L e R gerará uma radiação polarizada no mesmo plano inicial, entretanto, se L e R forem absorvidos de maneira diferenciada, a radiação resultante será dita como tendo polarização elíptica, já que as duas componentes tem amplitudes diferentes.¹⁹³ Tal absorção diferenciada é devida aos diferentes coeficientes de extinção das moléculas para cada polarização.¹⁹⁴

Os equipamentos de CD, chamados de espectropolarímetros, medem a diferença em absorbância entre os componentes circularmente polarizados L e R ($\Delta A = A_L - A_R$), mas geralmente também reportam em termos de elipticidade (θ), que corresponde ao ângulo cujo arco é igual à razão entre os semi-eixos maior e menor da elipse, portanto, reportado em graus. Adicionalmente, o espectro de CD é obtido quando o dicroísmo é medido como uma função do comprimento de onda.¹⁹³⁻¹⁹⁴

A maioria das macromoléculas biológicas é opticamente ativa e a atividade óptica está relacionada à sua conformação. Como as proteínas estão repletas de centros quirais, como o carbono α de todos os aminoácidos, exceto a glicina, e o carbono β da treonina e da isoleucina, por exemplo, estas estruturas podem ser identificadas e quantificadas por meio da técnica de CD.¹⁹⁴ Nas proteínas, alguns componentes comuns exibem sinal em regiões típicas, como a ligação peptídica que apresenta absorção abaixo de 240 nm, cadeias laterais de aminoácidos aromáticos (absorção no intervalo de 260 a 320 nm) e as ligações dissulfeto que exibem sinal na região de 260 nm.¹⁹⁵

A partir do espectro de CD da proteína é possível estimarmos a porcentagem de cada estrutura secundária presente (hélices α , folhas β , voltas β), já que estas possuem um espectro de CD característico (figura 27). Alguns algoritmos existem para tal finalidade e utilizam dados do espectro de ultravioleta (UV) distante para prover uma estimativa da composição de estrutura secundária das proteínas. A maioria dos procedimentos disponíveis emprega dados

sobre o espectro de CD de proteínas com vários tipos de enovelamento, cujas estruturas foram determinadas por cristalografia de raios-X.¹⁹³

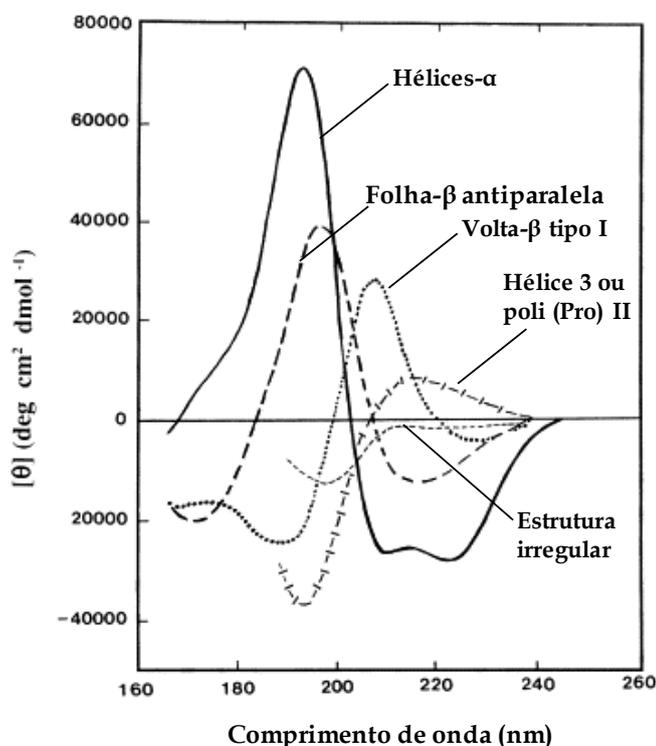


Figura 27 - Espectro de CD no UV distante associado a vários tipos de estruturas secundárias. Adaptado de ¹⁹³.

Para a realização desse experimento, a enzima GtCel12A foi incubada *overnight* a 4 °C em diferentes tampões e pHs, sendo que para pH 1,0 foi utilizado ácido clorídrico a 50 mM, ácido clorídrico equilibrado com cloreto de potássio para pH 2, ácido acético equilibrado com acetato de sódio para pHs 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 e 6,0; fosfato de sódio equilibrado com hidróxido de sódio para pH 7,0, Tris equilibrado com ácido clorídrico para os pHs 8,0 e 9,0 e carbonato de sódio equilibrado com bicarbonato de sódio para pH 10,0. Todos os tampões utilizados foram preparados a 50 mM. Os tampões também foram medidos e utilizados como “branco” dos experimentos.

O espectro de dicroísmo circular da enzima foi obtido utilizando-se um espectropolarímetro JASCO J-815 (Jasco International Co. LTd), equipado com um sistema de controle de temperatura do tipo PELTIER PTC 423S/15. O espectro foi coletado na região do UV distante, no intervalo de comprimento de onda de 195 a 260 nm, com resolução de 0,2

mm, utilizando uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 0,1 cm para as amostras de proteínas em concentração de $0,15 \text{ mg mL}^{-1}$. A sensibilidade foi mantida em 100 miligraus e o tempo de resposta em 0,5 milissegundos. O programa Spectra Manager (JASCO) foi utilizado para o registro dos dados. A deconvolução do espectro de dicroísmo circular foi feita por meio do programa CONTINLL do pacote de programas CDPPro.¹⁹⁶

Experimentos de desnaturação térmica também foram realizados por meio da monitoração da mudança de elipticidade utilizando um comprimento de onda de 215 nm e um gradiente de temperatura de 10 a 90 °C, com incremento de 5 °C.

5.10 Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS)

Em SAXS, uma amostra é iluminada por um feixe monocromático de raios-X, de modo que os átomos que a compõem interagem com a radiação incidente. Os elétrons pertencentes a esses átomos se comportam como se fossem livres, já que a energia dos fótons incidentes é bem menor que a de ligação deles nos átomos. Portanto, considerando que partículas livres e oscilantes produzem ondas eletromagnéticas em todas as direções e coerentes com a onda incidente (mesma frequência e fase), no caso de um espalhamento elástico, a intensidade da onda espalhada dependerá do ângulo de espalhamento (2θ).¹⁹⁷

Em solução, as partículas estão desordenadas e em movimento *browniano*¹⁹⁷, ao contrário do que ocorre em um cristal, onde as partículas estão organizadas de forma periódica em uma rede tridimensional. Ocorre portanto, a perda de informação em experimentos de espalhamento de raios-X a baixo ângulo, principalmente devido à necessidade de se obter a média do espalhamento sobre todas as direções no espaço. Em sistemas monodispersos, pode-se determinar a dimensão máxima (D_{max}) das proteínas analisadas, bem como seu raio de giro (R_g), que corresponde à distância quadrática média dos elétrons relativa à posição do centro de massa da molécula. Perpetuando os cálculos, pode-se obter a função de distribuição de distâncias $p(r)$. Um modelo tridimensional *ab initio* pode ser obtido a partir do fator de forma $I(q)$ vs. q , permitindo inferir comparações estruturais entre esse modelo gerado e o de proteínas homólogas que já possuem estrutura de alta resolução (por cristalografia de raios-X e/ou RMN) determinada.

As medidas de espalhamento de raios-x a baixo ângulo da proteína foram realizadas em três concentrações diferentes: 1,0; 2,5 e 4,5 mg mL⁻¹ todas em tampão citrato de sódio a 50 mM, pH 3,0, acrescido de NaCl 300 mM, com o intuito de obtermos o melhor conjunto de dados, levando-se em consideração uma boa estatística de espalhamento, a estabilidade da amostra para os ângulos mais baixos de espalhamento e a análise de efeitos causados pela radiação sobre a amostra. Os dados de SAXS foram coletados na linha SAXS-2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas, São Paulo, em colaboração com o Prof. Dr. Mario de Oliveira Neto e o doutorando Caio Vinicius dos Reis, utilizando um comprimento de onda $\lambda = 1,55 \text{ \AA}$, em um detector bidimensional (MarCCD) disposto a 986,45 mm da amostra, cobrindo um intervalo de transferência de momento de $0,01512 \text{ \AA}^{-1} < q < 0,3383 \text{ \AA}^{-1}$.

As medidas do espalhamento da solução de proteína e do tampão foram feitas em dois *frames* de 150 segundos, para o monitoramento de possíveis danos causados pela radiação à amostra, além da estabilidade do feixe. A análise sistemática e o processamento inicial dos dados foram realizados por meio do programa FIT2D¹⁹⁸, normalizando-se os dados pela intensidade do feixe e multiplicando-se pela absorção da amostra. Também foi realizada a subtração do espalhamento do tampão do espalhamento da amostra analisada, para se contabilizar apenas o efeito espalhador das moléculas de proteína. O padrão bidimensional da amostra proteica foi integrado em 2Θ . O R_g foi obtido por dois métodos distintos, primeiramente utilizando a equação de Guinier.¹⁹⁹

Posteriormente, utilizamos o método da Transformada Inversa de Fourier implementado no programa Gnom²⁰⁰, onde também obtivemos a $p(r)$ e o D_{max} do envelope protéico. A partir da curva de espalhamento contida no arquivo de saída do programa Gnom²⁰⁰ e, com o valor de $I(0)$ (extrapolado) normalizado para a concentração de proteína na amostra, estimamos o estado oligomérico da proteína no programa SAXS MoW²⁰¹ a partir da massa molecular teórica fornecida.

A determinação do modelo de baixa resolução a partir dos dados de SAXS foi realizada por meio de um procedimento *ab initio*, implementado nos programas Gasbor²⁰² e Dammin.²⁰³ De modo a tornar o modelo mais verossímil possível, corroborando com os dados experimentais, buscou-se a minimização da função do parâmetro discrepância, “ χ ” que leva em consideração a intensidade da luz espalhada e aquela calculada a partir do modelo gerado. Para melhor estatística dos resultados e qualidade do modelo final gerado, foram realizadas dez construções *ab initio* independentes em ambos os programas, Gasbor²⁰² e Dammin²⁰³, que foram promediadas através do programa DAMAVER²⁰⁴ e sobrepostas no programa

SUPCOMB.²⁰³ Posteriormente à obtenção da estrutura cristalográfica da GtCel12A por cristalografia de raios-X, a mesma foi sobreposta ao modelo de SAXS, também por meio do programa SUPCOMB²⁰⁰ e os parâmetros estruturais de ambos foram comparados.

5.10.1 Estabilidade térmica avaliada por SAXS

A estabilidade térmica da estrutura terciária da GtCel12A foi monitorada por SAXS. A desnaturação foi analisada segundo um perfil de Kratky a partir da curva de espalhamento experimental.²⁰⁵

Glatter e Kratky demonstraram¹⁹⁹ que existe uma relação entre o estado de enovelamento das proteínas e o perfil da curva de Kratky ($I(q) \cdot q^2$ versus q).²⁰⁵ Para moléculas totalmente enoveladas e teoricamente globulares, o perfil de Kratky é representado por um pico parabólico (“barriga”) e uma linha de base constante para altos valores de q (Figura 28 curva A). A região final da curva é a chamada região de Porod.¹⁹⁹ À medida que ocorre certo desenovelamento (Figura 28 curva B), o pico parabólico é deslocado em relação à posição anterior e sua linha de base sofre uma elevação para grandes valores de q . Quando a molécula atinge um estágio totalmente desenovelado, o pico parabólico tende a desaparecer e um perfil hiperbólico fica evidente na região de altos valores de q (Figura 28 curva C).¹⁹⁹

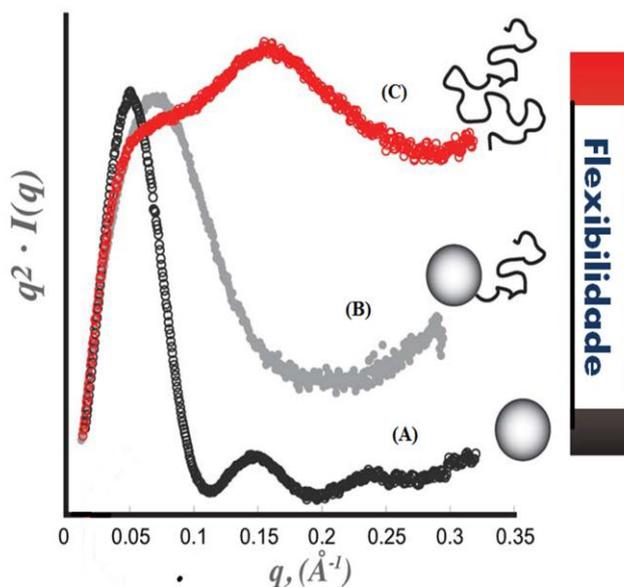


Figura 28 - Perfil de Kratky exemplificando estados de enovelamento ou desenovelamento de moléculas. **A.** Estado enovelado. **B.** Parcialmente desenovelado e **(C)** estado totalmente desenovelado. Observa-se que à medida que o grau de enovelamento diminui, ocorre o deslocamento do pico parabólico do início da curva e a inclinação da linha de base para altos valores de q , gerando uma região com perfil hiperbólico. Adaptado de ²⁰⁵.

As medidas foram realizadas com uma variação de temperatura de 20 °C a 65 °C com um incremento de 5 °C e um tempo de repouso de 5 minutos na temperatura a ser medida. A concentração de proteína para estes testes foi de 0,6 mg ml⁻¹ em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 3,0, acrescido de NaCl 300 mM.

5.11 Ensaio de cristalização

A cristalização das macromoléculas ocorre quando são atingidas condições de supersaturação da solução protéica, uma condição de não equilíbrio, onde a concentração de proteína ultrapassa a solubilidade do equilíbrio termodinâmico, tornando-a insolúvel. No entanto, a solubilidade da proteína deve ser diminuída vagarosamente. Do contrário, precipitados amorfos se formarão, ao invés de cristais altamente ordenados. Cuidados também devem ser tomados para que a supersaturação não seja muita alta, pois assim, as chances de

formação de cristais diminuem. Adicionalmente, um grande número de núcleos será formado e, conseqüentemente, o aparecimento de cristais muito pequenos e de baixa qualidade.²⁰⁶

Os cristais de qualidade são altamente ordenados, possuem tamanho adequado e têm capacidade de difrataram em altas resoluções. Nesse âmbito, inúmeros fatores influenciam a formação de soluções supersaturadas, como a temperatura, a concentração de sal, o pH, a concentração de proteína, a presença de ligantes que alteram a solubilidade da macromolécula, entre outros. Assim, a remoção de um agente solubilizante, ou a remoção direta de água por evaporação e a adição de polímeros que produzam exclusão do volume também contribuem para o sucesso desse processo.²⁰⁷

A cristalização de uma molécula ocorre por meio de três etapas, a nucleação, o crescimento e a cessação do crescimento. A nucleação representa uma transição de fase onde as moléculas passam de um estado desordenado para ordenado e isso ocorre porque as moléculas se associam em três dimensões para formar agregados intermediários, termodinamicamente estáveis e parcialmente ordenados, os chamados núcleos críticos (figura 29). Esses núcleos provêm superfícies adequadas para o crescimento dos cristais, o que ocorre por diferentes mecanismos.^{206, 207} O crescimento do cristal cessa quando a solução está suficientemente esgotada de moléculas de proteínas, quando ocorre alguma deformação induzida que desestabiliza a rede cristalina, ou quando as faces do cristal se tornam dopadas por impurezas.²⁰⁶

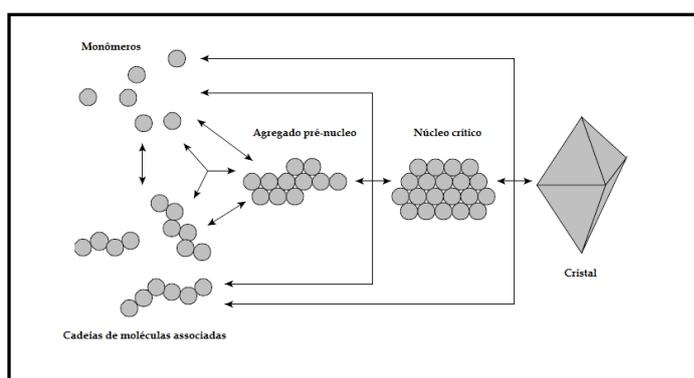


Figura 29- Associação molecular reversível envolvida na formação dos cristais. Os monômeros inicialmente se combinam em pequenos agregados (ou cadeias). Essa associação leva à formação de agregados pré-núcleo, que continuam crescendo pela adição de outros monômeros ou cadeias. Quando um número suficiente de moléculas se associa em três dimensões, um núcleo crítico termodinamicamente estável é formado e, a partir desse, novos monômeros ou cadeias se juntam, levando à formação dos cristais. Adaptado de²⁰⁸.

Para os ensaios de cristalização foram utilizadas dois métodos: o da “gota pendurada”, ou *hanging drop* e o da “gota sentada”, ou *sitting drop*, que diferem entre si pela posição da gota de solução proteica no sistema (figura 30).²⁰⁹ Ambos os métodos são baseados no princípio da difusão de vapor, com base em um processo de equilíbrio entre as duas soluções (gota e solução do reservatório) em ambiente fechado. Nesse caso, a gota tem concentração menor que a solução do reservatório e, portanto, tende a equilibrar sua pressão de vapor com a pressão de vapor da solução do reservatório. Ocorre então, a difusão de compostos voláteis da gota para o reservatório, aumentando dessa forma, a concentração da gota até um nível ótimo e até que ocorra a cristalização da proteína.

Em ambas as técnicas citadas acima, uma pequena gota de solução de proteína é misturada com um volume igual ou proporcional de uma solução de cristalização, normalmente constituída de tampão, sal e precipitante.

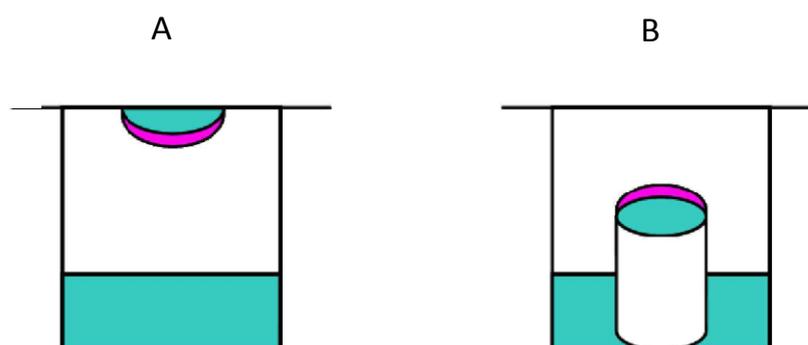


Figura 30 - Métodos de cristalização de macromoléculas. **A.** Método da gota pendurada (*hanging drop*). A proteína (em rosa) é misturada à solução de cristalização (verde) e colocada em posição invertida sobre o reservatório contendo a solução de cristalização. **B.** Método da gota sentada (*sitting drop*). A proteína (rosa) é colocada juntamente com a solução de cristalização em um pedestal, sobre o reservatório contendo a solução de cristalização. Adaptado de ²¹⁰.

A identificação inicial das condições de cristalização foi feita pelo método da “gota sentada”, utilizando o robô de cristalização *Honeybee 931* (Genomic solutions). Nesse ensaio, foram testados dois kits comerciais: PEG I e AmSO₄ Suite (QIAGEN), totalizando 192 condições diferentes. As gotas eram compostas por 1 µL de proteína em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 e NaCl 300 mM, e 1 µL de cada solução de cristalização.

Após 72 horas, foram observados cristais em 32 condições testadas. Dentre elas, a condição cuja composição era: ácido cítrico 0,1 M, pH 5,0, adicionado de sulfato de amônio

0,8 M, foi escolhida para otimização por apresentar cristais maiores e morfologicamente mais bem formados do que os observados nas demais condições.

A etapa de otimização consistiu na variação de dois parâmetros da condição de cristalização: a concentração de sulfato de amônio que foi variada de 0,2 M a 1,0 M com intervalo de 0,2 M, contra o pH, que variou de 4,0 a 5,5 a cada 0,5. Nessa etapa foi utilizada a técnica da “gota pendurada”. Após 24 horas foi possível observar cristais em forma de placas. Todos os experimentos de cristalização foram realizados a temperatura controlada de 18 °C.

O cristal obtido na condição composta por ácido cítrico 0,1 M, pH 5,0 e sulfato de amônio 0,8 M foi selecionado com base em sua morfologia e escolhido para a coleta de dados por difração de raios-X na linha de luz MX-2 do LNLS.

5.12 Coleta e processamento de dados de difração de raios-X

A cristalografia estrutural se baseia no espalhamento de raios-X por elétrons dos átomos que compõe a amostra investigada. Outros métodos se baseiam no espalhamento de nêutrons, por exemplo, que embora muito importantes, são responsáveis apenas por uma pequena fração das estruturas de macromoléculas publicadas.²¹¹

O cristal da amostra proteica é exposto a um feixe de raios-X monocromático com comprimento de onda geralmente da ordem de 0,8 a 1,6 Å, dependendo da fonte de raios-X e da estratégia de coleta empregada, que deve sempre visar a maior qualidade e completeza dos dados adquiridos, além de preservar a amostra cristalina para evitar danos causados pelo excesso de exposição à radiação. Os elétrons dos átomos das moléculas que compõe o cristal, quando expostos à radiação, passam então a vibrar e espalhar radiação de mesmo comprimento de onda da radiação incidente e em todas as direções.²¹¹

Um cristal é interpretado matematicamente como uma rede periódica de unidades denominadas células unitárias, que se repetem ao longo de todo o volume do cristal, em três direções, a, b e c, podendo portanto, ser tratado como uma rede de difração tridimensional. A partir da célula unitária podemos reconstruir o cristal por operações de translação ao longo de eixos não colineares.²¹¹ Como resultado, o espalhamento de raios-X é enormemente aumentado em direções preferenciais e completamente ausente em outras. Esse fenômeno é regido pela geometria (tamanho e forma) da célula unitária do cristal e pelo comprimento de

onda dos raios-X incidentes, que deve ter as mesmas dimensões que as distâncias interatômicas (das ligações químicas) nas moléculas.²¹¹

A intensidade de cada raio difratado depende do arranjo de todos os átomos na célula unitária do cristal. Em outras palavras, a estrutura do cristal está codificada nas ondas difratadas e a forma e a simetria da célula definem a direção dos raios difratados. Em contrapartida, a localização de todos os átomos na célula e a quantidade de elétrons de cada átomo define sua intensidade. A observação de um ponto de difração em uma dada direção, também chamada de reflexão, ocorre quando a interferência entre as ondas que compõem a radiação eletromagnética, espalhadas nessa direção é construtiva, em condição dada pela lei de Bragg.²¹¹

Cada reflexão, como uma onda, pode ser caracterizada pela sua amplitude e fase. Entretanto, apenas as amplitudes das reflexões podem se obtidas das intensidades medidas e nenhuma informação sobre as fases das reflexões é fornecida pelo experimento de difração de raios-X. De acordo com a teoria já bem estabelecida de difração, para obtermos a estrutura a partir de um padrão de difração individual (no nosso caso, a distribuição de elétrons na célula unitária do cristal) é necessário calcular a transformada de Fourier do fator de estrutura do cristal, que é a contribuição de todas as ondas espalhadas em um experimento de difração, considerando-se a fase de cada onda, que deve ser obtida por algum método experimental. Após o processamento dos dados, o faseamento e a obtenção do mapa de densidade eletrônica inicial, ocorre a construção de um modelo atômico. Os pontos de alta densidade eletrônica estão relacionados à posição dos átomos da proteína na célula unitária, assim, o modelo pode ser construído. Posteriormente, o modelo atômico é refinado, aplicando-se restrições geométricas e pesos adequados para o melhoramento das fases e o ajuste de alguns parâmetros estatísticos.²¹¹

Adicionalmente, o processo de refinamento envolve rodadas alternadas de otimização automática e correções manuais, realizadas nos espaços recíproco e real respectivamente, que melhoram a concordância do modelo tridimensional com o dado experimental (fator de estrutura). Tais correções são necessárias porque os parâmetros refinados automaticamente podem se limitar a um mínimo energético local, ao invés de levar à solução global, ou à melhor solução.²¹¹

Um esquema resumido das etapas envolvidas na determinação da estrutura cristalográfica de uma proteína por difração de raios-X é mostrado na figura 31.

