

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular
Departamento de Genética e Evolução
Laboratório de Biologia Molecular

ADELITA CAROLINA SANTIAGO

CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA ENZIMA QUIMÉRICA
OBTIDA PELA FUSÃO GÊNICA ENDOGLUCANASE-XILANASE DE *Trichoderma*
harzianum

Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva

SÃO CARLOS – SP
2013

ADELITA CAROLINA SANTIAGO

**CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA ENZIMA QUIMÉRICA
OBTIDA PELA FUSÃO GÊNICA ENDOGLUCANASE-XILANASE DE *Trichoderma
harzianum***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva

SÃO CARLOS – SP

2013

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

S235cc Santiago, Adelita Carolina.
Construção e caracterização de uma enzima quimérica obtida pela fusão gênica endoglucanase-xilanase de *Trichoderma harzianum* / Adelita Carolina Santiago. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
71 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Biologia molecular. 2. Bioetanol. 3. Enzimas. 4. Fusão gênica. 5. *Trichoderma harzianum*. I. Título.

CDD: 574.88 (20ª)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

"CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA ENZIMA QUIMÉRICA
OBTIDA PELA FUSÃO GÊNICA ENDOGLUCANASE-XILANASE DE
Trichoderma harzianum"

Dissertação de Mestrado de
ADELITA CAROLINA SANTIAGO

Banca Examinadora

Prof. Dr. Flavio Henrique Silva


.....

Profa. Dra. Cristiane Sanchez Farinas


.....

Profa. Dra. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli


.....

"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende."

(Leonardo da Vinci)

À minha mãe Zilda,
Pelo amor, incentivo e paciência,

Com carinho, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, pelo apoio e confiança, em especial, minha mãe Zilda, pelo amor incondicional, carinho, dedicação e incentivo;

Agradeço ao Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva, não só pela orientação, mas também pela amizade e ensinamentos que levarei para a minha vida;

À Prof^a. Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes, sempre disposta a ajudar;

Ao Dr. Wilson Malagó Júnior, com quem aprendi a maioria das técnicas usadas no laboratório e pela paciência em desenhar quando eu não entendia algo;

Ao Wesley Cardoso Generoso, por sempre tirar minhas dúvidas sobre as celulases e xilanases;

À Prof^a. Dra. Ludier Kesser Santos, por compartilhar todo o seu conhecimento;

Aos amigos Danilo Elton Evangelista e Rafael Peduzzi, pela disposição em me ajudar até altas horas da noite, via internet, a usar o GraphPad;

Às minhas *chicas* queridas, Ana Lígia Buzolin, Danyelle Toyama e Mariana Cardoso Miguel, pela amizade dentro e fora do laboratório, pelas jantinhas agradáveis e por todos os momentos alegres passados juntas;

Aos colegas Aliandra, Augusto, Bruna, Beth, Daniela, Darlan, Fernando, Gabriel, Kishi, Lucas, Priscila, Rafaela e Taíse, por toda ajuda, sugestões e convivência durante este tempo;

Ao Rodrigo, pela enorme paciência, compreensão, companheirismo e “injeções” de ânimo quando eu mais precisava;

A meus tios Cláudia e Geraldo, meus segundos pais durante o tempo que morei em São Paulo, pelo apoio e preocupação;

À secretária Ivanildes, por toda a ajuda com as documentações necessárias;

Aos colegas do Departamento de Genética e Evolução, pela convivência;

Ao PPGGEv, pela oportunidade;

Ao CNPq pela concessão da bolsa e pelo auxílio financeiro que possibilitou a execução deste trabalho;

E a todos que direta ou indiretamente ajudaram na conclusão deste trabalho.

RESUMO

O bagaço da cana-de-açúcar é um material lignocelulósico que pode ser convertido em etanol pela ação de celulases e xilanases. Essas enzimas atuam sinergicamente para converter celulose e hemicelulose em glicose. A fim de obter uma enzima capaz de realizar dupla função, uma enzima quimérica celulase-xilanase denominada ThEg3Xyn3, foi construída em laboratório. A fusão foi realizada pela ligação do C-terminal de uma endoglucanase do fungo *Trichoderma harzianum* ao N-terminal de uma xilanase do mesmo fungo, separadas por um linker. A enzima quimérica foi recombinantemente produzida em *Pichia pastoris* e purificada para caracterização cinética e bioquímica. A quimera demonstrou atividade de ambas as enzimas com atividade máxima a 38 °C e pH 6,0, sob estas condições, a atividade celulolítica e xilanolítica foi maior do que das enzimas parentais. Os resultados demonstram que a enzima quimérica pode ser eficiente na hidrólise da biomassa e satisfatória para a produção de etanol pelo processo de sacarificação e fermentação simultâneas.