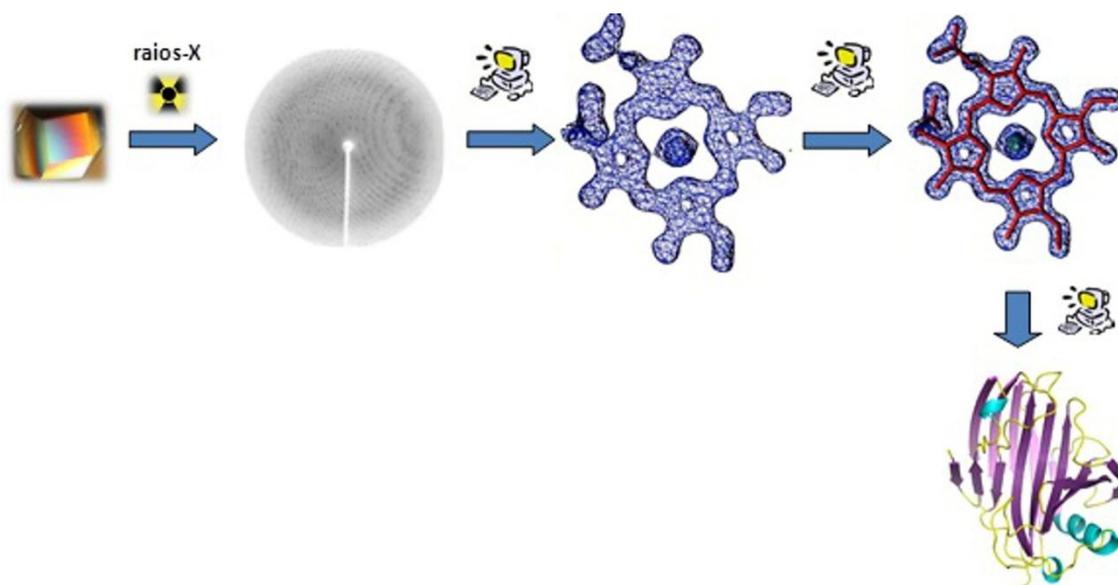


Figura 31 - Representação esquemática simplificada das etapas de determinação da estrutura cristalográfica de proteínas por difração de raios-X. O cristal é submetido ao experimento de difração de raios-X, a partir do qual é obtido o padrão de difração. A partir desse, por meio de métodos computacionais, são obtidas as densidades eletrônicas que permitem a construção e o refinamento do modelo da proteína.

Para a realização dos experimentos de difração de raios-X, os cristais foram crioprotetidos com etileno glicol 15% ($v v^{-1}$) e coletados a temperaturas criogênicas (100 K) em fluxo de vapor de nitrogênio. As coletas foram realizadas na linha de cristalografia de proteínas MX-2, do LNLS em Campinas, com um sistema de aquisição que utiliza o detector *Marmosaic-225 CCD* (MarUSA), a um comprimento de onda de 1,45 Å. O conjunto de dados foi obtido por meio do método de rotação ($\Delta\phi = 0,5^\circ$) com o objetivo de coletar o máximo de reflexões e alcançar alta completude e multiplicidade. A coleta, bem como o processamento dos dados cristalográficos, foram realizados em colaboração com a Dr^a. Amanda Bernardes Muniz.

De posse das primeiras imagens de difração foi possível determinar os parâmetros de dimensão e orientação da célula unitária (a , b , c , α , β e γ), além de determinar o grupo pontual e estimar a mosaicidade. Esse passo é necessário para planejar uma estratégia eficiente de coleta de dados, minimizando o tempo de exposição do cristal ao feixe de raios-X e maximizando a qualidade dos resultados. A autoindexação das primeiras imagens e a estratégia de coleta foram realizadas pelo programa *iMOSFLM*.²¹²

A integração do conjunto de imagens de difração e o refinamento dos parâmetros cristalinos foram realizados com o programa XDS.²¹³ Nesse processo, a intensidade de cada reflexão é quantificada e cada imagem em um mesmo conjunto de dados tem a intensidade média gravada em escalas diferentes, que é consequência de vários fatores, incluindo a variação da radiação incidente, a absorção de raios difratados ou a distribuição do cristal. Logo, há a necessidade de escalonar essas intensidades e agrupar todos os dados. Para isso, foi utilizado o programa SCALA, que faz parte do pacote de programas CCP4.²¹⁴

O número de moléculas presentes na unidade assimétrica e o conteúdo de solvente foram estimados utilizando o programa Matthews_coeff²¹⁴, que faz uso da metodologia proposta por Matthews.²¹⁵

5.12.1 Obtenção das fases e refinamento das estruturas cristalográficas

Após a integração e o escalonamento dos conjuntos de dados, o programa *Phenix.xtriage*²¹⁶ foi utilizado na identificação de patologias do cristal, como por exemplo, a presença de *twinning*.

Para resolver o problema das fases foi aplicada a técnica de substituição molecular utilizando o programa PHASER²¹⁷, que utiliza informações de similaridade estrutural. O modelo empregado para a substituição molecular foi o da estrutura homóloga de uma endo- β -1,4-glucanase específica de xiloglucano (XEG) com resolução de 1,9 Å (PDB ID 3VL8).²¹⁸ Após a obtenção das fases, o modelo foi submetido ao refinamento. Esse é um processo em que se busca encontrar a melhor concordância entre o modelo proposto e sua estrutura real. Esta concordância deve refletir uma igualdade entre os fatores de estrutura calculados (F_{calc}) e os fatores de estrutura observados (F_{obs}).

O acompanhamento da qualidade do processo de refinamento é feito por meio do cálculo do fator R (R_{factor}), que mede a discrepância entre F_{calc} e F_{obs} . Como o fator R pode ser minimizado artificialmente, por um processo de super-refinamento (*over-fitting*), uma pequena porcentagem das reflexões é excluída do refinamento e utilizada como um conjunto de teste para a validação cruzada no cálculo de um novo fator R, chamado R_{free} , que é isento de minimização artificial. Para o refinamento dos conjuntos de dados obtidos foi utilizado o programa Phenix²¹⁶, que apresentou o melhor desempenho. Durante todo o processo, foram

realizados ciclos alternados de refinamento com inspeção visual do mapa de densidade eletrônica, remodelando manualmente as posições dos resíduos com o programa COOT.²¹⁹

A validação do modelo foi feita com o programa MolProbity.²²⁰

Resultados e Discussão



*“O começo de todas as ciências é o
espanto de as coisas serem o que
são”*

Aristóteles



6 Resultados e Discussão

6.1 Clonagem e produção em *A. niger* py11

A amplificação (figura 32) e a clonagem do gene *cel12A* no vetor ANIp7G de *G. trabeum*, a partir de da biblioteca de cDNA, ocorreu com sucesso.

Os transformantes de *A. niger* py11, após seis dias de incubação a 30 °C foram testados quanto à produção da proteína recombinante. Uma colônia positiva com o maior rendimento da produção da GtCel12A em meio MM J foi escolhida para o escalonamento em frascos *Erlenmeyer* contendo 500 mL de meio.



Figura 32 - Amplificação do gene *cel12A* a partir do cDNA de *G. trabeum*. Gel de agarose 1% evidenciando a banda de 741 pb correspondente ao gene *cel12A*.

6.2 Produção e purificação da proteína

Após seis dias de cultivo a 30 °C em estufa, a banda correspondente à enzima GtCel12A foi identificada com sucesso no extrato proteico por meio de SDS-PAGE¹⁸³, o que confirma o sucesso do escalonamento da produção da proteína.

Após a remoção do sal do extrato proteico por meio da utilização da coluna Sephadex G25 (GE Healthcare) e passos posteriores de purificação com as colunas de troca iônica e exclusão molecular Q Sepharose e Superdex™ 75 16/60 (GE Healthcare) respectivamente, a pureza da amostra foi confirmada por SDS-PAGE.¹⁸³

Na primeira etapa de purificação em uma coluna Q Sepharose equilibrada com tampão Bis-Tris 50 mM, pH 6,0, a enzima foi eluída com uma concentração de NaCl de aproximadamente 100 a 200 mM.

O refinamento da purificação foi realizado com sucesso na segunda coluna, a Superdex 75 16/60, equilibrada com tampão citrato de sódio 50 mM, pH 3,0 (figura 33).

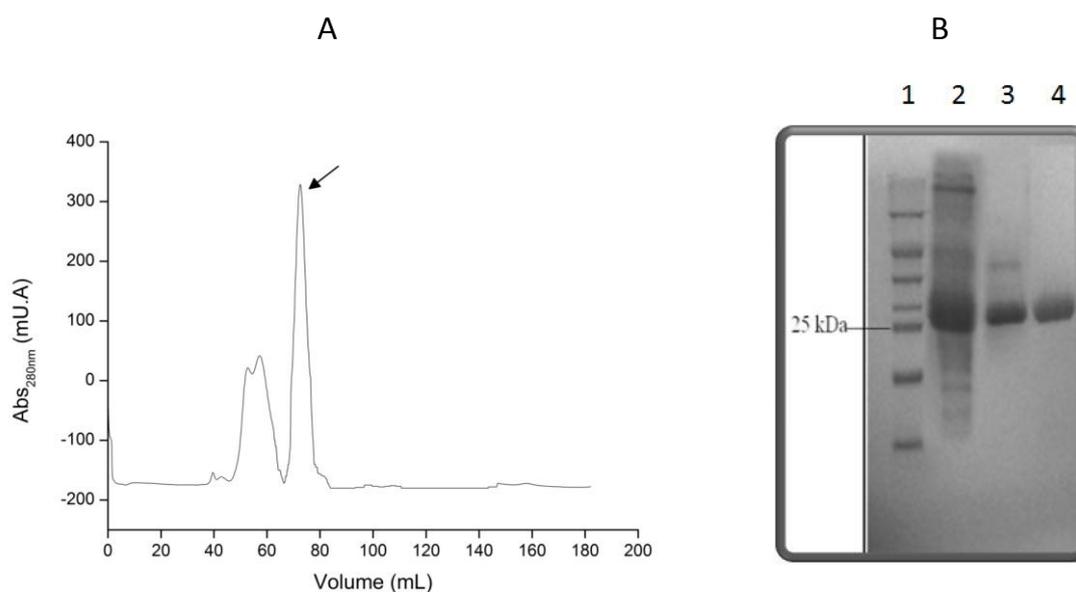


Figura 33 - Purificação da enzima GtCel12A. **A.** Cromatograma da segunda etapa de purificação por cromatografia de exclusão molecular, em coluna Superdex 75 16/60, onde o maior pico (indicado pela flecha) corresponde a eluição da GtCel12A. **B.** SDS-PAGE 15%, utilizado para análise da pureza da amostra, sendo: 1- marcador de massa molecular com destaque para a banda de 25 kDa. 2- Amostra de extrato bruto obtido por produção heteróloga da GtCel12A pelo fungo *A. niger*. 3-Fração obtida na etapa de purificação com coluna Q Sepharose FF. 4-Fração eluída da coluna Superdex 75 16/60 com a proteína pura.

6.3 Identificação por espectrometria de massas

A análise por espectrometria de massas permitiu a identificação de alguns peptídeos, a partir dos peptídeos trípticos obtidos, na sequência primária da GtCel12A. A cobertura da sequência obtida foi de 32%, o que confirma que a proteína pura é a GtCel12A recombinante (figura 34).

```

1 MFRFISALPF ALGALKLASA ATVLTGQYTC DTAGDYTLN DQWGIANGVG
51 SQTSTLISAS GSTISWSTNY TWANNPNDVK TYANVLSNTA KGVQISQISS
101 FPTTWDWYYE TQSSGLRADV SYDMWTGTAQ TGTAASSSSS YEIMIWLSGK
151 GGIQPVGSLK TSGISLAGYT WNLWSGTTET WTTLSFVSAD GDITSFNAEL
201 TPFFQYLVEN EGVASQYIQ AIQTGTEAFT GTAELVTTSF SVLSLG

```

Figura 34 - Sequência de aminoácidos de GtCel12A e os peptídeos identificados (vermelho) a partir da análise por LC/MS após tripsinização da banda obtida por SDS-PAGE. Os peptídeos identificados resultaram em 32% de cobertura da sequência.

6.4 Caracterização Bioquímica

6.4.1 Estimativa da massa molecular real por cromatografia de exclusão molecular

Os resultados da estimativa da massa molecular obtida por cromatografia de exclusão molecular indicam uma proteína com massa de $26,20 \pm 0,01$ kDa, o que coincide com a massa teórica estimada a partir da sequência primária da proteína (26,10 kDa), obtida por meio da ferramenta ProtParam do portal ExPASy.²²¹

As massas moleculares estimadas por cromatografia de exclusão molecular ($26,20 \pm 0,01$ kDa) e SAXS (28,30 kDa) confirmaram que a GtCel12A apresenta-se como um monômero em solução. Tais resultados são consistentes com as massas moleculares de monômeros comumente reportados para proteínas da família GH12, que são relativamente pequenas (23 a 27 kDa) e que possuem apenas o domínio catalítico.²²² Adicionalmente, essas características, como o tamanho pequeno e a falta de CBM, podem estar associadas à maior penetrabilidade destas enzimas em pequenos poros da celulose.^{158, 223}

6.4.2 Eletroforese em gel nativo (em condições não-desnaturantes)

A eletroforese em condições nativas permitiu a observação de uma única banda localizada abaixo do marcador de 66 kDa, o que indica que a proteína possui apenas uma forma oligomérica (figura 35). Posteriormente, os resultados de SAXS confirmaram que em solução, a proteína apresenta-se na forma monomérica conforme estimado pelo programa SAXS MoW.²⁰¹

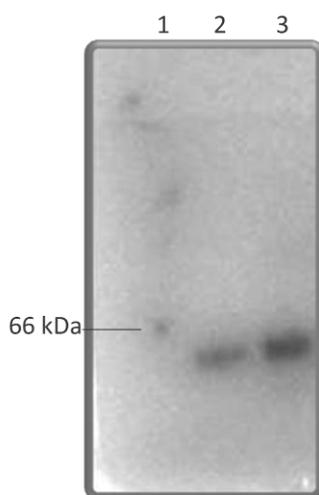


Figura 35 - Gel nativo da enzima GtCel12A. 1- Marcador de massa molecular, com destaque para a banda de 66 kDa, 2- Amostra de GtCel12A em uma concentração de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, 3- Amostra de GtCel12A em uma concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$.

6.4.3 Especificidade por substratos

A enzima pura teve sua atividade testada sobre 21 substratos diferentes e apresentou atividade nos seguintes substratos: β -glucano de cevada (ligações do tipo β -1,3 e β -1,4), liquenano de musgo islandês (β -1,3 e β -1,4) (63% de atividade relativa à máxima observada em β -glucano), CMC (β -1,4) (41%) e menores atividades foram observadas em PASC (29%), Avicel (20%), Sigmacell (19%) e papel de filtro (4,6%), conforme mostrado na figura 36.

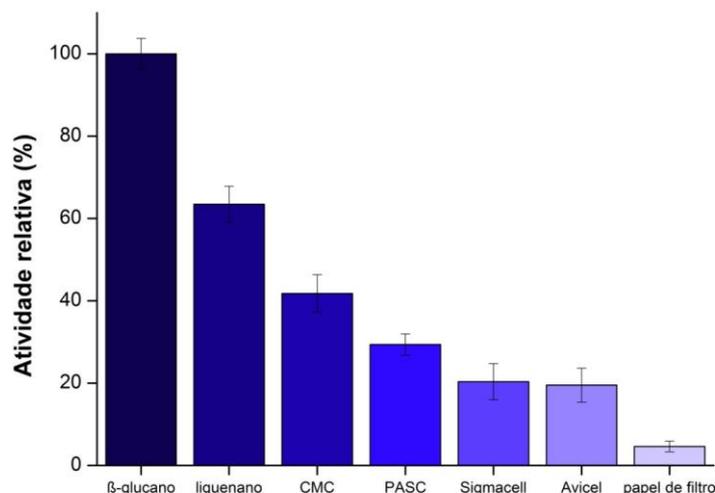


Figura 36 - Perfil da especificidade por substratos da enzima GtCel12A. Histograma representado em termos de atividade relativa após 30 minutos de incubação da enzima sob condições ótimas (50 °C e pH 4,5), com os diferentes substratos. A maior atividade observada foi em β-glucano, seguida de liquenano, CMC, PASC (celulose amorfa), Sigmacell, Avicel e papel de filtro.

Poucos estudos sobre hidrolases de glicosídeos da família 12 que reportaram a especificidade por substratos, investigaram-na em uma vasta gama de substratos, em comparação com o número de enzimas desta família que já foram caracterizadas bioquimicamente, de acordo com a informação disponível no CAZy (<http://www.cazy.org/glicosídeo-Hydrolases.html>).¹⁴³ Tais estudos são geralmente limitados aos substratos mais comuns, como CMC e PASC. Os resultados de especificidade por substratos para a GtCel12A corroboram os estudos anteriores que relataram atividades em outros substratos além de apenas celulose para endoglucanases da família GH12.^{45, 222, 224- 225} Shimokawa, Shibuya et al. (2008) relataram liquenano (β-1, 3 e β-1, 4 ligações) como o melhor substrato para uma endoglucanase (EG-II) de *Fomitopsis palustris*, mas também observaram atividade em β-glucano de cevada, pachymanana (β -1,3), laminarina (β-1,3), CMC (β-1,4), pustulana (β-1,6), glucomanano de Konjac e *Larix sp* e xiloglucano de tamarindo (β-1,4).²²⁶ Em outro estudo, foram detectadas atividades em CMC, celulose amorfa e uma menor atividade em xilano e manano para a endoglucanase EG 28 (Cel12A) de *Phanerochaete chrysosporium*.²²⁷ Tambor, Ren et al. (2012) também relataram atividades em papel de filtro, PASC e Avicel para uma Cel12A heteróloga de *G. trabeum* produzido na cepa de *A. niger* CBS 513,88 (FGSC A1513), no entanto, o trabalho anterior carece de mais informações sobre

a atividade da Cel12A, pois não a investigaram em uma ampla gama de substratos como demonstramos aqui.²²⁸

Particularmente em nosso trabalho, uma elevada atividade enzimática também foi observada em liquenano (63% da atividade máxima), o que concorda com resultados anteriores que relataram uma preferência por substratos com ligações mistas como β -glucano e liquenano, por exemplo, a polissacarídeos com apenas ligações do tipo β -1,4 para membros da família GH12. Tais resultados confirmam que a GtCel12A, bem como os outros membros desta família, não estão limitados a substratos a base de celulose.^{148-151, 226}

Grishutin, Gusakov et al. (2006), por meio do estudo de uma endo-(1,4)- β -glucanase semelhante à liquenase de *Aspergillus japonicus*, encontraram resultados semelhantes aos aqui apresentados, já que β -glucano de cevada e liquenano foram relatados como os melhores substratos para a atividade desta enzima, com atividades específicas de 263 e 267 U mg⁻¹, respectivamente.²²⁴

As enzimas da família GH12 geralmente não apresentam CBMs e, assim, preferencialmente degradam a celulose amorfa, em detrimento de celulose cristalina, mas é importante notar que mesmo as celuloses microcristalinas comerciais, Avicel (Fluka) e Sigmacell (Sigma-Aldrich), contêm regiões amorfas e são substratos heterogêneos. Estudos anteriores relataram um índice de cristalinidade de 92,97% para o Avicel, enquanto que o Sigmacell mostrou um menor grau de cristalinidade, de 91,54% para o tipo 20 e de 54,70% para o tipo 101, de acordo com resultados de difração de raios-X.²²⁹⁻²³⁰

6.4.4 Determinação das condições ótimas para a atividade da enzima e atividade residual

Os perfis de pH e temperatura em β -glucano indicaram que o melhor pH e temperatura são 4,5 e 50 °C, respectivamente (figura 37). Sob as condições ótimas de pH, temperatura e concentração de enzima (dados não mostrados), a atividade específica observada para a GtCel12A foi de $239,2 \pm 9,1$ U mg⁻¹, a maior atividade já reportada para esta enzima.

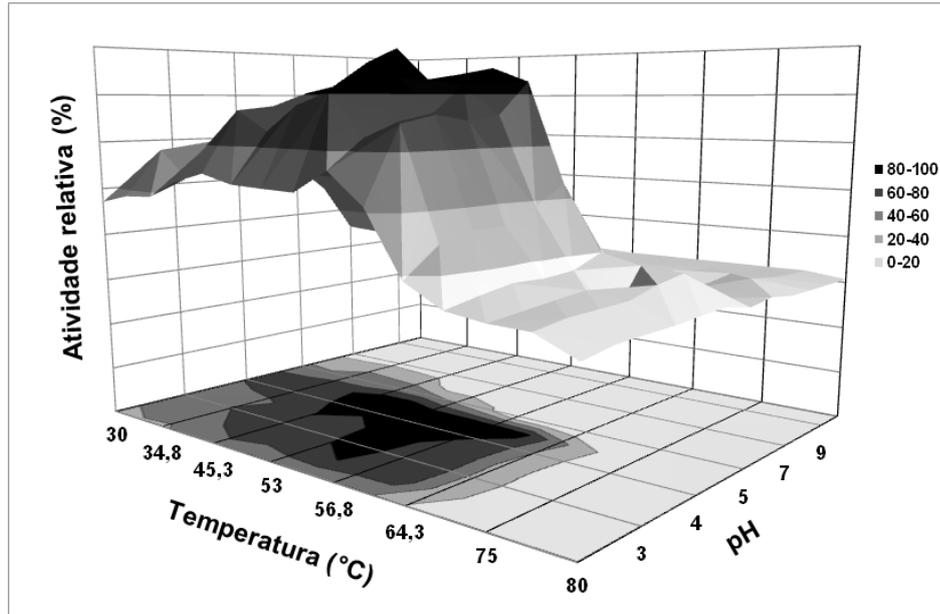


Figura 37 - Perfil tridimensional da atividade relativa da GtCel12A sob diferentes valores de temperatura e pH. O intervalo de temperatura testado foi de 30 a 80 °C e de pH, de 1 a 10. A maior atividade observada foi em pH 4,5 a 50 °C, que correspondem às condições ótimas para a atividade de GtCel12A em β -glucano.

Outra consideração importante é que a GtCel12A mostrou um comportamento acidofílico e manteve cerca de 40% de sua atividade, mesmo para o menor pH testado (1) (figura 38), resultado esse que pode ser de interesse biotecnológico, principalmente em relação à produção de etanol de 2ª geração, já que a etapa de fermentação alcoólica dos açúcares normalmente ocorre sob valores de pH de 4,5/5,0.

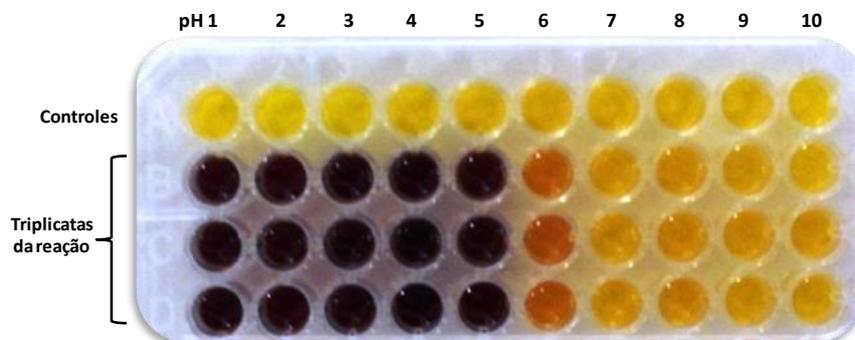


Figura 38 - Resultado do ensaio colorimétrico de atividade da enzima GtCel12A em β -glucano, pelo método do DNS.¹⁸² Da esquerda para a direita, pHs de 1 a 10 e de cima para baixo, destaque para os controles e as triplicatas da reação. Nota-se que a enzima apresenta alta atividade em pHs de 1 a 5, sem grandes diferenças de intensidade da cor e uma atividade menor em pH 6, quando a partir de então, passa a apresentar atividade desprezível até a total ausência de atividade em pH 10.

Os ensaios de estabilidade térmica revelaram que a GtCel12A é uma enzima bastante estável, com uma meia-vida de $84,6 \pm 3,5$ horas a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (figura 39). Adicionalmente, a enzima manteve cerca de 30% de sua atividade, mesmo após 120 horas de incubação a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tais resultados diferem dos resultados anteriores reportados para essa enzima, obtidos com CMC, onde foi observada uma meia-vida muito mais baixa, de apenas 2 horas.²²⁸ Apesar dessa divergência em relação à estabilidade térmica da GtCel12A, as condições ótimas aqui expostas estão de acordo com estudos prévios sobre caracterização de enzimas da família GH12.^{228, 231}

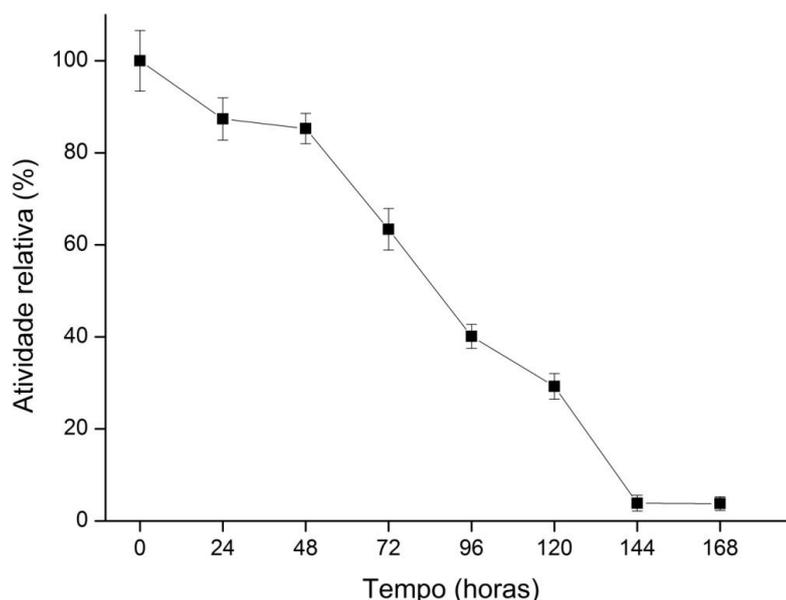


Figura 39 - Atividade residual da enzima GtCel12A. Os valores são apresentados em termos de atividade relativa. A enzima foi incubada por até 168 horas a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ e posteriormente foi testada quanto a sua atividade no substrato (β -glucano) por 15 min, a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.4.5 Estabilidade térmica avaliada por Thermofluor

O ensaio de estabilidade térmica por meio do método Thermofluor permitiu a identificação dos melhores pHs para a manutenção da estabilidade da estrutura terciária da proteína, em função da temperatura.

As curvas de Thermofluor para todos os pHs são mostradas na figura 40, onde observa-se picos do sinal de fluorescência em diferentes temperaturas para cada pH testado. No pH 10, mesmo a baixas temperaturas, detectamos um alto sinal de fluorescência desde o início do experimento, sugerindo que pelo menos grande parte das moléculas da enzima já estava desenovelada, o que pode ser confirmado pelo baixo valor de T_m observado ($30,2\text{ }^\circ\text{C} \pm 1$) em relação aos demais pHs.

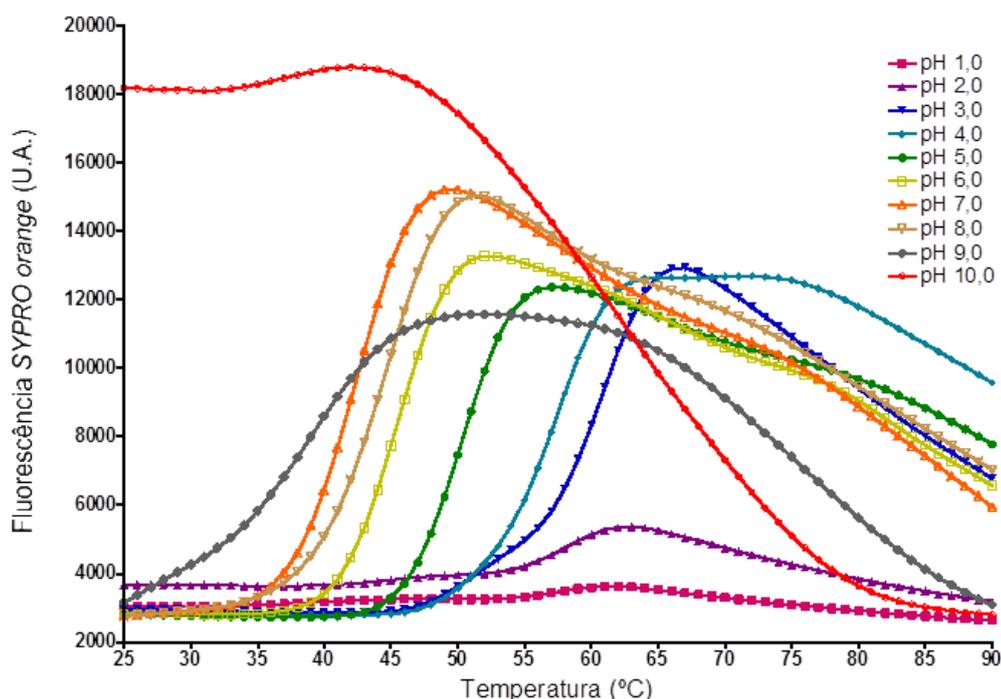


Figura 40 - Curvas de Thermofluor para a GtCel12A, obtidas por meio da análise da intensidade de fluorescência em função da temperatura. O intervalo de temperatura analisado foi de 25 a 90 °C, com incremento de 1 °C, para pHs de 1 a 10.

Em relação aos valores de T_m obtidos (figura 45), o maior valor foi observado para o pH 3, seguido do pH 4 e 2 respectivamente, sugerindo que a enzima é mais estável, em função da temperatura, em pH 3. Esse resultado difere ligeiramente do pH ótimo encontrado para a atividade da GtCel12A (4,5) no ensaio para a determinação das condições ótimas de atividade, sugerindo que a enzima requer uma certa flexibilidade para explorar a gama de conformações necessárias para sua atividade ótima.

A partir do pH 3, observa-se a diminuição progressiva dos valores de T_m , até o mínimo observado para o pH 10 (figura 41). Foi possível concluir também que a proteína apresenta

uma maior estabilidade em pHs mais ácidos em detrimento de pH alcalino, o que também é verdade para a atividade dessa enzima, conforme discutido na seção 6.4.4.

As enzimas da família GH12 apresentam grande variedade em relação à estabilidade térmica²³², principalmente quando reportada em função da T_m , sendo que, dentre as enzimas estudadas, a diferença da menos para a mais estável é de 20,9 °C.²³³ Essa diferença de estabilidade entre proteínas homólogas é comum e tem sido objeto de interesse na investigação das causas de uma estabilidade aumentada em organismos extremófilos²³¹. Características como o comprimento de *loops* ou o grau de empacotamento da estrutura, interações eletrostáticas, hidrofóbicas e pontes dissulfeto são comumente associadas a diferenças de estabilidade entre proteínas homólogas.²³⁴⁻²³⁵

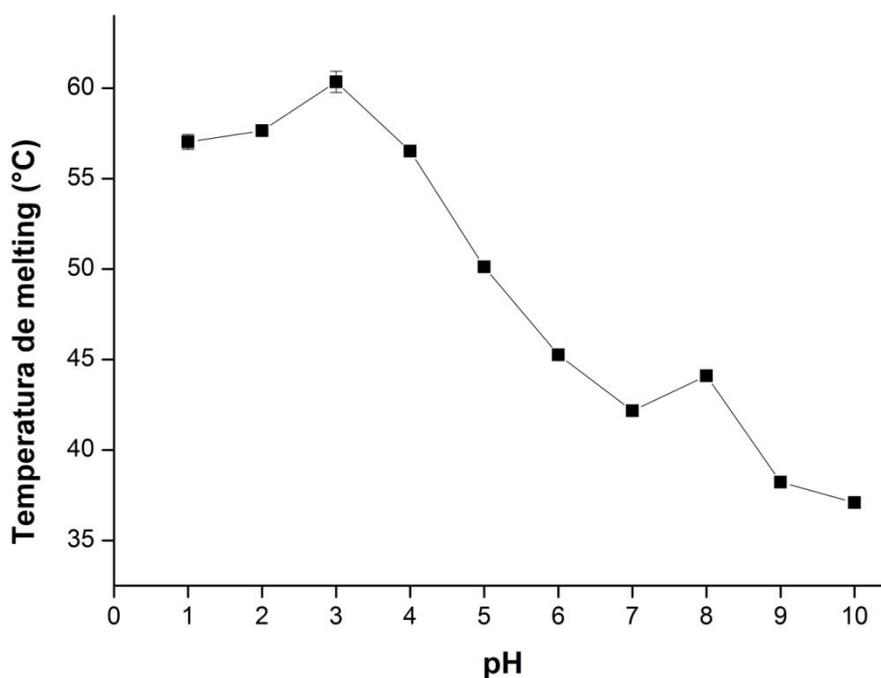


Figura 41 - Variação da Temperatura de *melting* (T_m) em função do pH. Dentre os pHs testados (1 a 10), o maior valor de T_m foi observado para o pH 3 ($60,4 \pm 0,6$ °C).

6.5 Cinética enzimática

Os parâmetros cinéticos observados para a GtCel12A em β -glucano foram: K_m ($3,2 \pm 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) e V_{\max} ($0,40 \pm 0,02 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1}$). A curva de Michaelis-Menten pode ser vista na figura 42. Tais resultados são muito próximos aos valores reportados para uma endo-(1,4)- β -glucanase semelhante à liquenase de *Aspergillus japonicus*, também da família 12, cujo valor de K_m em β -glucano foi de $3,3 \pm 0,6 \text{ mg mL}^{-1}$.²²⁴

Outro estudo já havia reportado os parâmetros cinéticos para a GtCel12A, porém utilizando-se CMC e PASC²²⁸, o que torna os resultados aqui apresentados, inéditos.

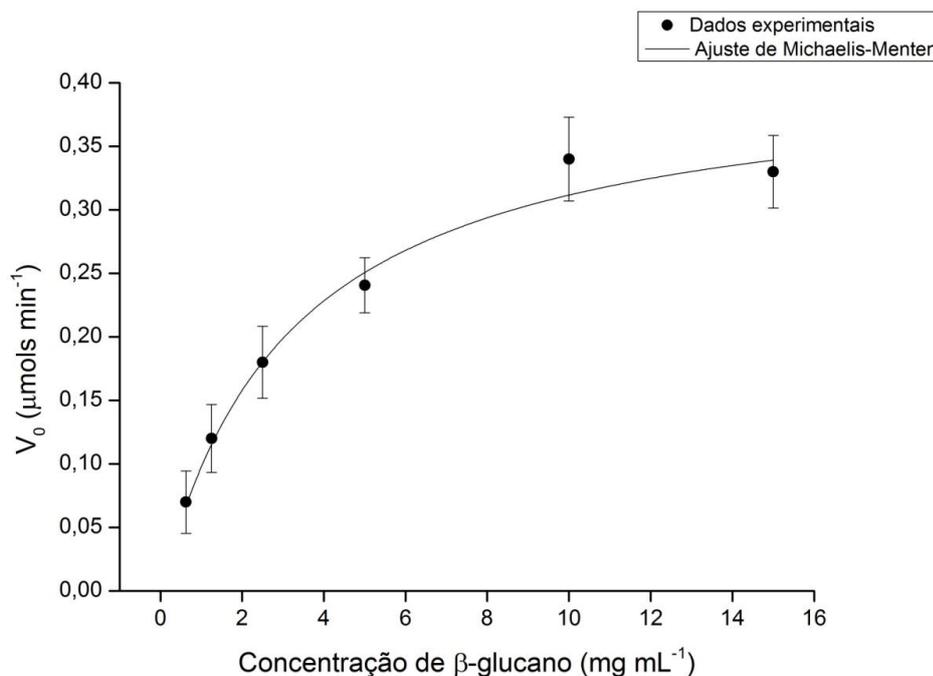


Figura 42 - Curva de Michaelis-Menten para a GtCel12A. O substrato utilizado foi o β -glucano em diferentes concentrações: 0,60; 1,25; 2,50; 5,00; 10,00 e 15,00 (mg mL^{-1}). A partir desse gráfico, pelo ajuste de Michaelis-Menten disponível no software Origin v 8.6 (OriginLab), foi possível determinar os parâmetros cinéticos K_m ($3,2 \pm 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) e V_{\max} ($0,40 \pm 0,02 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1}$).

A comparação de dados de cinética enzimática para celulasas é normalmente difícil, pois as propriedades cinéticas, comumente reportadas em função dos parâmetros K_m e V_{\max} , apresentam uma grande variação na ordem de grandeza. Tal variação é devida à

heterogeneidade das metodologias de quantificação, à forma de apresentação de seus valores, ao substrato utilizado e, principalmente, à origem do extrato enzimático.²³⁶⁻²³⁷

6.6 Microscopia eletrônica de varredura com fonte de elétrons por emissão de campo

A análise por MEV da morfologia do papel de filtro, utilizado como modelo de substrato celulósico, demonstra o efeito hidrolítico da enzima GtCel12A. Em aumentos pequenos, como na figura 43A, é possível observar que a trama fechada das fibras de celulose, presente nas amostras controle (onde a enzima não foi adicionada), torna-se mais aberta e frouxa, com falhas e evidentes sinais de degradação. As fibras mais finas, que formam um tecido quase contínuo que preenche os interstícios entre as fibras mais grossas desaparecem, deixando lacunas. Este efeito é notado com mais intensidade após a hidrólise por 24 horas do que por 12 horas. Posteriormente às 24 h de hidrólise, mesmo as fibras de celulose mais grossas apresentam sinais de degradação, como pode ser observado na figura 43B. Estas aparecem mais finas, desfiadas e com uma trama ainda mais aberta, devido ao fato de muitas fibras terem sido completamente destruídas.

Em aumentos maiores (figura 43C) é possível observar com mais detalhes as características da superfície de fibras isoladas e o efeito mais evidente da ação da enzima. Observa-se que a superfície da fibra pós-hidrólise é mais rugosa e possui mais imperfeições, enquanto que no controle da reação, a superfície é mais lisa, homogênea e possui as fibrilas (fibras de diâmetro reduzido) mais empacotadas e menos salientes. A exposição das fibrilas menores pode ser atribuída à degradação de fibrilas vizinhas, evidenciando o contorno daquelas que a enzima não destruiu.

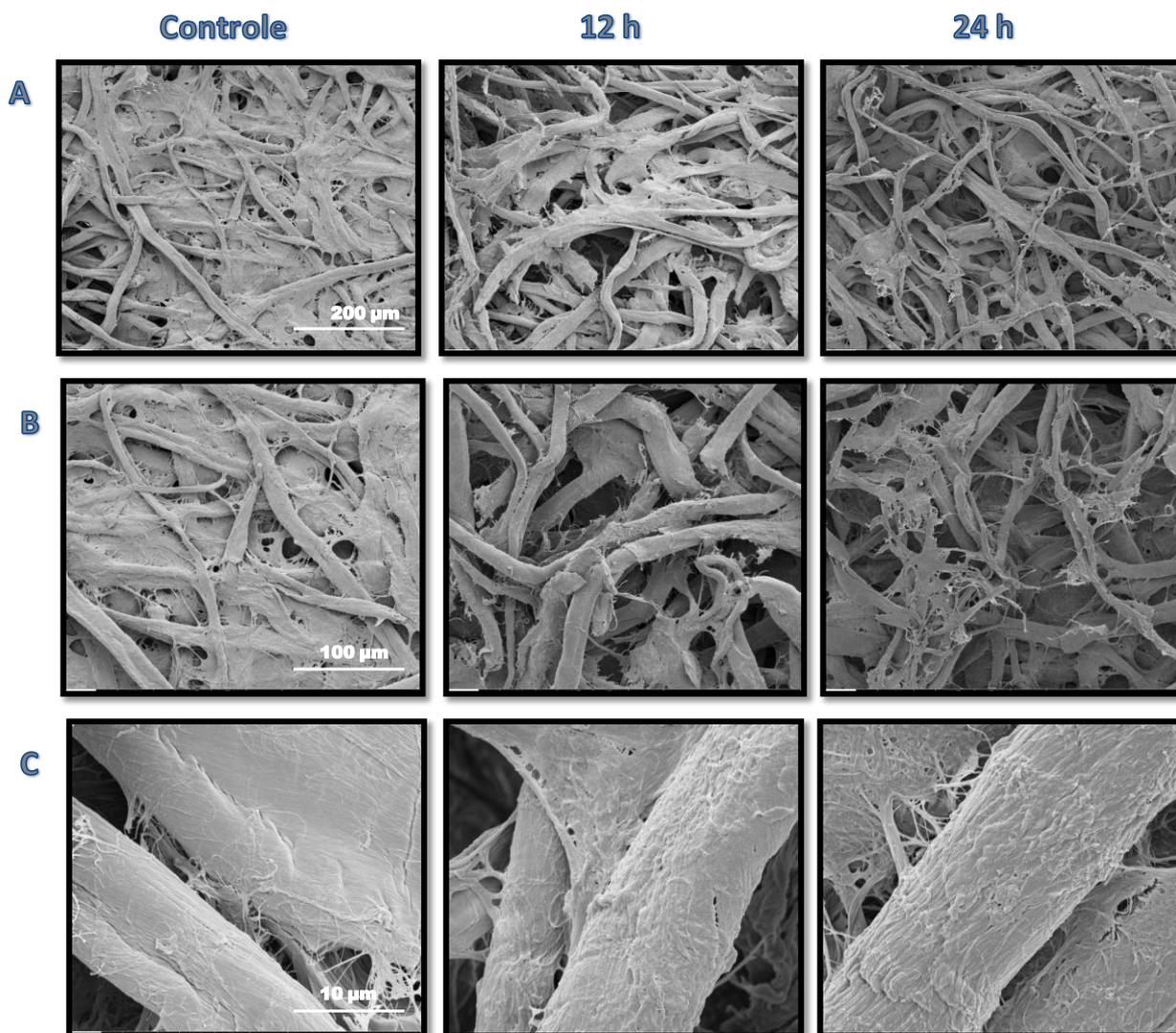


Figura 43 - Efeito da hidrólise de GtCel12A sobre papel de filtro analisado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). À esquerda, imagens em diferentes magnificações do controle da reação, no centro, efeito da hidrólise por 12 horas e, à direita, efeito da hidrólise por 24 horas a 50 °C e pH 4,5. **A.** Barra de escala de 200 μm. **B.** Barra de escala de 100 μm. **C.** Barra de escala de 10 μm.

A análise da aveia submetida à hidrólise pela GtCel12A por 12 horas permitiu-nos observar a predominância de numerosas e pequenas partículas, que não estavam presentes na amostra controle. Enquanto a aveia não hidrolisada apresentou grânulos e placas maiores e arredondadas, as amostras hidrolisadas apresentaram partículas que parecem ser resultantes do consumo das partículas maiores. Isso pode ser evidenciado no conjunto de imagens das figuras 44A e 44B (com barras de escala de 20 μm e 10 μm, respectivamente).

Na figura 44C (aumento maior, com barra de escala de 3 μm), observamos com mais detalhes a superfície das placas, sendo que no controle, a mesma é mais lisa e com forma mais

definida. Já na amostra hidrolisada, observamos a alta rugosidade e as imperfeições da superfície, com a presença de pequenos grânulos resultantes do efeito da ação da enzima, que degradou as placas maiores.

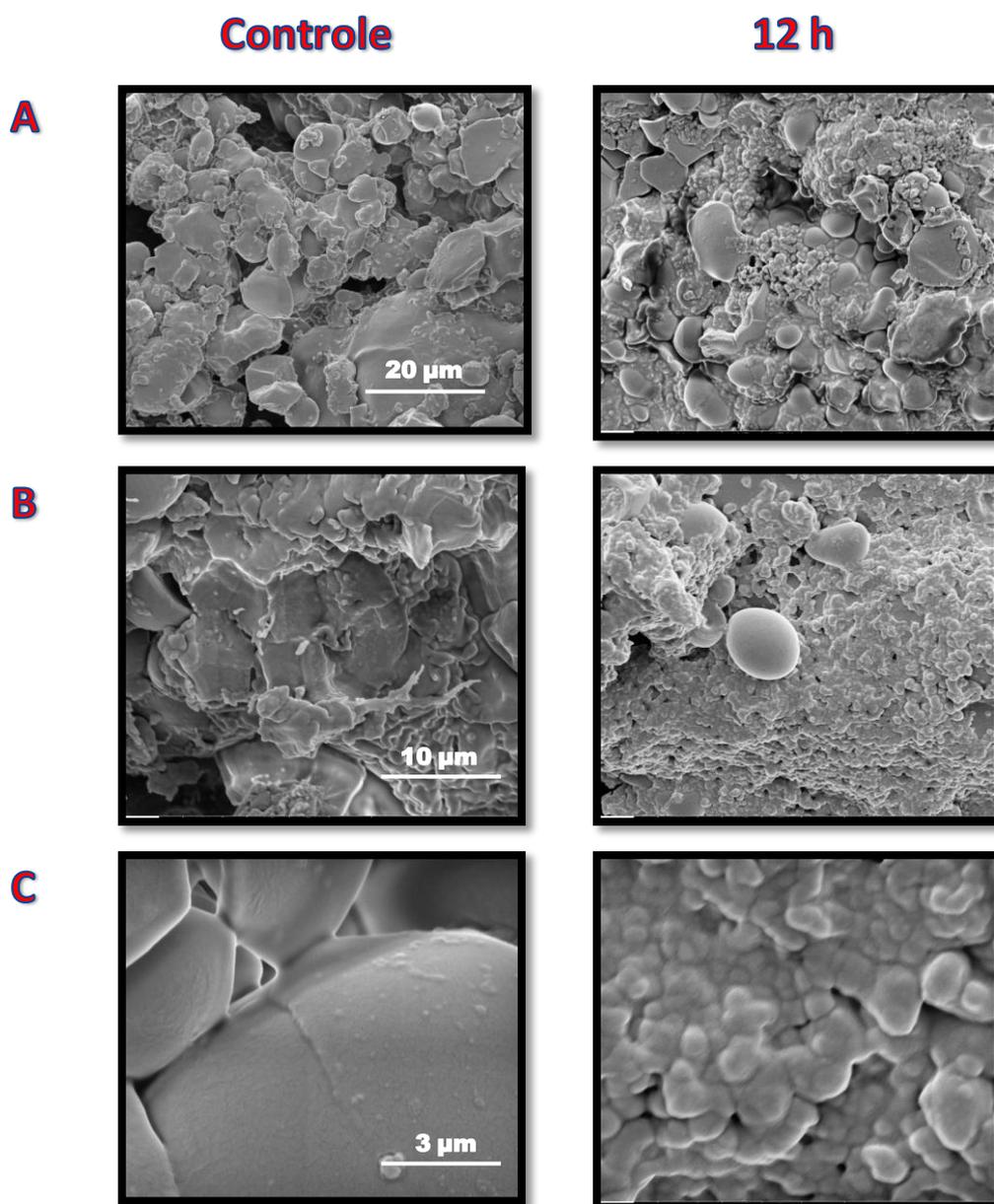


Figura 44 - Efeito da hidrólise da GtCel12A sobre flocos de aveia, analisado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). À esquerda, imagens em diferentes magnificações do controle da reação e, à direita, efeito da hidrólise por 12 horas a 50 °C e pH 4,5. **A.** Barra de escala de 20 µm . **B.** Barra de escala de 10 µm. **C.** Barra de escala de 3 µm.