Palavras-chave: quimera, fusão, etanol, *Trichoderma harzianum*

ABSTRACT

The sugarcane bagasse is a lignocellulosic material that can be converted into ethanol by action of cellulases and xylanases. These enzymes act synergistically to convert cellulose and hemicellulose into glucose. In order to obtain an enzyme that can perform dual function, a chimeric enzyme cellulase-xylanase denominated ThEg3Xyn3, was constructed by gene fusion in our laboratory. The fusion was performed by binding the C-terminus of an endoglucanase from *Trichoderma harzianum* to the N-terminus of a xylanase of the same fungus, separated by a linker. The chimeric enzyme was recombinantly produced in *Pichia pastoris* and purified for kinetic and biochemical characterization. The chimera demonstrated activity of both enzymes with maximum activity at 38 °C and pH 6.0, under these conditions, cellulolytic and xylanolytic activity was greater than of the parental enzymes. The results demonstrate that the chimeric enzyme can be efficient in hydrolysis of the biomass and satisfactory for the production of ethanol by the process of simultaneous saccharification and fermentation.

Key-words: chimera, fusion, ethanol, *Trichoderma harzianum*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da estrutura da parede celular vegetal (extraído de RUBIN, 2008).....	15
Figura 2. Estrutura química da celulose (extraído de SANDGREN <i>et al.</i> , 2005) e da xilana (hemicelulose) (extraído de DODD & CANN, 2009).....	17
Figura 3. Representação esquemática do modo de ação das principais celulases que compõem o complexo celulolítico (extraído de WANG <i>et al.</i> , 2012a).....	22
Figura 4. Representação esquemática da xilana e das xilanases que compõem o complexo xilanolítico (extraído de DODD & CANN, 2009).....	23
Figura 5. Mapa do vetor de expressão pGAPZ α A (Invitrogen) e sequência do sítio de clonagem múltipla (MCS).....	31
Figura 6. Esquema da fusão que resultou no plasmídeo pGAPEG3Xyn3.....	34
Figura 7. Esquema linear do plasmídeo pGAPEG3Xyn3.....	35
Figura 8. Sequências nucléica e de aminoácidos da ThEg3Xyn3.....	42
Figura 9. Análise da clivagem dos plasmídeos recombinantes pGAPEG3Xyn3.....	43
Figura 10. Identificação de transformantes de <i>Pichia pastoris</i> com o plasmídeo pGAPEG3Xyn3.....	44
Figura 11. Análise, em pequena escala, da expressão de ThEg3Xyn3 em transformantes de <i>Pichia pastoris</i>	45
Figura 12. Análise da purificação de ThEg3Xyn3.....	46
Figura 13. Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática da ThEg3Xyn3.....	48
Figura 14. Efeito do pH sobre a atividade enzimática da ThEg3Xyn3.....	49
Figura 15. Determinação da termoestabilidade da ThEg3Xyn3.....	50

Figura 16. Caracterização cinética da atividade xilanolítica da enzima quimérica ThEg3Xyn3.....	52
Figura 17. Caracterização cinética da atividade celulolítica da enzima quimérica ThEg3Xyn3.....	54
Figura 18. Mapa do vetor de propagação pTZ57RT (Fermentas).....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Temperatura ótima, pH ótimo e parâmetros cinéticos da atividade xilanolítica da enzima quimérica ThEg3Xyn3 comparados ao de Xyn3	52
Tabela 2. Temperatura ótima, pH ótimo e parâmetros cinéticos da atividade celulolítica da enzima quimérica ThEg3Xyn3 comparados ao de EGIII	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	graus Celsius
AOX	álcool oxidase
Avicel	celulose microcristalina
CBM	módulo de ligação à celulose (<i>cellulose-binding module</i>)
CBD	domínio de ligação à celulose (<i>cellulose-binding domain</i>)
CD	domínio catalítico (<i>catalytic domain</i>)
cDNA	DNA complementar
cm	centímetros
CMC	carboximetilcelulose
DNA	ácidos desoxirribonucléico
DNS	ácido dinitrossalicílico
dNTP	desoxirribonucleotídeos trifosfatos
DTT	ditiotreitól
E.C.	Enzyme Commission
EGIII	endoglucanase III
FES	fermentação no estado sólido
FS	fermentação submersa
g	gramas
<i>g</i>	gravidade
GAPDH	glicerol-3-fosfato-dehidrogenase
GH	glicosil-hidrolase
h	hora
HCl	ácido clorídrico
HF	hidrólise separada da fermentação
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
kB	quilobases
k_{cat}	constante catalítica da taxa de renovação da enzima
kDa	quilodalton
K_m	constante catalítica de Michaelis-Menten
kV	quilovolts
L	litro
LB	Luria-Bertani
M	molar
mg	miligramas
MgCl ₂	cloreto de magnésio