6.7 Dicroísmo circular

O espectro de dicroísmo circular, obtido para a GtCel12A em diferentes valores de pH, é mostrado na figura 45. Nota-se um comportamento semelhante da enzima nos valores de pH de 1 a 9, sem grandes alterações, porém, para o pH 10, o espectro é bastante alterado, o que sugere a perda de estrutura secundária pela proteína e a provável desnaturação da mesma. Por meio do espectro, é possível observarmos um valor mínimo de elipticidade na região de 212 nm, correspondente ao pico característico de folhas β e outro positivo na região de 230 nm, que pode ser atribuído à presença de alguns cromóforos na composição da proteína, como por exemplo, os aminoácidos aromáticos triptofano e tirosina, além de cisteína. A GtCel12A possui dez resíduos de triptofano, onze de tirosinas e dois de cisteínas, que em conjunto, podem contribuir para o sinal observado em 230 nm.

É importante ressaltar também, que não foi observado um sinal negativo na região de 222 nm, que é típico de hélices α , sugerindo um baixo teor de estruturas secundárias desse tipo.

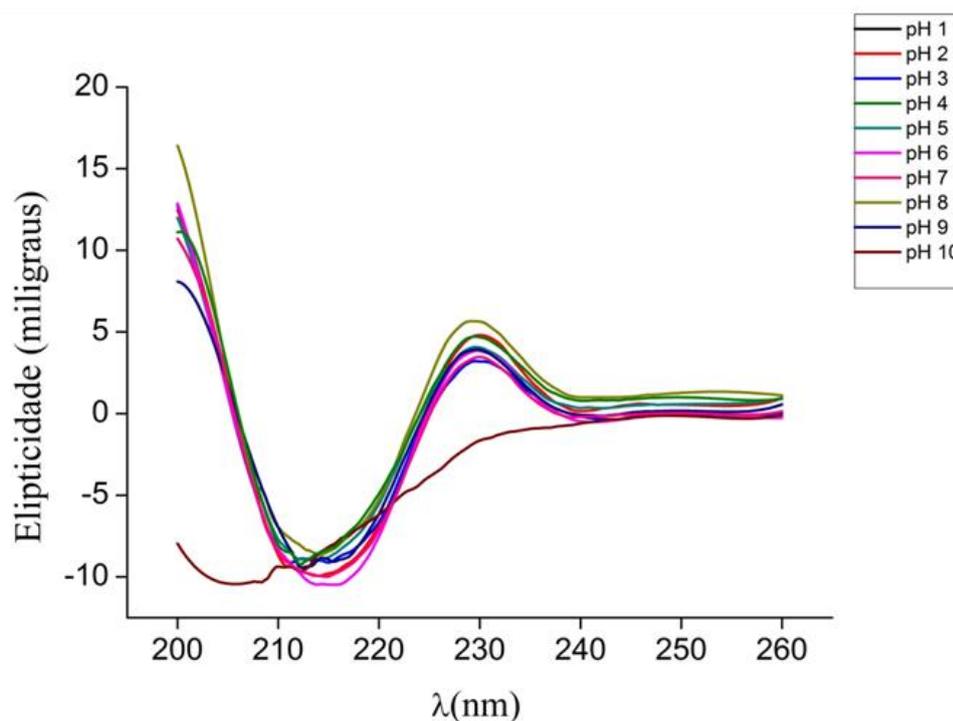


Figura 45 - Espectro de dicroísmo circular da GtCel12A em diferentes pHs. O espectro foi obtido em pHs de 1 a 10 a 10 °C e com varredura do comprimento de onda de 200 a 260 nm.

A deconvolução do espectro experimental realizada por meio do programa CONTINLL do pacote CDPro¹⁹³, utilizando-se uma biblioteca de proteínas solúveis na faixa de 190 a 240 nm, indica que a estimativa da composição de estruturas secundárias para a GtCel12A é de 35,1% de fitas β , 19,3% de voltas, 6,9% de hélices α e 38,7% de região desordenada.

6.7.1 Estabilidade térmica avaliada por CD

Os resultados da análise de estabilidade térmica em pH 3 (figura 46), sugerem que, a partir de 55 °C, ocorre uma perturbação na estrutura secundária da proteína, culminando com a diminuição brusca da elipticidade, que tende a zero. Tais observações sugerem que tenha ocorrido a desnaturação da enzima nas temperaturas mais altas. A T_m obtida por meio do ajuste de Boltzmann à curva sigmóide experimental, a partir dos dados de CD é de $60,2 \pm 0,6$ °C.

Em um estudo com uma Cel12A do fungo termofílico *Humicola grisea*, monitorado também por espectroscopia de dicroísmo circular, foi reportada uma T_m de 68,7 °C, a mais alta já reportada para uma enzima da família GH12. Já para uma Cel12A do fungo mesofílico *T. reesei*, a T_m foi de 54,4 °C.²³⁸ Nesse âmbito, nossos dados estão de acordo com o que é descrito na literatura para as demais enzimas da família GH12 já caracterizadas, em termos de estabilidade térmica, sendo que as diferenças de T_m da enzima menos para a mais estável foi de 23 °C dentre as caracterizadas.²³⁸

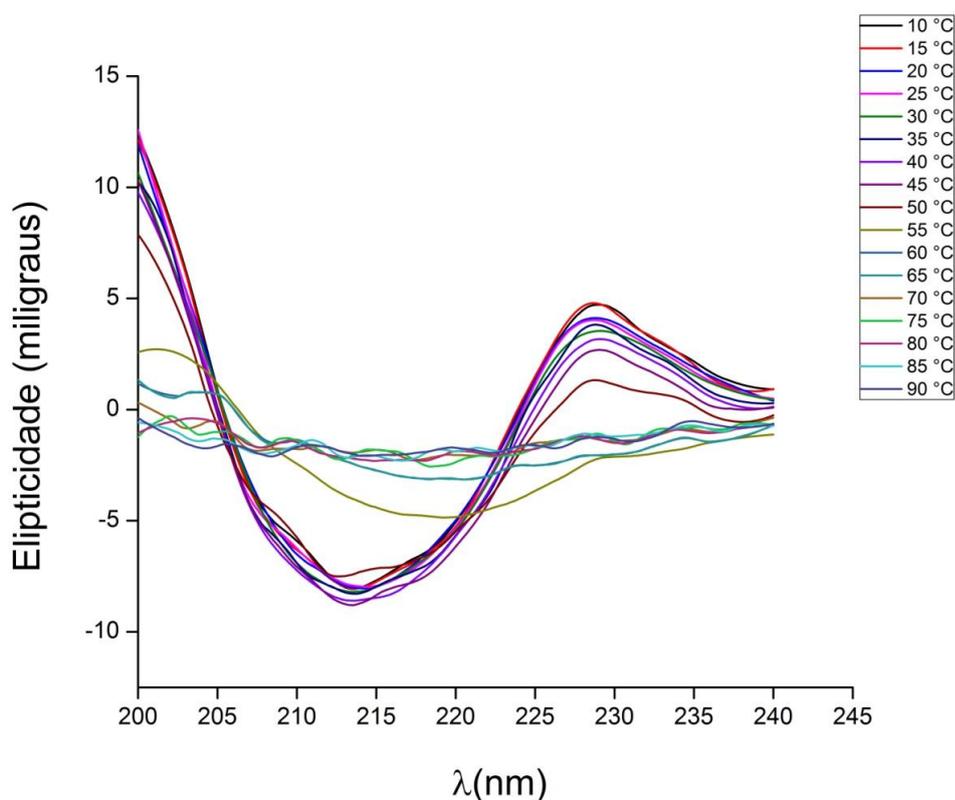


Figura 46 - Espectro de dicrosímio circular da GtCel12A em diferentes temperaturas em pH 3. O monitoramento da mudança de elípticidade foi realizado em um intervalo de comprimento de onda de 200 a 240 nm sob temperaturas de 10 a 90 °C, com incremento de 5 °C.

6.8 SAXS

Com o intuito de obtermos informações sobre a massa, a forma e o estado oligomérico da GtCel12A em solução, realizamos análises por meio da técnica de espalhamento de raios-X a baixo ângulo. A análise comparativa das curvas de espalhamento obtidas por SAXS revelou que os efeitos de concentração da amostra foram desprezíveis. Para a redução de um pequeno efeito de agregação, o valor de q_{\min} foi reduzido a $0,02 \text{ \AA}^{-1}$. A curva de SAXS para a GtCel12A é mostrada na figura 47. A análise de Guinier, no intervalo de $q^2 R_g \cdot q < 1,3$, mostrou uma estimativa do raio de giro de $19,9 \text{ \AA}$ para a enzima. Adicionalmente, a linearidade do gráfico de Guinier indicou que a amostra é monodispersa, constituída principalmente por espécies monoméricas.

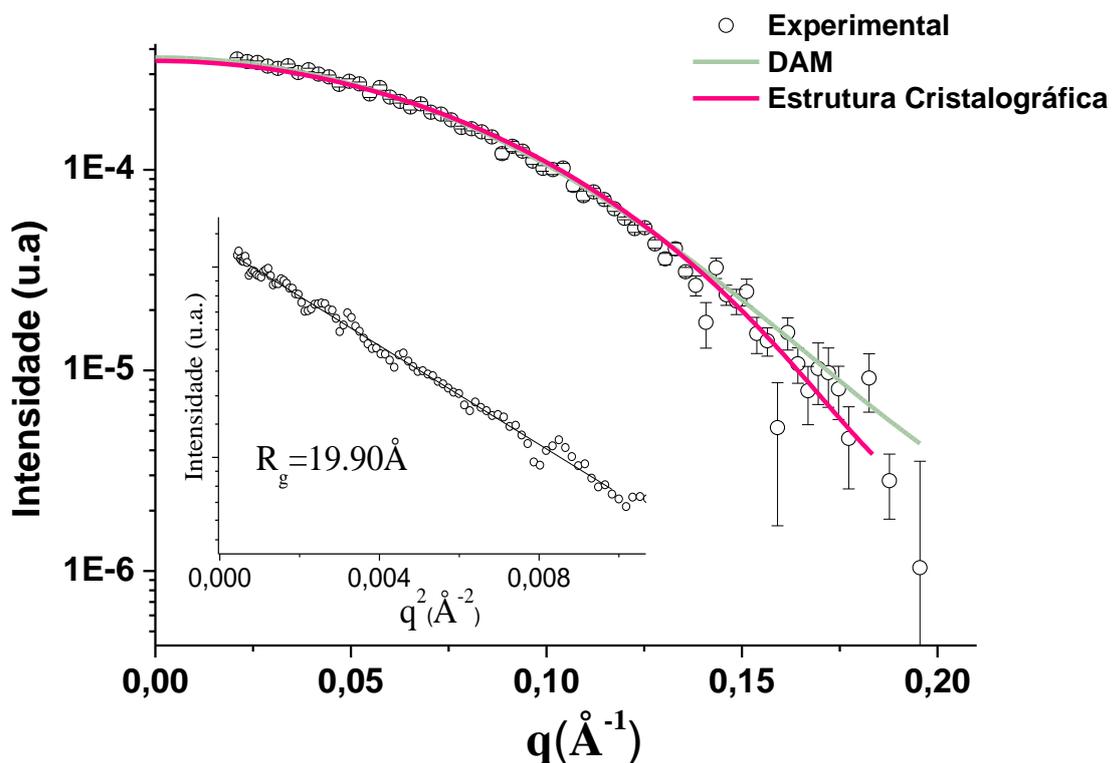


Figura 47 - Curvas de espalhamento experimental, do modelo de átomos *dummy* e predita para a estrutura cristalográfica da GtCel12A obtidas pela análise por SAXS. A curva de espalhamento experimental é representada por círculos e o ajuste da curva a partir de dados inferidos da estrutura cristalográfica da GtCel12A está representado em rosa. Já a obtida a partir do modelo de átomos *dummy* está em verde. Em detalhe, o perfil de Guinier utilizado para o cálculo do R_g .

A análise da $p(r)$ (figura 48) nos levou a concluir que a proteína tem uma forma ligeiramente alongada (figura 49), com um D_{\max} de $60 \pm 5 \text{ Å}$ (tabela 1). Adicionalmente, o valor de $19,4 \pm 0,1 \text{ Å}$ para o R_g , calculado a partir da $p(r)$ corrobora a estimativa derivada da análise de Guinier.

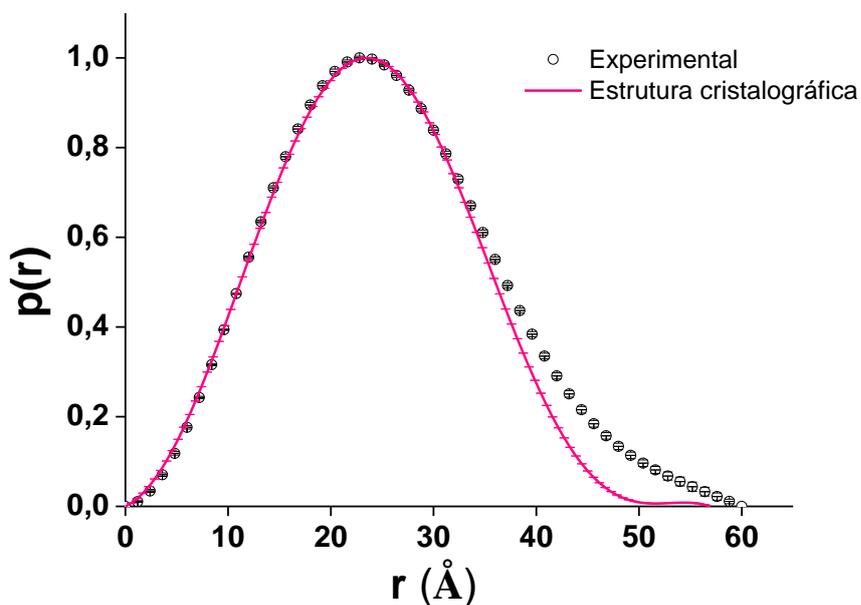


Figura 48 - Função de distribuição de distâncias computada a partir dos dados experimentais (preto) e estimada a partir da estrutura cristalográfica da GtCel12A (rosa), obtidas a partir da análise por SAXS.

Uma massa molecular de 28,3 kDa foi obtida a partir da metodologia implementada na ferramenta SAXS MoW. Este resultado está de acordo com a massa molecular do monômero da GtCel12A, obtido a partir da sequência primária (26,1 kDa), como teoricamente estimado.²²¹

O modelo *ab initio* de átomos *dummy* (DAM) para a GtCel12A foi obtido a partir dos dados de SAXS, utilizando-se o programa Gasbor. Dez modelos DAM independentes apresentaram um bom ajuste aos dados experimentais. A sobreposição do modelo escolhido baseado em parâmetros NSD²³⁹ com a estrutura cristalográfica obtida nos experimentos de difração de raios-X estão mostrados na figura 49.

Adicionalmente, os parâmetros estruturais obtidos a partir da curva experimental da estrutura cristalográfica, de átomos *dummy* e os parâmetros obtidos do ajuste da curva estão mostrados na tabela 1. Os valores obtidos a partir dos diferentes cálculos são similares.

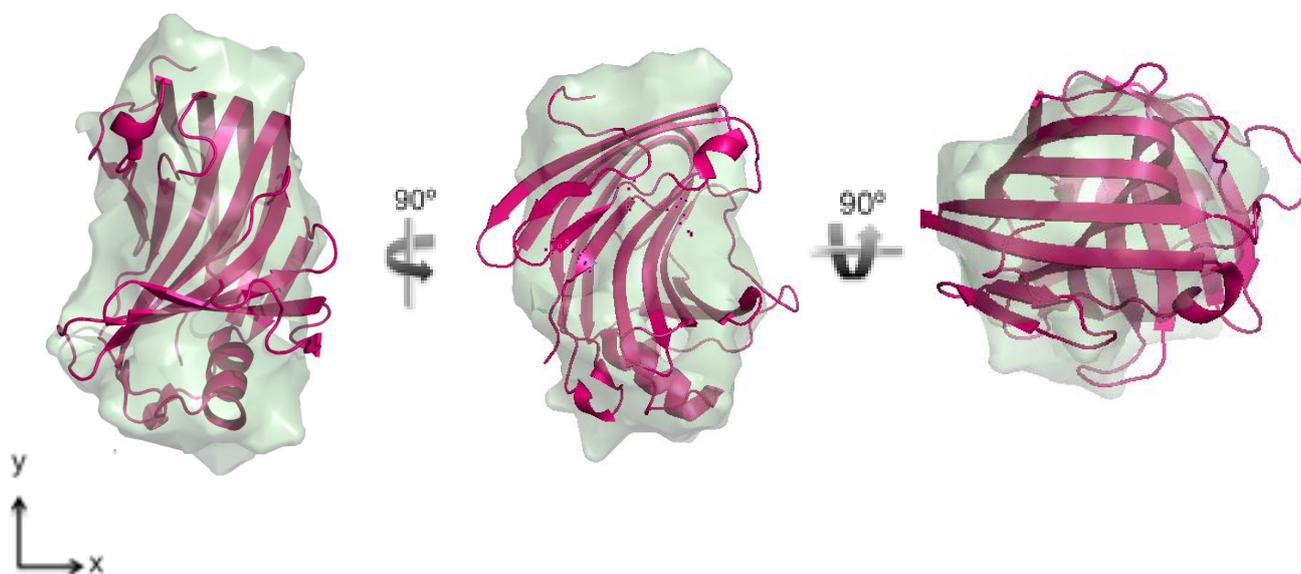


Figura 49 - Estrutura cristalográfica da GtCel12A (rosa) sobreposta ao modelo de superfície obtido a partir dos dados de SAXS (verde) mostrado em três diferentes orientações. Os modelos do centro e da direita estão rotacionados 90° nos eixos y e x respectivamente, a partir do modelo da esquerda.

Tabela 1 - Parâmetros estruturais da GtCel12A obtidos por SAXS.

	Experimental	Cristalográfico [§]	DAM [†]
R_g (Å)	19,4 ± 0,1	17,66	18,57
D_{max} (Å)	60,00	56,96	56,78
Resolução ^ε (Å)	32,14	1,85	32,14
SAXS MM (kDa)	28,30 (26,17)		-
χ		1,40	1,47

[†] DAM , parâmetros do modelo de átomos *dummy* calculado no programa *Gasbor*

[§] Estrutura de alta resolução obtida por difração de raios-x em monocristal

^ε Resolução: $2\pi/q_{máx}$

6.8.1 Estabilidade térmica avaliada por SAXS

O perfil de Kratky foi obtido a partir da curva de espalhamento experimental por SAXS. Representado na forma $[I(q)*q^2 \times q]$, este perfil naturalmente exibe um pico parabólico para pequenos valores de q , diretamente relacionado ao arranjo globular da enzima, como mostrado na figura 50. Na região de Porod (altos valores de q), as curvas

tendem a um comportamento ascendente com o aumento da temperatura. Isso se deve ao fato da flexibilidade da molécula aumentar, associada ao progresso da desnaturação.

O R_g e a massa molecular da GtCel12A foram mantidos inalterados até 55 °C. A partir desta temperatura, o pico parabólico se desloca para a esquerda, refletindo o aumento tanto do R_g quanto da massa molecular, seguido ainda de um abrupto ganho de flexibilidade a 65 °C. Em suma, o deslocamento do pico está relacionado a um arranjo molecular diferente do anterior, resultado do aumento da temperatura e da suscetibilidade estrutural da enzima.

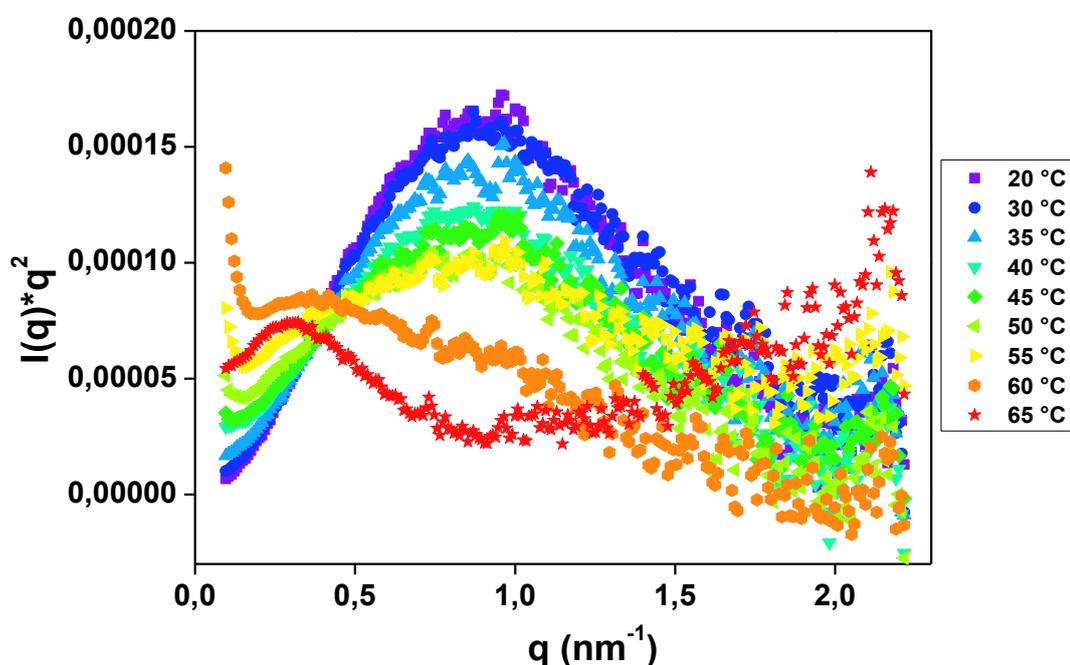


Figura 50 - Perfil de Kratky [$I(q) \cdot q^2 \times q$] para a GtCel12A incubada em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 3,0, com variação de temperatura de 20 °C a 65 °C. A presença de um pico parabólico para cada temperatura considerada representa a manutenção da globularidade da enzima. A diminuição do pico, sem ter sua posição na horizontal modificada, demonstra a perda do enovelamento terciário. Já a partir de 60 °C ocorre, além do abaixamento do pico, um deslocamento na posição do pico para a esquerda. Isso sugere a perda parcial da globularidade e alteração no arranjo entre as enzimas em solução, o que resultou no aumento da massa molecular do conjunto formado e agregação das moléculas.

Os resultados observados nessa seção corroboram os resultados de CD para a GtCel12A, no sentido de indicar a temperatura crítica na qual passamos a observar perturbações tanto na estrutura secundária, quanto terciária da enzima, sugerindo que, a partir

de 55 °C a estrutura da GtCel12A é desestabilizada e as moléculas passam a sofrer uma desnaturação induzida pela temperatura.

6.9 Cristalização

Após 72 horas foram observados cristais em trinta e duas condições testadas. Os cristais obtidos em três diferentes condições estão mostrados na figura 51. Adicionalmente, salientamos que o cristal em forma de placa obtido com a condição composta por ácido cítrico 0,1 M pH 5,0 e sulfato de amônio 0,8 M foi submetido à experimentos de difração de raios-X, na linha de luz MX-2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron.

A proteína foi cristalizada no grupo espacial $P2_1$.

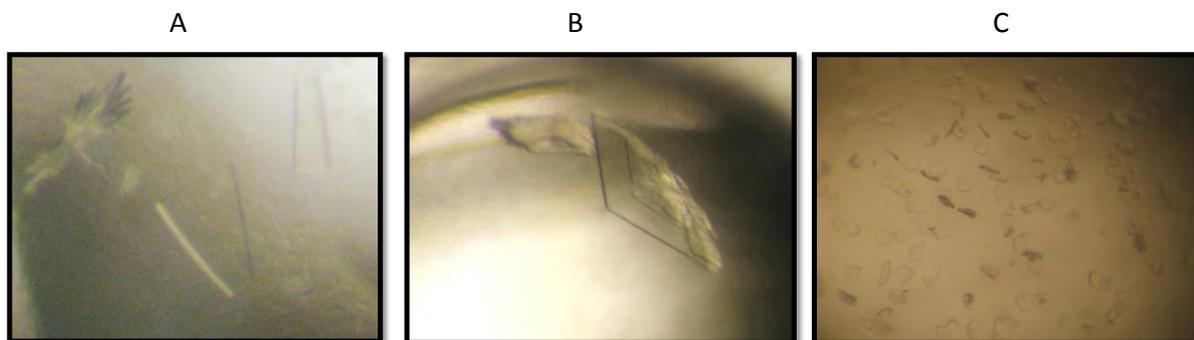


Figura 51 - Cristais obtidos nos ensaios de cristalização da GtCel12A. **A.** Cristais obtidos na condição composta por acetato de sódio 0,1 M, pH 4,6 e sulfato de amônio 1 M. **B.** Cristais obtidos na condição composta por acetato de sódio 0,1 M, pH 4,6 e PEG 3000 25% ($m v^{-1}$). **C.** Cristais obtidos na condição composta por ácido cítrico 0,1 M, pH 5,0 e sulfato de amônio 0,8 M.

6.10 Coleta e processamento dos dados de difração de raios-X

O cristal obtido na condição citada anteriormente foi submetido ao experimento de difração de raios-X, sob temperatura criogênica e apresentou os padrões de difração bem

definidos, aparentemente sem sobreposição de pontos (*overlaps*) conforme observado na figura 52.

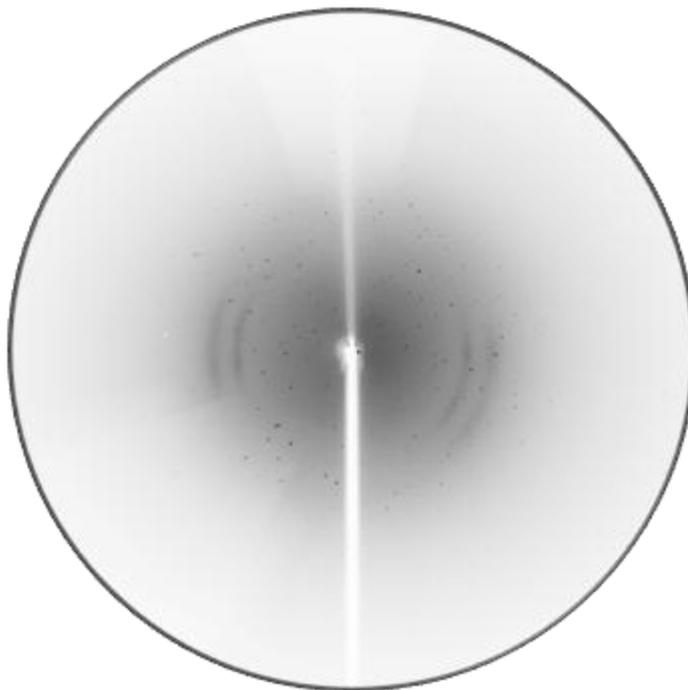


Figura 52 - Padrão de difração obtido a partir do experimento de cristalografia de raios-X para a enzima GtCel12A.

A autoindexação das primeiras imagens e as estratégias de coleta foram realizadas no programa iMOSFLM²¹², onde o ângulo de rotação estimado que não gerava *overlaps* foi de 0,5°. Além disso, a estratégia realizada indicou o número de imagens a ser coletado que nos renderia completeza suficiente, de acordo com o grupo espacial apresentado pelo cristal, especificado na Tabela 2. Os valores aproximados dos parâmetros de célula (a , b , c , α , β e γ) também foram estimados (Tabela 2).

A integração das imagens de difração e o refinamento dos parâmetros foram conduzidos pelo programa XDS²¹³ e o escalonamento dos dados realizados com o programa Scala.²¹⁴ Os parâmetros e as estatísticas desse conjunto também se encontram na tabela a seguir.

Tabela 2 - Parâmetros e estatísticas da coleta e processamento dos dados cristalográficos da enzima GtCel12A.

Parâmetros	GtCel12A
Grupo espacial	P2 ₁
Parâmetros da célula unitária	
a (Å)	55,40
b (Å)	52,37
c (Å)	74,04
Ângulo (°)	β = 110,61
Intervalo de resolução (Å)	41,66 - 1,85 (1,95 - 1,85)
Número de imagens	360
Δφ (°)	0,50
Número de reflexões	117556 (15347)
Multiplicidade	3,5 (3,2)
Completeza (%)	99,5 (98,0)
R_{merge} †	0,038 (0,469)
⟨I⟩/⟨σ(I)⟩	11,1 (3,0)

† $R_{merge} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$, onde $I_i(hkl)$ é a intensidade observada para $I(hkl)$ e $\langle I(hkl) \rangle$ é a média das intensidades. Entre parênteses os valores referentes à camada mais externa de resolução.

O número de moléculas presentes na unidade assimétrica e o conteúdo de solvente foram estimados utilizando-se o programa Matthews_coeff²¹⁴, considerando a massa molecular da proteína como sendo de 26 kDa. Essa análise permitiu a estimativa da presença de duas moléculas na unidade assimétrica com 36% de solvente, sendo o coeficiente de Matthews de 1,92.

6.10.1 Obtenção das fases e refinamento das estruturas cristalográficas

O processo de faseamento do conjunto experimental de dados foi realizado por meio do método de substituição molecular, utilizando o programa PHASER²¹⁴ disponível no pacote de programas cristalográficos CCP4.²¹⁴ O modelo empregado para a resolução da nossa estrutura foi a estrutura de uma endo-β-1,4-glucanase específica de xiloglucano²¹⁸, depositado no PDB sob o código 3VL8 e que possui 45% de identidade com o alvo trabalhado.

Posteriormente à obtenção de um modelo inicial, partimos para o processo de refinamento desse modelo com o programa Phenix.²¹⁶ Vários ciclos de refinamento no espaço real (modificações manuais do modelo, por meio da inspeção dos mapas de densidade eletrônica usando o programa gráfico Coot²¹⁹) foram realizados. Nesse conjunto de dados, os

ciclos de refinamento no espaço real foram alternados com cálculos intermediários no espaço recíproco para o refinamento de posições atômicas, de restrições geométricas e de contato, do refinamento do fator de temperatura individual para todos os átomos, além da minimização de funções de energia. O monitoramento da concordância do modelo com os dados experimentais foi conduzido através da análise da variação do parâmetro R_{factor} , juntamente com o parâmetro R_{free} . As moléculas de água foram introduzidas somente ao final do refinamento, com o auxílio dos programas Coot²¹⁹ e Phenix.²¹⁶

Quando não era mais possível melhorar os índices R_{factor} e R_{free} , finalizamos o processo de refinamento e os parâmetros e estatísticas resultantes deste processo estão descritos na Tabela 3. O programa MOLPROBIT²²⁰ foi utilizado para a validação do modelo, cujos diagramas construídos demonstraram a qualidade do modelo final da estrutura.

Todos os resíduos do modelo estão localizados em regiões permitidas do diagrama de Ramachandran²⁴⁰, com 98% dos resíduos nas regiões mais favoráveis.

Tabela 3 - Parâmetros e estatísticas resultantes do processo de refinamento dos dados cristalográficos da enzima GtCel12A.

Refinamento	
Intervalo de resolução	41,66 – 1,85
R_{factor}^{\dagger} (%)	18,66
R_{free}^{\dagger} (%)	22,33
R.m.s.d do ideal	
Distância das ligações (Å)	0,007
Ângulo das ligações (°)	1,208

$\dagger R_{factor}/ R_{free} = \sum_{hkl} |F_{obs} - F_{calc}| / \sum_{hkl} |F_{obs}|$ onde F_{obs} e F_{calc} são os fatores de estrutura observados e calculados; 5% das reflexões foram incluídas nos testes de ajuste para o cálculo do R_{free} .

O modelo final consiste de duas cadeias polipeptídicas da proteína GtCel12A, contendo os resíduos 29 a 246 cada, 441 moléculas de água, 15 moléculas de etileno glicol e 2 moléculas de sulfato (Figura 53).

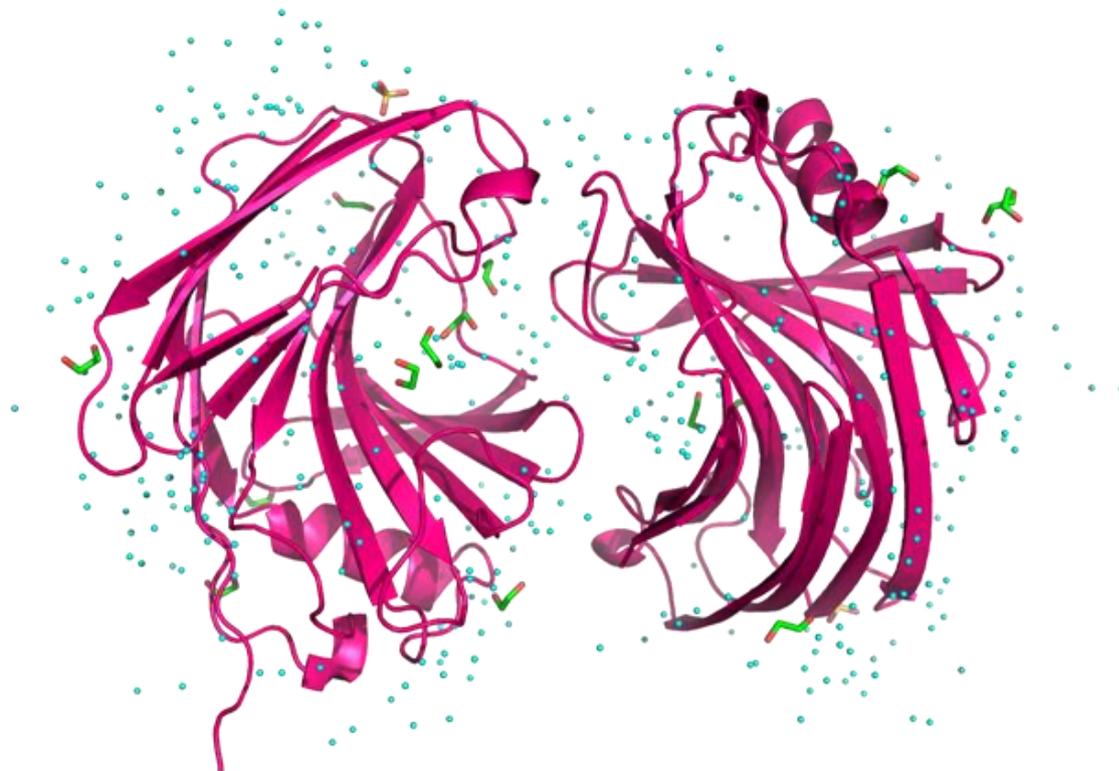


Figura 53 - Conteúdo da unidade assimétrica modelado para os dados cristalográficos da GtCel12A. As moléculas correspondentes à proteína estão representadas em magenta, as moléculas de água em ciano, as de etileno glicol em verde e as de sulfato em amarelo.

6.11 Análise do modelo cristalográfico e a relação estrutura-função da GtCel12A

O modelo cristalográfico obtido para a GtCel12A apresentou um enovelamento característico para essa família de proteínas, sendo formado principalmente por duas folhas β , A e B, compostas por cinco e nove fitas cada e por três pequenas hélices α .

Essa estrutura do tipo sanduíche β possui uma curvatura para criar um extenso sítio de ligação ao substrato na face côncava da folha B, com aproximadamente 35 Å de comprimento. A folha convexa A, possui cinco fitas antiparalelas, denominadas A2, A3, A4, A5 e A6 e a folha côncava B, possui nove fitas denominadas B1 a B9 e é majoritariamente antiparalela, exceto pelas fitas B6 e B7 que são paralelas entre si (figura 54). Adicionalmente, a enzima possui um único domínio, o catalítico, que realiza tanto a função de ligação ao substrato, como de clivagem das ligações glicosídicas, não possuindo, portanto, um domínio de ligação à celulose.

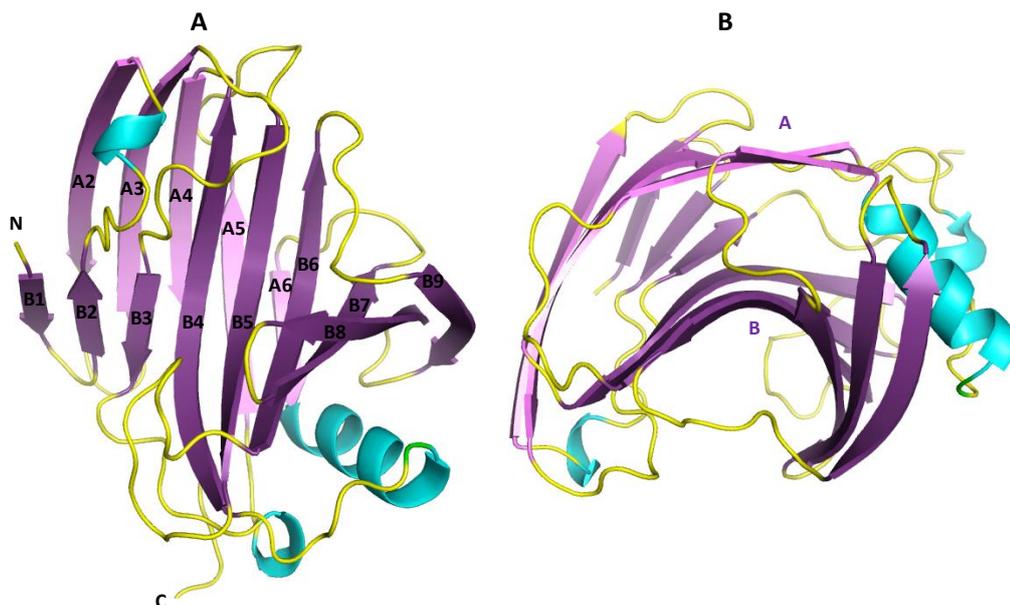


Figura 54 - Representação esquemática da estrutura cristalográfica da GtCel12A. **A.** As duas folhas β são denominadas A e B e as fitas individuais que as formam estão numeradas (A2 a A6 e B1 a B9), de acordo com a posição em cada uma das folhas. **B.** Nessa imagem, percebe-se claramente a posição da folha A, externa e B, interna, sendo que esta última se curva para formar o sítio catalítico característico.

O número de fitas em cada folha varia dentre as estruturas reportadas para a família GH12, mas a disposição mais comumente encontrada é a de seis fitas na folha A e nove na B.^{153-156, 232, 241-243} Em nossa estrutura observamos apenas cinco fitas na folha A. A primeira fita, que seria denominada A1, não aparece em nosso modelo cristalográfico, pois como a mesma se localiza próximo à região N-terminal da proteína, e esta é uma região bastante móvel, não observamos densidade eletrônica nessa região, sendo somente possível modelar os resíduos a partir da posição 29 da sequência de aminoácidos.

A face côncava da folha B forma uma fenda, que constitui o sítio catalítico (figura 55), que também é o sítio de ligação ao substrato. Tal morfologia se adequa a um dos três tipos de sítios ativos encontrados nas hidrolases de glicosídeos.²⁴⁴

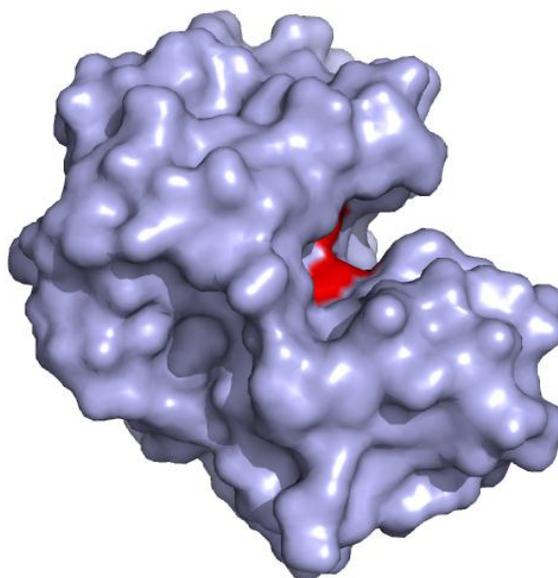


Figura 55 - Modelo de superfície para a GtCel12A. O sítio catalítico da GtCel12A apresenta o formato de fenda, típico de algumas hidrolases de glicosídeos. Os resíduos catalíticos Glu142 e Glu227 do sítio catalítico estão destacados em vermelho.

Por meio de comparação da sequência de aminoácidos e de estruturas de outras enzimas da família GH12, dois resíduos catalíticos bastante conservados em outras estruturas de GH12 de diferentes organismos foram identificados na fenda catalítica. Esses resíduos são os ácidos glutâmicos, Glu142 (fita β B6) e Glu227 (fita β B4), que são separados por uma distância de, aproximadamente, 5,0 Å (figura 56A), que é a distância usual de um par nucleófilo/catalisador ácido/básico envolvido em um mecanismo de duplo-deslocamento, típico das hidrolases de glicosídeos da família 12.¹²⁸ Nesse mecanismo, dois resíduos contendo grupos carboxilato estão envolvidos, sendo que um atua como nucleófilo para atacar o centro anomérico, e outro atua como resíduo ácido/básico para protonar o oxigênio glicosídico durante a primeira etapa do mecanismo e desprotonar uma molécula de água durante a segunda etapa.²²⁵

Em nossa estrutura esses dois resíduos estão envoltos principalmente por resíduos hidrofóbicos, porém, participam de ligações de hidrogênios com dois resíduos de ácido aspártico localizados na fita β B5. O Asp123 apresenta a ligação de hidrogênio com o Glu142 e o Asp119 com o Glu227 (Figura 56B).

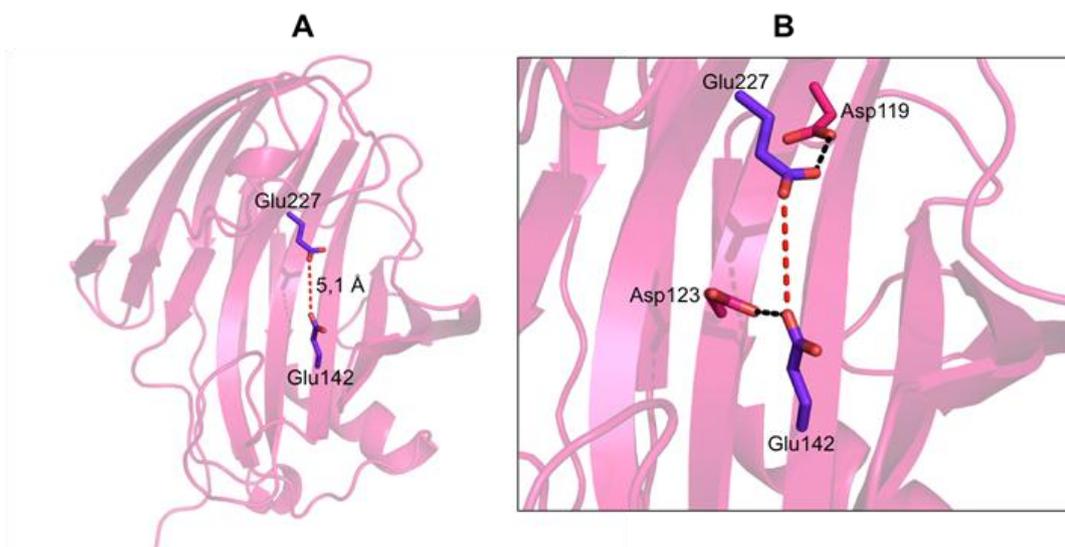


Figura 56 - Localização dos resíduos catalíticos da enzima GtCel12A. **A.** Em destaque, os resíduos catalíticos Glu142 e Glu227, separados por uma distância aproximada de 5,0 Å. **B.** Em destaque também, os resíduos Asp119 e Asp123, responsáveis pela formação de ligações de hidrogênio com esses resíduos catalíticos. A linha pontilhada vermelha representa as ligações de hidrogênio.

Resíduos de ácidos aspárticos como auxiliares dos ácidos glutâmicos catalíticos são bastante conservados dentre as hidrolases de glicosídeos da família 12. Uma disposição bastante comum é a do resíduo de ácido aspártico (Asp) na posição 99, que comumente interage com um ou ambos os resíduos catalíticos, por meio de ligação de hidrogênio. Esse resíduo de ácido aspártico é comumente reportado como sendo o terceiro membro do “trio catalítico”, juntamente com os dois resíduos de ácidos glutâmicos bastante conservados.¹⁵³ Na Cel12A de *Trichoderma reesei*, por exemplo, o Asp99 interage com o Glu116 por meio de uma ligação de hidrogênio.¹⁵³ Em outro estudo, na estrutura de uma endoglucanase (EglA) de *A. niger*, o Asp99 interage por meio de ligação de hidrogênio com o nucleófilo Glu120 e, acredita-se que esse resíduo auxilie na manutenção, tanto de uma carga apropriada no nucleófilo durante o ciclo catalítico, como na orientação do Glu116 para favorecer o ataque nucleofílico. Outro resíduo de ácido aspártico está presente nesse caso, o Asp95 que interage com o catalisador ácido/básico Glu204. Esse resíduo em algumas enzimas da família GH12 é substituído por um resíduo de asparagina.¹⁵⁶

Na endoglucanase Cel12A de *Rhodothermus marinus*, por exemplo, uma asparagina está presente (Asn102) e estabelece essa ligação de hidrogênio com o Glu207 (catalisador ácido/básico), enquanto o nucleófilo Glu124 interage com um resíduo de ácido aspártico (Asp106) e também com um resíduo de triptofano (Trp161).¹⁵⁵

Na endoglucanase EG3 de *Trichoderma harzianum*, um ácido aspártico na posição 100 (Asp100) também atua como um resíduo auxiliar dos ácidos glutâmicos Glu117 e Glu201 no sítio catalítico, formando um trio catalítico. Nesse caso, o resíduo Asp100 estabelece ligações de hidrogênio com a cadeia lateral do Glu117 (nucleófilo) e outra ligação de hidrogênio também é observada entre o Glu201 (catalisador ácido) e o resíduo vizinho, o Glu96.²⁴³ A substituição de um ácido aspártico por um ácido glutâmico também é comumente encontrada em outras endoglucanases da família GH12.¹⁵⁴

Em outro caso, o da endoglucanase (CelB2) de *Streptomyces lividans*, os dois ácidos glutâmicos catalíticos (Glu 120 e Glu203) estão ladeados em um dos lados pelo resíduo Asp104, que estabelece ligações de hidrogênio com ambos os ácidos glutâmicos catalíticos. É interessante ressaltar que nas enzimas da família GH11, que compõe o clã GH-C juntamente com as GH12, não é encontrado esse ácido aspártico e sim uma tirosina bastante conservada.

154

Os dois únicos resíduos de cisteína presentes na nossa enzima, o Cys30 e o Cys39, formam uma ponte dissulfeto que conecta as fitas B1 e B2, próximo à região N-terminal da proteína, conforme mostrado na figura 57A. Tal característica não é usual, visto que nas demais estruturas reportadas, a ponte dissulfeto normalmente conecta as fitas A1 e A2 ou um *loop* na região N-terminal com a fita A2 (figura 57B).^{153, 156, 232, 243} Em alguns casos, foram reportadas duas pontes dissulfeto, uma conectando as fitas A1 e A2 e outra conectando duas pequenas fitas chamadas C1 e C2 em posição mais externa às folhas A e B¹⁵⁴⁻¹⁵⁵. Há também casos de inexistência de pontes dissulfeto em estruturas de enzimas da família GH12, todos os casos em organismos procariotos.^{225, 241-242}

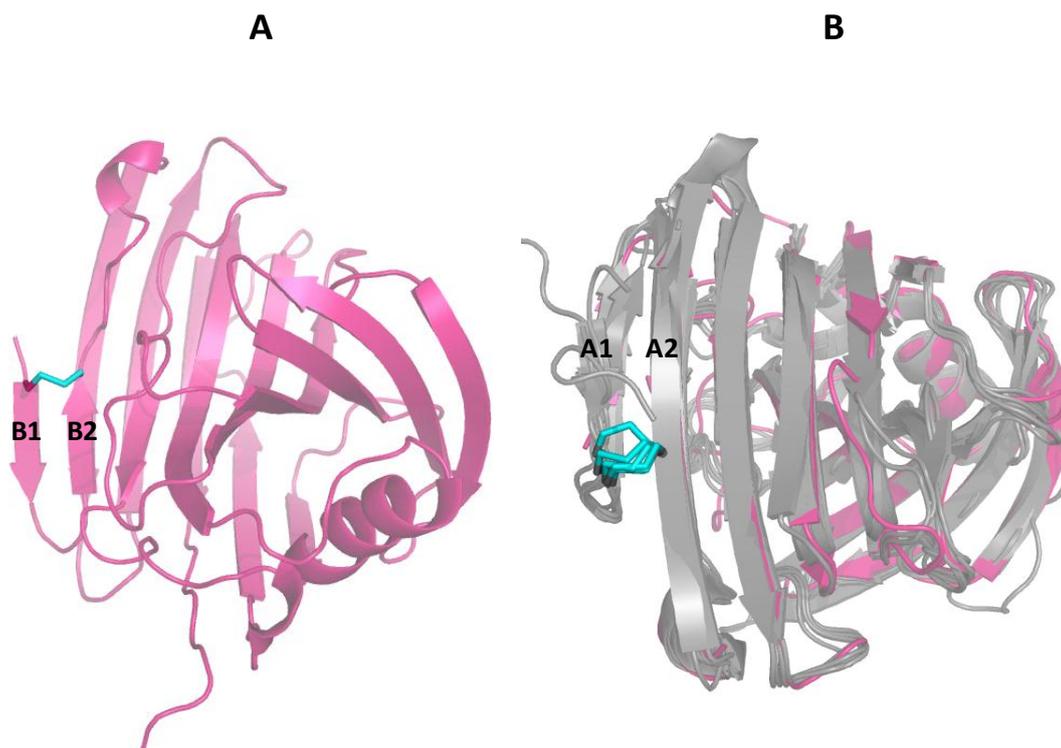


Figura 57 - Localização da ponte dissulfeto em estruturas homólogas de enzimas da família GH12. **A.** Estrutura da GtCel12A com a ponte dissulfeto (ciano) incomum, que conecta as fitas B1 e B2, da folha que se curva (B) para a formação da fenda catalítica. **B.** Sobreposição das estruturas homólogas (códigos PDB: 3VL8, 1KS5, 1OLR, 1OA3, 4HTM e 1H8V) com a GtCel12A, com destaque para as pontes dissulfeto (ciano) que normalmente conectam as fitas A1 e A2 ou um *loop* na região N-terminal com a fita A2 nas demais enzimas.

Pontes dissulfeto em enzimas do clã GH-C, que compreende as famílias GH12 e 11, ao que parece, estão envolvidas na estabilização local das estruturas e não são necessárias para o enovelamento global da proteína, pois estão localizadas em diferentes posições ou inexistem nas diferentes enzimas reportadas.¹⁵³ Nos casos em que a ponte dissulfeto se localiza na região N-terminal, a mesma está associada à estabilização desta região.¹⁵³ Isso não acontece com a nossa estrutura, já que a ponte tem outra localização, o que reforça a hipótese dessa região N-terminal ser bastante móvel em nossa estrutura e, portanto, ausente no modelo cristalográfico. Adicionalmente, a localização peculiar da ponte dissulfeto na estrutura da GtCel12A, unindo fitas da folha interna (B), que se dobra para formar o sítio catalítico, sugere que essa ponte pode atuar na estabilização do sítio catalítico e, então, facilitar a acomodação do substrato nessa região.

Concomitantemente, essa ponte dissulfeto peculiar poderia estar relacionada à alta termoestabilidade observada para a GtCel12A, conforme demonstrado em alguns dos nossos

ensaios, sendo que no ensaio de atividade residual, por exemplo, a enzima reteve cerca de 60% de sua atividade inicial, mesmo após 72 horas de incubação a 50 °C. Apesar desta hipótese, sabe-se que não existe uma única característica que é responsável pela estabilização em cada família²⁴⁵⁻²⁴⁶ e um fator determinante para a alta termoestabilidade de enzimas é a grande quantidade de interações eletrostáticas.²⁴⁷ Apesar do enovelamento ser dirigido por interações hidrofóbicas, as interações eletrostáticas, como meio de estabilizar o “estado enovelado”, se tornam cada vez mais favoráveis, principalmente em altas temperaturas. Outros fatores incluem a composição de aminoácidos, que tem relação com o aumento da rigidez em altas temperaturas, por exemplo, um grande número de resíduos de prolina ou uma diminuição no conteúdo de glicinas. Adicionalmente, resíduos que se degradam em altas temperaturas, como Asn, Gln e Cys são menos abundantes em enzimas termofílicas, por exemplo.²⁴⁶⁻²⁴⁸

Um longo *loop* superficial, conhecido como “cordão”, conecta as fitas B6 e B9 em nossa estrutura. Essa característica é conservada na família GH12 e também entre as xilanases da família GH11. O cordão, no nosso caso, possui 10 resíduos de aminoácidos e se estende do resíduo Gly149 a Ser158 (figura 58A) e possui quatro resíduos de glicina em sua composição, o que sugere alta flexibilidade e mobilidade desse cordão, podendo favorecer as mudanças conformacionais requeridas para a acomodação do substrato. Adicionalmente, esse *loop* pode sofrer mudanças conformacionais após a ligação do substrato, conferindo uma flexibilidade conformacional que parcialmente fecha um dos lados da fenda catalítica (figura 58B).²⁴⁹ No nosso caso, essa característica também pode estar associada ao comportamento promíscuo da GtCel12A em relação à atividade, a qual não se limitou apenas a substratos celulósicos.

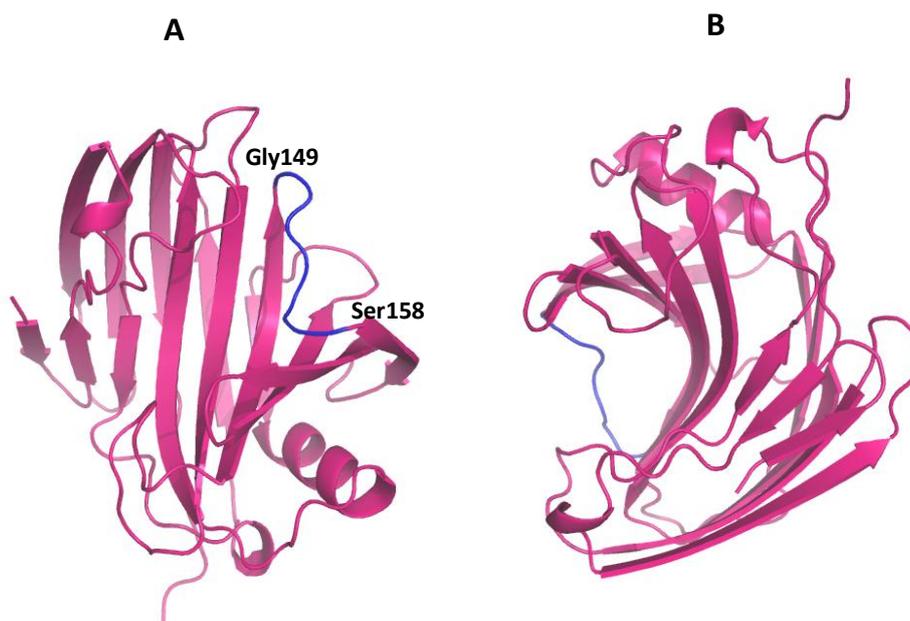


Figura 58 - Estrutura cristalográfica da GtCel12A, com destaque para o *loop* que une as fitas B6 e B9. **A.** O “cordão”, como é chamado, possui 10 resíduos de aminoácidos e se estende do resíduo Gly149 da fita B6 à Ser158 da fita B9 (azul). **B.** A posição do cordão faz com que ele feche parcialmente uma das extremidades da fenda catalítica.

Outra consideração interessante é que, apesar da proteína ter sido produzida em um sistema de expressão de fungo filamentosos, não observamos nenhuma glicosilação na estrutura da GtCel12A.

Outras estruturas de enzimas da família GH12 oriundas de diversos organismos foram reportadas, sendo que as disponíveis atualmente são de *Bacillus licheniformis*, *Rhodotermus marinus*, *Thermotoga maritima*, *Streptomyces sp*, *Aspergillus niger*, *Humicola grisea*, *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*), *Hypocrea schweinitzii*, *Trichoderma harzianum*, *Pyrococcus furiosus* e *Aspergillus aculeatus*.¹⁴⁴ Todas possuem um enovelamento proteico do tipo sanduíche β , mas com variações, principalmente nos *loops* que conectam as duas folhas β na estrutura. Tal característica pode influenciar a especificidade por substratos e a eficiência catalítica das enzimas, o que pode resultar em diferentes eficiências de clivagem, apesar do mecanismo catalítico em comum.²⁴²

Por meio de um alinhamento com estruturas de proteínas pertencentes à família GH12 de eucariotos, depositadas no PDB (códigos PDB: 3VL8, 1KS5, 1OLR, 1OA3, 4H7M e 1H8V), observamos que o enovelamento é bastante conservado (figura 59).



Figura 59 - Alinhamento do modelo estrutural da proteína GtCel12A com estruturas depositadas no PDB que possuem maior identidade sequencial com a mesma. Os códigos PDB utilizados nesse alinhamento foram: 3VL8, 1KS5, 1OLR, 1OA3, 4H7M e 1H8V.

Em contrapartida, o alinhamento da sequência de aminoácidos das mesmas proteínas, (todas com no máximo 45% de identidade e cobertura inferior a 90%) revelou uma baixa identidade sequencial (figura 60). Adicionalmente, observamos que os resíduos de ácidos glutâmicos catalíticos (E) são bastante conservados, enquanto os demais resíduos aromáticos envolvidos na estabilização do substrato diferem entre as sequências. A localização da ponte dissulfeto também é conservada entre as demais sequências, exceto para a GtCel12A, que possui em uma posição distinta, conforme discutido anteriormente. O *loop* que conecta as fitas B6 e B9 também é conservado, porém apresenta ligeiras diferenças na composição de aminoácidos, que podem estar associadas à maior ou menor flexibilidade do mesmo, com efeito no mecanismo de acomodação do substrato, conforme discutido anteriormente.

a um substrato (código PDB 1UU5), que algumas moléculas de etileno glicol presentes na estrutura da GtCel12A se sobrepõem ao substrato (figura 61). Tal região possui vários resíduos hidrofílicos, incluindo os resíduos catalíticos, justamente para alojar as moléculas de glicosídeos, o que sugere que essa região seja, portanto, capaz de estabilizar várias moléculas de etileno glicol.

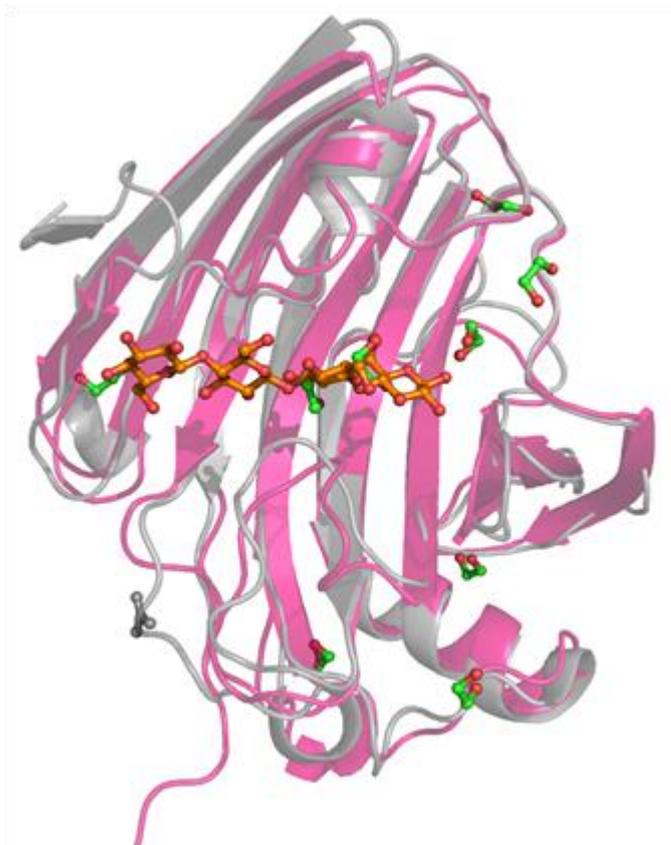


Figura 61 - Alinhamento das estruturas da GtCel12A e de uma GH12 de *H. grisea* (código PDB 1UU5) evidenciando que as moléculas de etileno glicol (verde) da estrutura da GtCel12A se sobrepõem ao substrato (laranja) da GH12 de *H. grisea*.

Além dos resíduos catalíticos Glu142 e Glu227 (figura 62A), outros resíduos também se mostram importantes para a interação com os substratos e são resíduos aromáticos. As regiões para esses resíduos em nosso modelo deveriam ser a posição 28, que de fato é ocupada por uma tirosina em nossa estrutura (no modelo cristalográfico está ausente devido à falta de densidade eletrônica, mas presente no alinhamento sequencial), e também em todas as outras de eucarioto analisadas (em alguns casos essa Tyr era substituída por um Trp, porém, mantendo as características e função dos resíduos nessa posição); a posição 43, designada por

um triptofano e presente em todas as estruturas, incluindo a de GtCel12A; e a posição 137 (Figura 62B), que na maioria das estruturas apresenta uma Tyr. Em contrapartida, na GtCel12A encontramos uma serina, que faz parte de um *loop* formado basicamente por resíduos de serina.

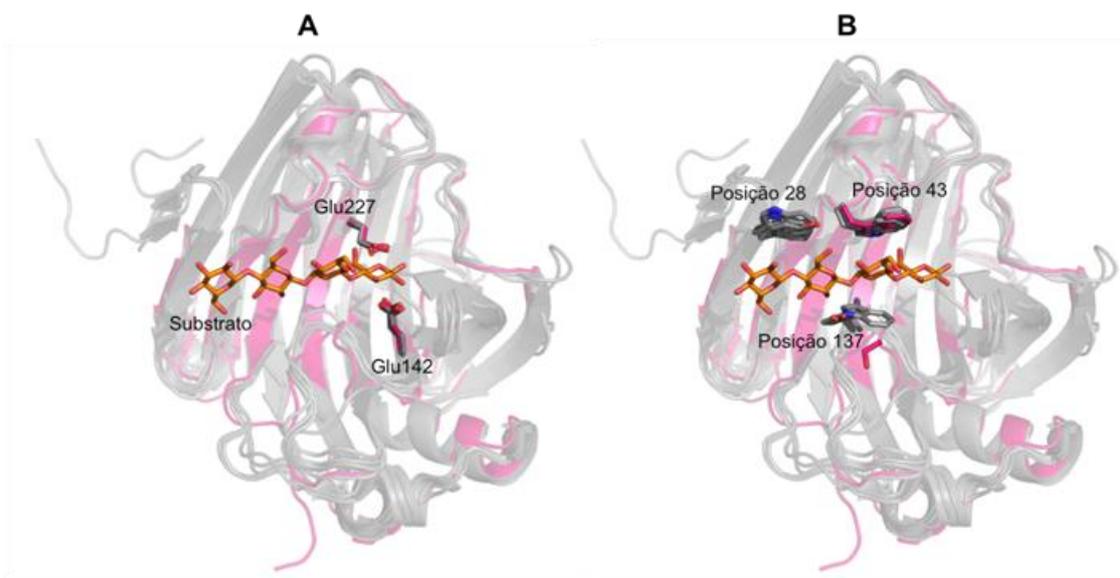


Figura 62 - Alinhamento da estrutura da GtCel12A com outras estruturas homólogas de organismos eucariotos (códigos PDB: 3VL8, 1KS5, 1OLR, 1OA3, 4H7M e 1H8V), evidenciando a posição dos resíduos catalíticos. **A.** Na estrutura da enzima GtCel12A os resíduos catalíticos em destaque são o Glu142 e Glu227. **B.** A possível posição dos demais resíduos importantes para a interação com o substrato nas posições 28, 43 e 137 da estrutura da GtCel12A.

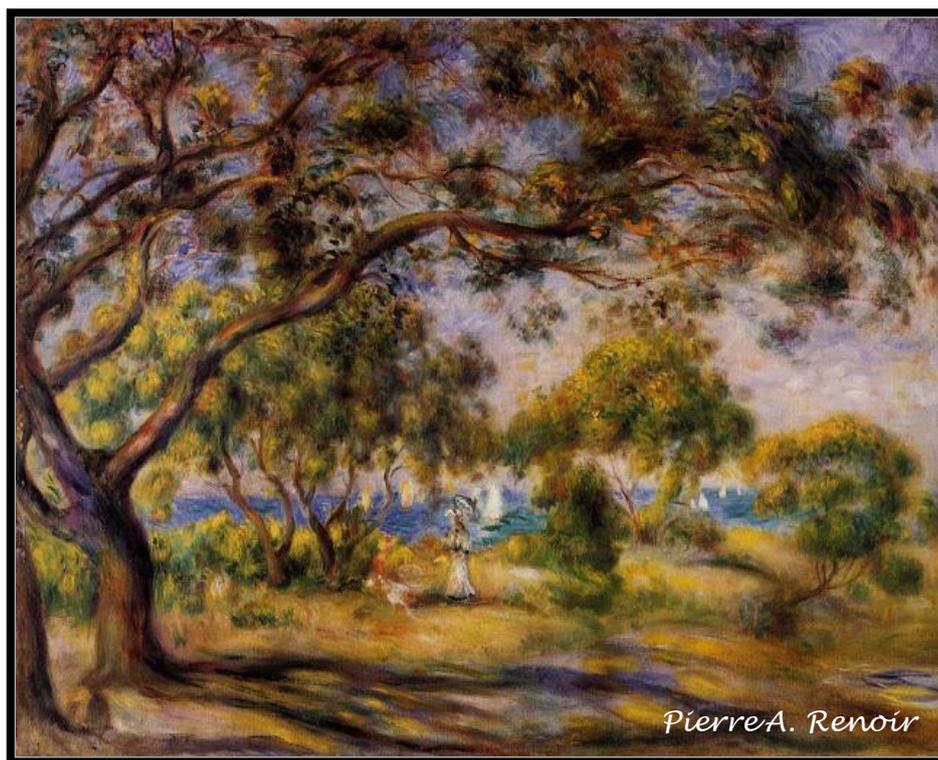
As enzimas comumente empregam resíduos aromáticos para a interação com carboidratos em uma vasta gama de funções biológicas.^{153, 250} Os sítios de ligação a açúcares nas hidrolases de glicosídeos normalmente exibem túneis, fendas ou bolsões frequentemente formados por superfícies expostas de cadeias laterais de resíduos aromáticos para o processamento de carboidratos.¹⁵³ Um modo típico de interação seletiva entre proteínas e carboidratos é realizado com a participação dos resíduos aromáticos triptofano, tirosina e fenilalanina.²⁵⁰ Tais resíduos delineiam os túneis e fendas para a ligação, o processamento e a estabilização de moléculas de carboidratos. Adicionalmente, em enzimas que apresentam CBMs, os resíduos aromáticos são comumente encontrados nas faces de ligação aos mesmos, formando interações eletrostáticas e hidrofóbicas com esses açúcares.²⁵¹⁻²⁵² Na Cel12A de *T.reesei*, por exemplo, a fenda catalítica possui dois anéis de triptofano completamente

expostos, bem como um par de tirosinas também expostas. Três outras cadeias laterais de resíduos aromáticos apresentam as bordas do anel expostas na fenda. Adicionalmente, a borda superior de um dos lados da fenda catalítica possui uma tira hidrofóbica claramente definida, formada pelas cadeias laterais dos resíduos Trp7, Trp22, Val57 e Phe202. O anel da tirosina 111 está localizado na borda oposta da fenda, na mesma altura que a tira hidrofóbica.¹⁵³

Em outra Cel12A, a de *Thermotoga marítima*, a fenda catalítica está repleta de cadeias laterais de triptofanos e tirosinas (Trp26, 75, 118, 138, 176, 178 e Tyr61, 65 e 180), que também interagem com as moléculas de substrato.²⁴² Nesse âmbito, foi reportado que existem mais resíduos aromáticos no sítio catalítico de enzimas bacterianas do que fúngicas, sendo que as primeiras normalmente exibem de quatro a oito triptofanos e as segundas de dois a três.²⁴²

Por fim, a estrutura cristalográfica da GtCel12A nos permitiu observar importantes características estruturais para essa enzima e compará-las com outras enzimas da mesma família, além de nos permitir relacionar tais características com as propriedades funcionais da mesma, o que é de grande valia para a compreensão dos mecanismos moleculares de atuação dessa enzima.

Conclusões e perspectivas



*“Toda nossa ciência, comparada
como a realidade é primitiva e
infantil, no entanto, é a coisa mais
preciosa que temos”*

Albert Einstein



7 Conclusões e perspectivas

O presente trabalho determinou as características bioquímicas, biofísicas e estruturais da endoglucanase Cel12A do fungo *G. trabeum*, cujos resultados, em conjunto, contribuíram para melhor elucidar as propriedades funcionais dessa enzima. Adicionalmente, nossos resultados, ao serem comparados com os disponíveis na literatura, para enzimas homólogas, nos permitiu identificar algumas semelhanças e diferenças. Dentre as semelhanças, podemos citar, por exemplo, a diversidade de atividade dessa enzima, que não se limitou a substratos celulósicos, apresentando, portanto, atividades em outros substratos. Dentre esses, destacamos os que possuem ligações mistas, como β -1,3 e β -1,4, como o liquenano e o β -glucano, por exemplo, sendo que este último demonstrou-se ser o melhor substrato para a atividade da enzima, cuja atividade específica foi de $239,2 \pm 9,1 \text{ U mg}^{-1}$. Outros resultados importantes referem-se à determinação das condições ótimas para a atividade da enzima (pH 4,5 e temperatura de $50 \text{ }^\circ\text{C}$), sendo que o melhor pH para a estabilidade térmica da GtCel12A foi 3 (T_m de $60,3 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$), conforme evidenciado pelos ensaios de Thermofluor. Ensaio de cinética enzimática utilizando β -glucano como substrato permitiram a determinação dos parâmetros cinéticos, sendo que o K_m e o V_{max} para a enzima foram $3,2 \pm 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,40 \pm 0,02 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1}$, respectivamente. A enzima apresentou alta termoestabilidade, com uma meia-vida de $84,6 \pm 3,6$ horas a $50 \text{ }^\circ\text{C}$. A análise por microscopia eletrônica de varredura permitiu a observação dos efeitos da atividade hidrolítica da GtCel12A em amostras de flocos de aveia e papel de filtro. Tais resultados revelaram que a enzima degrada de maneira eficiente ambos os substratos. Os resultados de dicróismo circular são típicos de proteínas formadas majoritariamente por folhas β e os dados de SAXS revelaram um comportamento monomérico da proteína em solução, uma forma ligeiramente alongada, com um D_{max} de $60 \pm 5 \text{ \AA}$ e um R_g de $19,4 \pm 0,1 \text{ \AA}$. A massa molecular estimada pelo programa SAXS MoW foi de 28,3 kDa, consistente com a massa molecular teórica de 26 kDa estimada a partir da sequência de aminoácidos da proteína.

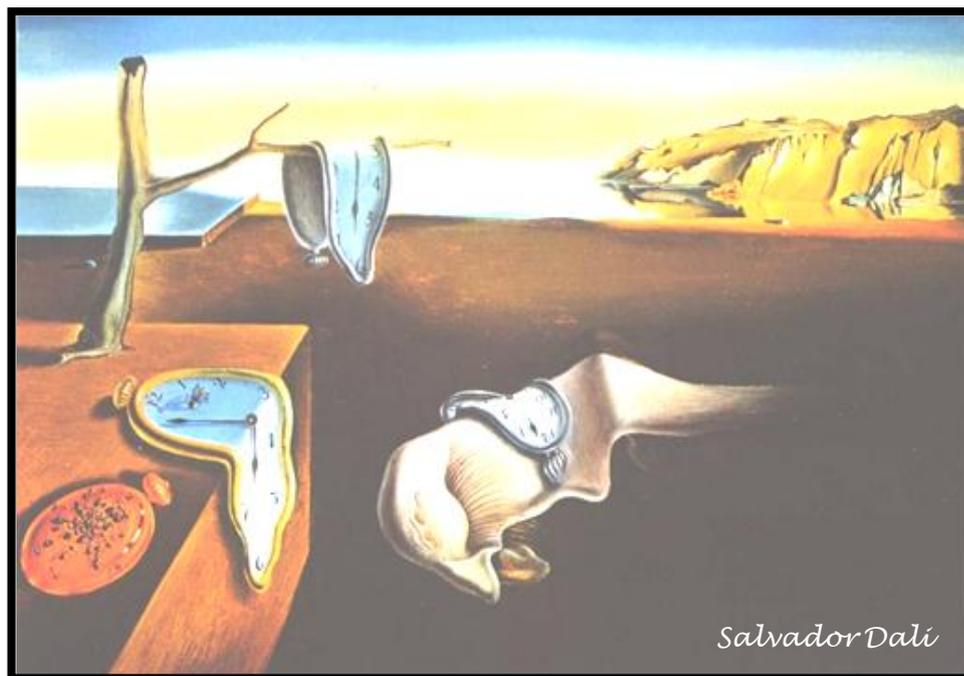
A estrutura cristalográfica da GtCel12A confirmou que o enovelamento do tipo sanduíche de folhas β é bastante conservado dentre as hidrolases de glicosídeos da família 12, o que não acontece com a sequência de aminoácidos. Os resíduos catalíticos foram identificados (Glu142 e Glu227) e o sítio catalítico do tipo fenda, típico de algumas celulases. Adicionalmente, identificamos os resíduos aromáticos que contribuem para o mecanismo catalítico de interação com os substratos e uma ponte dissulfeto incomum, que se localiza em

uma posição nunca antes reportada para as GHs 12. Na estrutura da GtCel12A, essa ponte dissulfeto une fitas da folha interna (B), que se dobra para formar o sítio catalítico, a partir da qual, sugerimos que esteja relacionada à estabilização desse sítio catalítico, o que pode facilitar a acomodação do substrato nessa região.

Tais resultados são bastante interessantes e parte deles já foi publicada em revistas científicas da área.

Como perspectivas futuras, pretendemos determinar a estrutura cristalográfica da GtCel12A complexada com diferentes substratos, com o intuito de melhor compreendermos o mecanismo catalítico e a interação com os substratos e como forma de inferir outras propriedades funcionais importantes dessa enzima.

Referências



*“Uma Ciência que hesita em esquecer
seus fundadores está perdida”*

Alfred Whitehead



Referências

1 CORONADO, C. R.; DE CARVALHO JR, J. A.; SILVEIRA, J. L. Biodiesel CO2 emissions: a comparison with the main fuels in the Brazilian market. **Fuel Processing Technology**, v. 90, n. 2, p. 204-211, 2009.

2 SIMÕES, A. F.; LA ROVERE, E. L. Energy sources and global climate change: the brazilian case. **Energy Sources Part A: recovery, utilization, and environmental effects**, v. 30, n. 14-15, p. 1327-1344, 2008.

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

4 MIRZA, U. K.; AHMAD, N.; MAJEED, T. An overview of biomass energy utilization in Pakistan. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 12, n. 7, p. 1988-96, 2008.

5 ANEEL. **Atlas de energia elétrica do Brasil**. 2008. Disponível em: < <http://www.aneel.gov.br/aplicacoes/Atlas/download.htm> >. Acesso em: 20 maio 2013.

6 LYND, L. R. et al. Fuel ethanol from cellulosic biomass. **Science**, v. 251, n. 4999, p. 1318-23, 1991.

7 HIMMEL, M. E. et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 804-7, 2007.

8 PALONEN, H. **Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose**. 2004. 80p. Ph.D. Thesis - Helsinki University of Technology, Espoo, Finland, 2004.

9 WYMAN, C. E. Potential synergies and challenges in refining cellulosic biomass to fuels, chemicals, and power. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 2, p. 254-62, 2003.

10 _____. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 153-57, 2007.

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

12 MALHERBE, S.; CLOETE, T. E. Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 105-14, 2002.

13 SCHUSTER, B.; CHINN, M. Consolidated bioprocessing of lignocellulosic feedstocks for ethanol fuel production. **BioEnergy Research**, v. 6, n. 2, p. 416-35, 2013.

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

15 CHINN, M. S.; NOKES, S. E.; STROBEL, H. J. Influence of moisture content and cultivation duration on *Clostridium thermocellum* 27405 end-product formation in solid substrate cultivation on Avicel. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 7, p. 2664-71, 2008.

16 SCHILLING, J. S.; TEWALT, J. P.; DUNCAN, S. M. Synergy between pretreatment lignocellulose modifications and saccharification efficiency in two brown rot fungal systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 3, p. 465-75, 2009.

17 MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673-86, 2005.

18 ALMEIDA, J. R. M. et al. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82, n. 4, p. 340-49, 2007

19 RITSCHKOFF, A. C. B., J.; VIKARI, L. Identification of carbohydrate degrading enzymes from the brown-rot fungus, *Gloeophyllum trabeum*. **Material und Organismen**, v. 27, n. 1, p. 19-29, 1992.

20 SAHA, B. C. Lignocellulose biodegradation and applications in biotechnology. In: SAHA, B. C.; HAYASHI, K. (Ed.). **Lignocellulose biodegradation**. Washington: American Chemical Society, 2004. p.2-34. (American Chemical Society Symposium Series, v.889).

21 RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, v. 454, n. 7206, p. 841-45, 2008.

22 COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 11, p. 850-61, 2005.

23 IYAMA, K.; LAM, T. B. T.; STONE, B. A. Covalent cross-links in the cell wall. **Plant Physiology**, v. 104, n. 2, p. 315-320, 1994.

24 HIMMEL, M. E.; RUTH, M. F.; WYMAN, C. E. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 358-364, 1999.

25 WYMAN, C. E. et al. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 18, p. 1959-1966, 2005.

26 MATULOVA, M. et al. Degradation of wheat straw by *Fibrobacter succinogenes* S85: a liquid- and solid-state nuclear magnetic resonance study. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 1247-53, 2005.

27 KOSARIC, A. et al. Ethanol fermentation in biotechnology. In: REHM, H. J.; REED., G. (Ed.). **Comprehensive treatise**. Florida: Verlag-chemie, 1983. v.3, p.257-386.

28 WADA, M. et al. The structure of celluloses. **Powder Diffraction**. v. 23, n.2, p. 92-95, 2008.

29 MATTHEWS, J. F. et al. Computer simulation studies of microcrystalline cellulose I β . **Carbohydrate Research**, v. 341, n. 1, p. 138-152, 2006.

30 CAI, Z. S.; PASZNER, L. Salt catalyzed wood bonding with hemicellulose. **Holzforschung**, v. 42, n. 1, p. 11-20, 1988.

31 BIOENERGY Research Centers, an overview of the science: U.S.A: Department of Energy, 2008.

32 STICKLEN, M. B. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 6, p. 433-43, 2008.

33 GROHMANN, K.; TORGET, R.; HIMMEL, M. Dilute acid pretreatment of biomass at high solids concentrations. **Biotechnology and Bioengineering Symposium** , v.17, p. 135-151, 1985.

34 _____. et al. Production of fuel ethanol by enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. In: AMERICAN CHEMICAL SOCIETY NATIONAL MEETING, 200th. 1990. Washington, DC. **Abstracts...** Washington: AMSN, 1990. Part 1. 1 p.

35 GRABBER, J. H. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? a review of cell wall model studies. **Crop Science**, v. 45, p. 820-831, 2005. doi:10.2135/cropsci2004.0191

36 BADGER, P. C. Ethanol from cellulose: a general review. In: JANICK, J.; WHIPKEY, A. (Ed.). **Trends in new crops and new uses**. Alexandria: ASHS Press, 2002. p. 17-21.

37 FERRAZ, A. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: ESPÓSITO, E. ; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 2004. p.215-242.

38 ADLER, E. Lignin chemistry—past, present and future. **Wood Science and Technology**, v. 11, n. 3, p. 169-218, 1977.

39 VORAGEN, A. J. et al. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Structural Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 263-275, 2009.

40 VINCKEN, J.-P. et al. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. implications for cell wall architecture. **Plant Physiology**, v. 132, n. 4, p. 1781-1789, 2003.

41 CANTERI, M. H. G. et al. Pectina: da matéria-prima ao produto final. **Polímeros**, v. 22, n. 2, p. 149-157, 2012.

42 LEVIGNE, S. et al. Determination of the degrees of methylation and acetylation of pectin using a c18 column and internal standards. **Food Hydrocolloids**, v.16, n. 6, p. 547-550, 2002.

43 MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 266-277, 2008.

44 WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 3, p. 97-104, 2006.

45 VINCKEN, J.-P.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A. G. J. Substrate specificity of endoglucanases: what determines xyloglucanase activity? **Carbohydrate Research**, v. 298, n. 4, p. 299-310, 1997.

46 PÉREZ, S.; RODRÍGUEZ-CARVAJAL, M. A.; DOCO, T. A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. a structure in quest of a function. **Biochimie**, v. 85, n. 1-2, p. 109-21, 2003.

47 BRASIL. Ministerio de Minas e Energia. **Balanzo energético nacional. ano base 2012**. Brasília: 2013.

48 GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuels industry. **Biotechnology for Biofuels**, v. 1, n. 1, p. 6, 2008.

49 WORLDWATCH Institute. **Biofuels for transport : global potential and implications for sustainable energy and agriculture**. UK: Earthscan, 2007. ISBN 1844074226 9781844074228.

50 BIOETANOL de cana-de-açúcar. energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro: BNDES; CGEE, 2008.

51 UNICA. Disponível em: < <http://www.unicadata.com.br/>>. Acesso em: 22.abril.2013

52 LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-77, 2002.

53 CARERE, C. R. et al. Third generation biofuels via direct cellulose fermentation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 7, p. 1342-60, 2008.

54 OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDEN, G. A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnology for Biofuels**, v. 1, n. 1, p. 7, 2008.

55 CARDONA, C. A.; SÁNCHEZ, Ó. J. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 12, p. 2415-2457, 2007.

56 DEMAIN, A. L.; NEWCOMB, M.; WU, J. H. Cellulase, clostridia, and ethanol. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 1, p. 124-54, 2005.

57 LYND, L. R. et al. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 5, p. 577-83, 2005.

58 PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, n. 2, p. 153-162, 2000.

59 SANJUÁN, R. et al. Morphological and chemical composition of pith and fibers from mexican sugarcane bagasse. **Holz als Roh- und Werkstoff**, v. 59, n. 6, p. 447-450, 2001.

60 JACOBSEN, S. E.; WYMAN, C. E. Xylose monomer and oligomer yields for uncatalyzed hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose at varying solids concentration. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 41, n. 6, p. 1454-1461, 2002.

61 RODRIGUES, R. C. L. B. et al. Response surface methodology for xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate using controlled vacuum evaporation process variables. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 8, p. 1231-1237, 2003.

62 SOCCOL, C. R. et al. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4820-4825, 2010.

63 BUCKERIDGE, M. S. et al. Ethanol from sugarcane in Brazil: a 'midway' strategy for increasing ethanol production while maximizing environmental benefits. **Global Change Biology Bioenergy**, v. 4, n. 2, p. 119-126, 2012.

64 BARRETO, C. F. R. **Bagaço de cana produz energia no Rio**. Disponível em: <<http://oglobo.globo.com/participe/mat/2007/06/01/295991368.asp>>. Acesso em: 20 maio 2013.

65 LIMA, M. **Pesquisadores da UFSCar substituem areia por cinza de cana-de-açúcar na produção de concreto**. Disponível em: <<http://www.piniweb.com.br/construcao/tecnologia-materiais/pesquisadores-da-ufscar-substituem-areia-por-cinza-de-cana-de-acucar-na-185258-1.asp>>. Acesso em: 21.maio.2013.

66 RANGEL, L. **Curativo de cana e casquinha de siri**. Disponível em: <<http://cienciahoje.uol.com.br/noticias/2010/05/curativo-de-cana-e-casquinha-de-siri>>. Acesso em: 17.maio.2013.

67 MONTEIRO, I.; NATEL, A. **Bagaço de cana-de-açúcar: fonte alternativa de alimento**. Disponível em: <<http://www.farmpoint.com.br/radares-tecnicos/nutricao/bagaco-de-canadeacucar-fonte-alternativa-de-alimento-70151n.aspx>>. Acesso em: 21.maio.2013.

68 PERVAIZ, M.; CORREA, C. A. Biorefinaria: desenvolvimento de plataformas químicas através de tecnologias integradas de biomassa. **Polímeros**, v. 19, n. 1, p. E9-E11, 2009.

69 FAN, Z. et al. A novel biochemical route for fuels and chemicals production from cellulosic biomass. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e31693, 2012.

70 LYND, L. R.; WYMAN, C. E.; GERNGROSS, T. U. Biocommodity engineering. **Biotechnology Progress**, v. 15, n. 5, p. 777-793, 1999.

71 MCMILLAN, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: HIMMEL, M. E.; BAKER, J. O., et al (Ed.). **Enzymatic conversion of biomass for fuels production**. Washington, DC: American Chemical Society, 1994. p.292-324 .

72 DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 6, p. 578-95, 2009.

73 GÁMEZ, S. et al. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering**, v. 74, n. 1, p. 78-88, 2006.

74 ADEN, A. et al. **Lignocellulosic biomass to ethanol process design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis for corn stover**. Golden: NREL, 2002.

75 NORTHEY, A.; GLASSER, G.; SCHULTZ, P. **Lignin**: historical, biological, and materials perspectives. Washington: American Chemical Society, 1999.

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

77 DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, n. 3, p. 220-225, 1996.

78 TASSINARI, T. et al. Energy requirements and process design considerations in compression-milling pretreatment of cellulosic wastes for enzymatic hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 22, n. 8, p. 1689-1705, 1980.

79 SIDIRAS, D.; KOUKIOS, E. Acid saccharification of ball milled straw. **Biomass**, v. 19, p.289-306, 1989

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

81 GRETHLEIN, H. E. Pretreatment for enhanced hydrolysis of cellulosic biomass. **Biotechnology Advances**, v. 2, n. 1, p. 43-62, 1984.

82 TIAN, M. et al. A novel approach for lignin modification and degradation. **Electrochemistry Communications**, v. 12, n. 4, p. 527-530, 2010.

83 BROWNELL, H.; SADDLER, J. Steam explosion pretreatment for enzymatic hydrolysis. In: BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING SYMPOSIUM, 1984. **Proceedings...U.S.A.:1984**. v. 14, p. 5-68.

84 EWANICK, S. M.; BURA, R.; SADDLER, J. N. Acid-catalyzed steam pretreatment of lodgepole pine and subsequent enzymatic hydrolysis and fermentation to ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 98, n. 4, p. 737-46, 2007.

85 SENDICH, E. N. et al. Recent process improvements for the ammonia fiber expansion (AFEX) process and resulting reductions in minimum ethanol selling price. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8429-35, 2008.

86 GARCÍA-CUBERO, M. A. et al. Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 4, p. 1608-13, 2009.

87 HEINZE, T.; KOSCHELLA, A. Solvents applied in the field of cellulose chemistry: a mini review. **Polímeros Ciência e Tecnologia**, v. 15. n.2, p. 84-90, 2005.

88 ARATO, C.; PYE, E. K.; GJENNESTAD, G. The lignol approach to biorefining of woody biomass to produce ethanol and chemicals. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p. 871-82, 2005.

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

90 ZHANG, Y. H. et al. Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 2, p. 214-23, 2007.

- 91 MOXLEY, G.; ZHU, Z.; ZHANG, Y. H. Efficient sugar release by the cellulose solvent-based lignocellulose fractionation technology and enzymatic cellulose hydrolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 17, p. 7885-90, 2008.
- 92 SWATLOSKI, R. P. et al. Dissolution of cellulose [correction of cellose] with ionic liquids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 18, p. 4974-5, 2002.
- 93 JOGLEKAR, H. G.; RAHMAN, I.; KULKARNI, B. D. The path ahead for ionic liquids. **Chemical Engineering & Technology**, v. 30, n. 7, p. 819-828, 2007.
- 94 SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 185-94, 2009.
- 95 HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 4, p. 454-466, 2002.
- 96 KERSTEN, P.; CULLEN, D. Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 44, n. 2, p. 77-87, 2007.
- 97 CHENG, K. K. et al. Sugarcane bagasse mild alkaline/oxidative pretreatment for ethanol production by alkaline recycle process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, n. 1, p. 43-50, 2008.
- 98 WENG, J. K. et al. Emerging strategies of lignin engineering and degradation for cellulosic biofuel production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 166-72, 2008..
- 99 WEIMER, P. J.; RUSSELL, J. B.; MUCK, R. E. Lessons from the cow: what the ruminant animal can teach us about consolidated bioprocessing of cellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5323-31, 2009.
- 100 XIANG, H.; ZHOU, Z.-H. Lignocellulolytic enzymes in termite and its symbiotic microbes. **Chinese Bulletin of Entomology**, v. 46, n. 1, p. 32-40, 2009.
- 101 GREGG, D. J.; BOUSSAID, A.; SADDLER, J. N. Techno-economic evaluations of a generic wood-to-ethanol process: effect of increased cellulose yields and enzyme recycle. **Bioresource Technology**, v. 63, n. 1, p. 7-12, 1998.

102 BREAKING the biological barriers to cellulosic ethanol: a joint research agenda: U.S.A: Department of Energy -Office of Science and Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, 2006.

103 ROSENBERG, S. L. Fermentation of pentose sugars to ethanol and other neutral products by microorganisms. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 2, n. 3, p. 185-193, 1980.

104 HONG, J.; TAMAKI, H.; KUMAGAI, H. Cloning and functional expression of thermostable beta-glucosidase gene from *Thermoascus aurantiacus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 6, p. 1331-9, 2007.

105 INGRAM, L. O. et al. Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 10, p. 2420-5, 1987.

106 ZHANG, M. et al. Promising ethanologens for xylose fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 51-52, n. 1, p. 527-536, 1995.

107 HO, N. W. et al. Successful design and development of genetically engineered *Saccharomyces* yeasts for effective cofermentation of glucose and xylose from cellulosic biomass to fuel ethanol. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 65, p. 163-92, 1999.

108 JEFFRIES, T. W.; SHI, N. Q. Genetic engineering for improved xylose fermentation by yeasts. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 65, p. 117-161, 1999.

109 OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentative performance of bacteria and yeasts in lignocellulose hydrolysates. **Process Biochemistry**, v. 28, p. 249-257, 1993.

110 OLSSON, L.; NIELSEN, J. The role of metabolic engineering in the improvement of *Saccharomyces cerevisiae*: Utilization of industrial media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 785-792, 2000

111 HAHN-HAGERDAL, B. et al. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, p. 937-953, 2007.

112 BOTHAST, R. J.; NICHOLS, N. N.; DIEN, B. S. Fermentations with new recombinant organisms. **Biotechnology Progress**, v. 15, n. 5, p. 867-75, 1999.

113 DEMEKE, M. et al. Combining inhibitor tolerance and D-xylose fermentation in industrial *Saccharomyces cerevisiae* for efficient lignocellulose-based bioethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 120-137, 2013.

114 MATSUSHIKA, A. et al. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 37-53, 2009.

115 HENRISSAT, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 280, pt 2, p. 309-16, 1991.

116 RYU, D. D. Y.; MANDELS, M. Cellulases: biosynthesis and applications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 2, n. 2, p. 91-102, 1980.

117 COUGHLAN, M. P. Cellulose hydrolysis: the potential, the problems and relevant research at Galway. **Biochemical Society Transactions**, v. 13, n. 2, p. 405-6, 1985.

118 MANDELS, M. Applications of cellulases. **Biochemical Society Transactions**, v. 13, n. 2, p. 414-6, 1985.

119 BÉGUIN, P.; AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 25-58, 1994.

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

121 BAJPAI, P. Application of enzymes in the pulp and paper industry. **Biotechnology Progress**, v. 15, n. 2, p. 147-57, 1999.

122 BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 5, p. 355-83, 2000.

123 GODFREY, T.; WEST, S. Introduction to industrial enzymology. In: GODFREY, T.; WEST, S. **Industrial enzymology**. 2nd ed. London: Macmillan Press, 1996. p.1-8.

124 WILSON, D. B. Processive and nonprocessive cellulases for biofuel production-lessons from bacterial genomes and structural analysis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 2, p. 497-502, 2012.

125 WARREN, R. A. Microbial hydrolysis of polysaccharides. **Annual Review of Microbiology**, v. 50, p. 183-212, 1996. doi: 10.1146/annurev.micro.50.1.183

126 HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 293, Pt 3, p. 781-8, 1993.

127 HENRISSAT, B.; TEERI, T. T.; WARREN, R. A. A scheme for designating enzymes that hydrolyse the polysaccharides in the cell walls of plants. **FEBS Letters**, v. 425, n. 2, p. 352-4, 1998.

128 MCCARTER, J. D.; STEPHEN WITHERS, G. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 4, n. 6, p. 885-92, 1994.

129 BIRSAN, C. et al. Mechanisms of cellulases and xylanases. **Biochemical Society Transactions**, v. 26, n. 2, p. 156-60, 1998.

130 WITHERS, S. G. Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, n. 4, p. 325-337, 2001.

131 GILKES, N. R. et al. Domains in microbial beta-1, 4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. **Microbiology Reviews**, v. 55, n. 2, p. 303-15, 1991.

132 KLEMAN-LEYER, K. M. et al. The cellulases endoglucanase I and cellobiohydrolase II of *Trichoderma reesei* act synergistically to solubilize native cotton cellulose but not to decrease its molecular size. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 8, p. 2883-7, 1996.

133 MIETTINEN-OINONEN, A. **Trichoderma reesei strains for production of celulases for the textile industry**. 2004. 96 p. Ph.D. Thesis - Department of Biological and Environmental Sciences, University of Helsinki, Helsinki, Finland, 2004.

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

135 AWAFO, V. A. **Biosynthesis of cellulase-system from *Trichoderma reesei* and its characteristics**. 1997. 255p. Ph.D. Thesis- Department of Food Science and Agricultural Chemistry, McGill University, Montreal, Canada, 1997.

136 TEERI, T. T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 5, p. 160-167, 1997.

137 LYND, L. R.; ZHANG, Y. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: analytical framework and methodological approach. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 77, n. 4, p. 467-75, 2000

138 HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. **Biochemical Journal**, v. 316, Pt 2, p. 695-6, 1996.

139 BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial beta-glucosidases: cloning, properties, and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 375-407, 2002.

140 DIN, N. et al. C1-Cx revisited: intramolecular synergism in a cellulase. **Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.**, v. 91, n. 24, p. 11383-7, 1994.

141 DRISKILL, L. E. et al. Relationship between glycosyl hydrolase inventory and growth physiology of the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus* on carbohydrate-based media. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 893-7, 1999.

142 MBA MEDIE, F. et al. Genome analyses highlight the different biological roles of cellulases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 227-34, 2012.

143 HENRISSAT, B.; DAVIES, G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 7, n. 5, p. 637-44, 1997.

144 LOMBARD, V. et al. The Carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 42 (Database Issue), p. D490-5, 2014.

145 HENRISSAT, B. et al. Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. **Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.**, v. 92, n. 15, p. 7090-4, 1995.

146 COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B. The modular structure of cellulases and other carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. In: OHMIYA, K. et al. (Ed.). **Genetics, biochemistry and ecology of cellulose degradation**. Tokyo, Japan: Uni Publishers Co, 1999. p.15-23.

147 OHMIYA, K. et al. Structure of cellulases and their applications. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 14, n. 1, p. 365-414, 1997.

148 SCHÜLEIN, M. Enzymatic properties of cellulases from *Humicola insolens*. **Journal of Biotechnology**, v. 57, n. 1-3, p. 71-81, 1997.

149 BAUER, M. W. et al. An endoglucanase, EglA, from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* hydrolyzes beta-1,4 bonds in mixed-linkage (1-3),(1-4)-beta-D-glucans and cellulose. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 1, p. 284-90, 1999.

150 BOK, J. D.; YERNOOL, D. A.; EVELEIGH, D. E. Purification, characterization, and molecular analysis of thermostable cellulases CelA and CelB from *Thermotoga neapolitana*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4774-81, 1998.

151 WICHER, K. B. et al. Deletion of a cytotoxic, N-terminal putative signal peptide results in a significant increase in production yields in *Escherichia coli* and improved specific activity of Cel12A from *Rhodothermus marinus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, n. 5, p. 578-84, 2001.

152 DING, S. et al. Glycoside hydrolase gene cluster of *Acidothermus cellulolyticus*. In: MANSFIELD, S.; SADDLER, J. (Ed.). **Application of Enzymes to Lignocellulosics**. Washington, DC: American Chemical Society, 2003. p. 332-360.

153 SANDGREN, M. et al. The X-ray crystal structure of the *Trichoderma reesei* family 12 endoglucanase 3, Cel12A, at 1.9 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 308, n. 2, p. 295-310, 2001.

154 SULZENBACHER, G. et al. The *Streptomyces lividans* family 12 endoglucanase: construction of the catalytic core, expression, and X-ray structure at 1.75 Å resolution. **Biochemistry**, v. 36, n. 51, p. 16032-9, 1997.

155 CRENNELL, S. J.; HREGGVIDSSON, G. O.; NORDBERG KARLSSON, E. The structure of *Rhodothermus marinus* Cel12A, a highly thermostable family 12 endoglucanase, at 1.8 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 320, n. 4, p. 883-97, 2002.

156 KHADEMI, S. et al. Determination of the structure of an endoglucanase from *Aspergillus niger* and its mode of inhibition by palladium chloride. **Acta Crystallographica Section D**, v. 58, Pt 4, p. 660-7, 2002.

157 SULZENBACHER, G. et al. The crystal structure of a 2-fluorocellotriosyl complex of the *Streptomyces lividans* endoglucanase CelB2 at 1.2 Å resolution. **Biochemistry**, v. 38, n. 15, p. 4826-33, 1999.

158 TOMME, P.; WARREN, R. A. J.; GILKES, N. R. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. In: POOLE, R. K. (Ed.). **Advances in microbial physiology**. London: Academic Press, 1995. v. 37, p.1-81.

159 ERIKSSON, K.-E. L.; BLANCHETTE, R. A. **Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components**. Berlin: Springer-Verlag, 1990.

160 BAYER, E. A.; MORAG, E.; LAMED, R. The cellulosome-a treasure-trove for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 12, n. 9, p. 379-86, 1994.

161 SCHWARZ, W. H. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 5-6, p. 634-49, 2001.

162 KHANOK, R. et al. *Paenibacillus curdlanolyticus* strain B-6 multienzyme complex: A novel system for biomass utilization. In: MATOVIC, M. D. (Ed.). **Biomass now- cultivation and utilization**. USA: InTech, 2013. doi: 10.5772/51820.

163 TEN HAVE, R.; TEUNISSEN, P. J. Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 11, p. 3397-413, 2001

164 BENNETT, J. W.; WUNCH, K. G.; FAISON, B. D. Use of fungi in biodegradation. In: HURST, C. J. (Ed.). **Manual of environmental microbiology**. Washington. D.C.: AMS press, 2002. p.960-971.

165 HAMMEL, K. E. Fungal degradation of lignin. In: CADISCH, G.; GILLER, K. E. (Ed.). **Plant litter quality and decomposition**. UK: CAB International, 1997. p.33-46.

166 ESTERBAUER, H. et al. Production of *Trichoderma* cellulase in laboratory and pilot scale. **Bioresource Technology**, v. 36, n. 1, p. 51-65, 1991.

167 NIEVES, R. A. et al. Survey and analysis of commercial cellulase preparations suitable for biomass conversion to ethanol. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 301-304, 1997.

168 JØRGENSEN, H. et al. Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 7, p. 851-861, 2003.

169 COWLING, E. B. **Comparative biochemistry of the decay of sweetgum sapwood by white-rot and brown-rot fungi**. Washington. D.C.: U.S.D.O.A, 1961. p.1258. Technical Bulletin.

170 KEREM, Z.; HAMMEL; 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, r 1999.

171 FUNGUS *Gloeophyllum trabeum*. Disponível em: <
<http://www.commanster.eu/commanster/Mushrooms/Basidio/SpBasidio/Gloeophyllum.trabeum.html>>. Acesso em: 17.junho.2013.

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

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

174 ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-10, 1990.

175 ROY, B.; ARCHIBALD, F. Effects of kraft pulp and lignin on *Trametes versicolor* carbon metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 6, p. 1855-1863, 1993.

176 SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning, a laboratory manual**. U.S.A.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

177 LIN, W. L.; FELDBERG, R. S.; CLARK, E. D. Kinetics of cell growth and heterologous glucoamylase production in recombinant *Aspergillus nidulans*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 41, p. 273-279, 1993.

178 DURAND, H.; CLANET, M.; TIRABY, G. Genetic improvement of *Trichoderma reesei* for large-scale cellulase production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 6, p. 341-346, 1988.

179 KIS-PAPO, T. et al. Survival of filamentous fungi in hypersaline Dead Sea water. **Microbial Ecology**, v. 45, n. 2, p. 183-90, 2003.

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

181 FUNGUS *Aspergillus niger*. Disponível em: <<http://www.ruthtobias.com/images/misc/6a00e54f9787cc8833010534a791af970c-400wi>>. Acesso em: 07.maio.2013.

182 CONIDIÓFORO de *Aspergillus niger*. Disponível em :<<http://www.taxateca.com/ordeneurotiales.html>>. Acesso em 08 de maio de 2013.

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

184 MASCOT Server. Disponível em: <<http://www.matrixscience.com/searchformselect.html>>. Acesso em: 28.julho.2013.

185 CANTOR, C. R.; SCHIMMEL, P. R. **Techniques for the study of biological structure and function Part II**. New York: Freeman and Co, 1980.

186 WOOD, T. M. Preparation of crystalline, amorphous, and dyed cellulase substrates. In: WILLIS A. WOOD, S. T. K. (Ed.). **Methods in Enzymology**. London: Academic Press, 1988. v.160, p.19-25.

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

188 ARGONNE National Laboratory. Disponível em <http://www.bio.anl.gov/molecular_and_systems_biology/Sensor/sensor2.html>. Acesso em 18.julho.2013.

- 189 THORNTON, P. R. **Scanning electron microscopy**. London: Chapman & Hall, 1968.
- 190 LAWES, G. **Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis**. London: John Wiley & Sons, 1987.
- 191 GOLDSTEIN, J. I. et al. **Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis**. 2nd ed. New York: Plenum Press, 1992.
- 192 _____. **Practical scanning electron microscopy**. 2nd ed. New York: Plenum Press, 1975.
- 193 KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1751, n. 2, p. 119-39, 2005.
- 194 CANTOR, C. R.; SCHIMMEL, P. R. **Biophysical chemistry, Part II**. New York: Freeman and Co, 1980.
- 195 BEROVA, N.; NAKANISHI, K.; WOODY, R. W. **Circular dichroism: principles and applications**. 2nd. New York: Wiley-VCH, 2000. p. 877.
- 196 CHEN, Y. H.; YANG, J. T. A new approach to the calculation of secondary structures of globular proteins by optical rotatory dispersion and circular dichroism. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 44, n. 6, p. 1285-91, 1971.
- 197 SVERGUN, D. I. Small-angle X-ray and neutron scattering as a tool for structural systems biology. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 391, n. 7, p. 737-43, 2010.
- 198 HAMMERSLEY, A. P. **FIT2D**: an introduction and overview. Grenoble: ERSF, 1997. Internal report.
- 199 GLATTER, O.; KRATKY, O. **Small angle x-ray scattering**. London: Academic Press, 1982.
- 200 SVERGUN, D. I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. **Journal of applied Crystallography**, v. 25, p.495-503, 1992. doi: 10.1107/S0021889892001663

201 FISCHER, H. et al. Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale. **Journal of Applied Crystallography**, v.43, p. 101-109, 2010. doi: 10.1107/S0021889809043076.

202 KONAREV, P. V.; PETOUKHOV, M.; SVERGUN, D. Automated matching of high-and low resolution structural models. **Journal of Applied Crystallography**, v. 34, p. 33-41, 2001. doi: 10.1107/S0021889800014126.

203 SVERGUN, D. I. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. **Biophysical Journal**, v. 76, n. 6, p. 2879-86, 1999.

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

205 RAMBO, R. P.; TAINER, J. A. Characterizing flexible and intrinsically unstructured biological macromolecules by SAS using the Porod-Debye law. **Biopolymers**, v. 95, n. 8, p. 559-71, 2011.

206 LEUNISSEN, M. **An essay on several aspects of protein crystallization research**. 2001. Disponível em: < <http://people.ds.cam.ac.uk/ml527/publications/assets/leunissen-literatureresearch.pdf> >. Acesso em: 29.junho.2013

207 MCPHERSON, A. Introduction to protein crystallization. **Methods**, v. 34, n. 3, p. 254-265, 2004.

208 WEBER, P. C. Physical principles of protein crystallization. In: ANFINSEN, C. et al. (Ed.). **Advances in Protein Chemistry**. London: Academic Press, 1991. v. 41, p.1-36.

209 OCHI, T. et al. Perspectives on protein crystallization. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v.101, n.1-3, p. 56-63, 2009.

210 GRIN. **Structure and function of beta toxin, a virulence factor of *Staphylococcus sp.*** Disponível em: < <http://www.grin.com/en/doc/232392/structure-and-activities-of-beta-toxin-a-virulence-factor-of-staphylococcus> >. Acesso em: 18.julho.2013.

211 WLODAWER, A. et al. Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures. **FEBS Journal**, v. 275, n. 1, p. 1-21, 2008.

212 LESLIE, A. G. Integration of macromolecular diffraction data. **Acta Crystallographica Section D**, v. 55, Pt 10, p. 1696-702, 1999.

213 KABSCH, W. XDS. **Acta Crystallographica Section D**, v. 66, n. 2, p. 125-32, 2010.

214 COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, N. M. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. **Acta Crystallographica Section D**, v. 50, n. 5, p. 760-3, 1994.

215 MATTHEWS, B. W. Solvent content of protein crystals. **Journal of Molecular Biology**, v. 33, n. 2, p. 491-7, 1968.

216 ADAMS, P. et al. PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. **Acta Crystallographica Section D**, v. 58, n. 11, p. 1948-54, 2002.

217 MCCOY, A. J. et al. Phaser crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, n. 4, p. 658-674, 2007.

218 YOSHIZAWA, T. et al. Structural basis for inhibition of xyloglucan-specific endo- β -1,4-glucanase (XEG) by XEG-protein inhibitor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 22, p. 18710-6, 2012.

219 EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica Section D**, v. 60, Pt. 12 and Pt.1, p. 2126-32, 2004.

220 CHEN, V. B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D**, v. 66, n. 1, p. 12-21, 2010.

221 SWISS Institute of Bioinformatics. **ExPASy Prot Param tool**. Disponível em <<http://web.expasy.org/protparam/>>. Acesso em: 23.maio.2013.

222 PAULY, M. et al. A xyloglucan-specific endo-beta-1,4-glucanase from *Aspergillus aculeatus*: expression cloning in yeast, purification and characterization of the recombinant enzyme. **Glycobiology**, v. 9, n. 1, p. 93-100, 1999.

223 AHN, D.; KIM, H.; YOUNG PACK, M. Immobilization of β -glucosidase using the cellulose-binding domain of *Bacillus subtilis* endo- β -1,4-glucanase. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 5, p. 483-486, 1997.

224 GRISHUTIN, S. G. et al. A lichenase-like family 12 endo-(1 \rightarrow 4)- β -glucanase from *Aspergillus japonicus*: study of the substrate specificity and mode of action on β -glucans in comparison with other glycoside hydrolases. **Carbohydrate Research**, v. 341, n. 2, p. 218-229, 2006.

225 GLOSTER, T. M. et al. Characterization and three-dimensional structures of two distinct bacterial xyloglucanases from families GH5 and GH12. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 26, p. 19177-19189, 2007.

226 SHIMOKAWA, T. et al. Purification, molecular cloning and enzymatic properties of a family 12 endoglucanase (EG-II) from *Fomitopsis palustris*: role of EG-II in larch holocellulose hydrolysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 18, p. 5857-61, 2008.

227 HENRIKSSON, G. et al. Endoglucanase 28 (Cel12A), a new *Phanerochaete chrysosporium* cellulase. **European Journal of Biochemistry**, v. 259, n. 1-2, p. 88-95, 1999.

228 TAMBOR, J. H. et al. Recombinant expression, activity screening and functional characterization identifies three novel endo-1,4- β -glucanases that efficiently hydrolyse cellulosic substrates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 1, p. 203-14, 2012.

229 GAMA, F. M.; MOTA, M. Enzymatic hydrolysis of cellulose (I): relationship between kinetics and physico-chemical parameters. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 15, n. 3, p. 221-236, 1997.

230 DOURADO, F. et al. Characterization of cellulose surface free energy. **Journal of Adhesion Science and Technology**, v. 12, n. 10, p. 1081-1090, 1998.

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

232 SANDGREN, M. et al. Comparison of family 12 glycoside hydrolases and recruited substitutions important for thermal stability. **Protein Science**, v. 12, n. 4, p. 848-60, 2003.

233 JAENICKE, R. Stability and stabilization of globular proteins in solution. **Journal of Biotechnology**, v. 79, n. 3, p. 193-203, 2000.

234 JAENICKE, R.; BÖHM, G. The stability of proteins in extreme environments. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 8, n. 6, p. 738-48, 1998.

235 VIEILLE, C. et al. Xylose isomerases from *Thermotoga*. **Methods in Enzymology**, v. 330, p. 215-24, 2001. doi: 10.1016/S0076-6879(01)30377-4.

236 TUOHY, M. G. et al. Kinetic parameters and mode of action of the cellobiohydrolases produced by *Talaromyces emersonii*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1596, n. 2, p. 366-80, 2002.

237 HUANG, X.; MONK, C. Purification and characterization of a cellulase (CMCase) from a newly isolated thermophilic aerobic bacterium *Caldibacillus cellulovorans* gen. nov., sp. nov. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 85-92, 2004.

238 SANDGREN, M. et al. The *Humicola grisea* Cel12A enzyme structure at 1.2 Å resolution and the impact of its free cysteine residues on thermal stability. **Protein Science**, v. 12, n. 12, p. 2782-2793, 2003.

239 KOZIN, M. B.; SVERGUN, D. I. Automated matching of high and low-resolution structural models. **Journal of Applied Crystallography**, v. 34, p. 33-41, 2001.

240 RAMAKRISHNAN, C.; RAMACHANDRAN, G. N. Stereochemical criteria for polypeptide and protein chain conformations: allowed conformations for a pair of peptide units. **Biophysical Journal**, v. 5, n. 6, p. 909-933, 1965.

241 KIM, H.W.; KATAOKA, M.; ISHIKAWA, K. Atomic resolution of the crystal structure of the hyperthermophilic family 12 endocellulase and stabilizing role of the Dx Dx DG calcium-binding motif in *Pyrococcus furiosus*. **FEBS Letters**, v. 586, n. 7, p. 1009-1013, 2012.

242 CHENG, Y.-S. et al. Crystal structure and substrate-binding mode of cellulase 12A from *Thermotoga maritima*. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 79, n. 4, p. 1193-1204, 2011.

243 PRATES, É. T. et al. X-ray structure and molecular dynamics simulations of endoglucanase 3 from *Trichoderma harzianum*: structural organization and substrate recognition by endoglucanases that lack cellulose binding module. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e59069, 2013.

244 DAVIES, G.; HENRISSAT, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure**, v. 3, n. 9, p. 853-859, 1995.

245 SZILÁGYI, A.; ZÁVODSZKY, P. Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: results of a comprehensive survey. **Structure**, v. 8, n. 5, p. 493-504, 2000.

246 VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 1, p. 1-43, 2001.

247 KARSHIKOFF, A.; LADENSTEIN, R. Ion pairs and the thermotolerance of proteins from hyperthermophiles: a "traffic rule" for hot roads. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 26, n. 9, p. 550-6, 2001.

248 STERNER, R.; LIEBL, W. Thermophilic adaptation of proteins. **Critical Reviews in Biochemical and Molecular Biology**, v. 36, n. 1, p. 39-106, 2001.

249 TÖRRÖNEN, A.; HARKKI, A.; ROUVINEN, J. Three-dimensional structure of endo-1,4-beta-xylanase II from *Trichoderma reesei*: two conformational states in the active site. **EMBO Journal**, v. 13, n. 11, p. 2493-501, 1994.

250 PAYNE, C. M. et al. Multiple functions of aromatic-carbohydrate interactions in a processive cellulase examined with molecular simulation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 47, p. 41028-41035, 2011.

251 LEHTIÖ, J. et al. The binding specificity and affinity determinants of family 1 and family 3 cellulose binding modules. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 100, n. 2, p. 484-489, 2003.

252 BECKHAM, G. T. et al. Identification of amino acids responsible for processivity in a family 1 carbohydrate-binding module from a fungal cellulase. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 3, p. 1447-1453, 2010.

Anexos



*“Ciência é conhecimento
organizado, sabedoria é vida
organizada”*

Immanuel Kant



ANEXO I

Tabela 4 - Composição do meio de cultura CM (*Complete medium*)

Reagente	Concentração
D-glicose	10 g L ⁻¹
Peptona	2 g L ⁻¹
Extrato de levedura	1 g L ⁻¹
Casamino acids	1 g L ⁻¹
Uracila	1,1 g L ⁻¹
Solução 20 X de sais de nitrato	5% (v v ⁻¹)
NaNO ₃	120 g L ⁻¹
KCl	10,4 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	16,3 g L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	20,9 g L ⁻¹
Solução de vitaminas (100x)	0,1% (v v ⁻¹)
Riboflavina	0,2 g L ⁻¹
Tiamina-HCl	0,2 g L ⁻¹
Nicotinamida	0,2 g L ⁻¹
Piridoxina-HCl	0,1 g L ⁻¹
Ácido pantotênico	0,02 g L ⁻¹
Biotina	0,0004 g L ⁻¹
Solução de oligoelementos	0,1% (v v ⁻¹)
ZnSO ₄ -7H ₂ O	22 g L ⁻¹
H ₃ BO ₃	11 g L ⁻¹
FeSO ₄ -7H ₂ O	5 g L ⁻¹
CoCl ₂ -6H ₂ O	1,7 g L ⁻¹
CuSO ₄ -5H ₂ O	1,6 g L ⁻¹
MnCl ₂ -4H ₂ O	5 g L ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ -2H ₂ O	1,5 g L ⁻¹
EDTA	50
Solução de uridina 100 mM	1% (v v ⁻¹)
Solução estoque de MgSO₄ 2,25 M	0,5% (v v ⁻¹)

Tabela 5 - Composição do meio de cultura SRM (*Selective Regeneration Medium*)

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

Tabela 6 - Composição do meio MM J

Reagente	Concentração
D-Maltose	40 g L ⁻¹
Solução estoque de sais de nitrato (20X)	20%
NaNO ₃	120 g L ⁻¹
KCl	10.4 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	16.3 g L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	20.9 g L ⁻¹
Solução estoque de MgSO₄ 2,25 M	2 % (v v ⁻¹)
Solução de oligoelementos	0.4% (v v ⁻¹)
ZnSO ₄ -7H ₂ O	22 g L ⁻¹
H ₃ BO ₃	11 g L ⁻¹
FeSO ₄ -7H ₂ O	5 g L ⁻¹
CoCl ₂ -6H ₂ O	1.7 g L ⁻¹
CuSO ₄ -5H ₂ O	1.6 g L ⁻¹
MnCl ₂ -4H ₂ O	5 g L ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ -2H ₂ O	1.5 g L ⁻¹
EDTA	50 g L ⁻¹

ANEXO II

Publicações referentes ao período de doutoramento:

✚ Artigos publicados

1- MIOTTO, L. S.; REZENDE, C.A; BERNARDES, A.; SERPA, V. I.; TSANG, A.; POLIKARPOV, I. The characterization of the endoglucanase Cel12A from *Gleophyllum trabeum* reveals an enzyme highly active on β -glucan. PlosOne, 9(9): e108393, 2014.

2- MIOTTO, L.S.; REIS, C. V.; NETO, M. O.; POLIKARPOV, I. SAXS studies of the endoglucanase Cel12A from *Gleophyllum trabeum* show a monomeric structure and reveals the influence of temperature on its structural stability. Materials (Basel), 7(7),p. 5202-5211, 2014.

3- PIROTA, R. D. P. B.; MIOTTO, L. S.; DELABONA, P. S.; FARINAS, C. S. Improving the extraction conditions of endoglucanase produced by *Aspergillus niger* under solid-state fermentation. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 30, p. 117-123, 2013.

✚ Artigos em fase de preparação

4- MIOTTO, L. S.; BERNARDES, A.; POLIKARPOV, I. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the endoglucanase Cell2A from *Gleophyllum trabeum*. Pretendemos submeter este artigo para a revista Acta Crystallographica, Section F.

5- Um outro artigo, ainda em fase de preparação e, sem título definido, incluirá a estrutura cristalográfica da GtCel12A e de várias outras enzimas da família GH12. O mesmo está sendo preparado em colaboração com grupos de pesquisa canadenses, como os do Prof. Alexei Savchenko, da Universidade de Toronto e do Prof. Adrian Tsang, da Universidade Concordia.