min	minuto
mL	mililitros
mM	milimolar
Na ₂ HPO ₄	fosfato de sódio dibásico
NaCl	cloreto de sódio
ng	nanogramas
Ni ²⁺	níquel na forma iônica
nm	nanômetros
ORF	fase aberta de leitura (<i>open reading frame</i>)
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	potencial de hidrogênio
pI	ponto isoelétrico
rpm	rotação por minuto
s	segundos
SAP	fosfatase alcalina de camarão (<i>shrimp alkaline phosphatase</i>)
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
SSCF	sacarificação simultânea à cofermentação
SSF	sacarificação simultânea à fermentação
ThEg3Xyn3	proteína quimérica recombinante resultante da fusão de endoglucanase III e xilanase III de <i>Trichoderma harzianum</i>
U	unidade enzimática
X-gal	5-bromo-4-cloro-indolil-β-D-galactopiranosídeo
Xyn3	xilanase III
YEPD	meio dextrose, peptona e extrato de levedura (<i>yeast extract peptone dextrose</i>)
YEPDS	meio sorbitol, dextrose, peptona, extrato de levedura (<i>yeast extract peptone dextrose sorbitol</i>)
μF	microfaraday
μg	microgramas
μL	microlitros
μM	micromolar
Ω	ohm

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Estrutura da parede celular vegetal.....	14
1.2 Utilização da biomassa vegetal para a produção de etanol por hidrólise enzimática...17	17
1.3 Enzimas do complexo celulolítico e xilanolítico.....	20
1.4 O fungo <i>Trichoderma harzianum</i>	23
1.5 Fusão de enzimas.....	24
1.6 EGIII e Xyn3: as enzimas utilizadas no presente trabalho.....	27
2. OBJETIVOS.....	29
2.1 Objetivos Gerais.....	29
2.2 Objetivos Específicos.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Clonagem e expressão da quimera ThEg3Xyn3.....	30
3.1.1 Clones usados na construção da quimera.....	30
3.1.2 Construção do plasmídeo de expressão contendo a quimera.....	32
3.1.3 Transformação de <i>Pichia pastoris</i> e análise da expressão em pequena escala.....	35
3.1.4 Produção e purificação da enzima recombinante.....	37
3.2 Ensaio de atividade enzimática da ThEg3Xyn3.....	38
3.2.1 Análise de atividade hidrolítica da enzima por DNS.....	38
3.2.2 Determinação do efeito da temperatura e do pH sobre a quimera.....	39
3.2.3 Determinação da termoestabilidade.....	39
3.2.4 Determinação dos parâmetros cinéticos enzimáticos.....	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1 Caracterização e análise do plasmídeo de fusão pGAPEG3Xyn3.....	41
4.2 Expressão e purificação da quimera ThEg3Xyn3.....	43
4.3 Análise do efeito da temperatura e do pH e termoestabilidade.....	46
4.4 Caracterização cinética da ThEg3Xyn3.....	50
5. CONCLUSÕES.....	60

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
ANEXO I.....	71

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, grande parte dos resíduos gerados a partir do bagaço da cana-de-açúcar é queimada para a produção de energia elétrica (ERENO, 2007). Entretanto, este resíduo lignocelulósico é rico em açúcares, podendo ser convertido em etanol por fermentação (LYND *et al.*, 2002; WACKETT, 2008). A biomassa da cana-de-açúcar pode ser degradada pelo uso de reagentes químicos, como ácidos e bases fortes, além de altas temperaturas e pressão. No entanto, esse tipo de tratamento produz resíduos tóxicos, que muitas vezes interferem e dificultam a posterior fermentação (BNDES & CGEE, 2008). Por este motivo, a utilização de coquetéis enzimáticos para a degradação da biomassa e sua conversão em bioetanol é vantajosa (DIPARDO, 2000; LYND *et al.*, 1999).

Celulases e xilanases são essenciais na conversão da celulose e hemicelulose em açúcares fermentescíveis. Para isso, muitas enzimas (β -glicosidases, endoglucanases, exoglucanases e xilanases) atuam na hidrólise de celulose em glicose. Quando estas enzimas atacam o substrato polimérico em diferentes locais, elas criam novos sítios para a ação de outras enzimas, ou seja, atuam sinergicamente (Morais, *et al.*, 2010). A atividade sinérgica das enzimas pode ser utilizada em processos industriais como uma ferramenta biotecnológica para melhorar a produção de bioenergia, no entanto, as enzimas encontram na biomassa uma grande barreira para sua atuação, que é a parede celular. Portanto, há a necessidade de métodos rápidos e reprodutíveis para otimizar a eficiência das celulases para a produção de sacarídeos e sua posterior conversão em bioetanol (KIM *et al.*, 2010).

Muitos estudos estão sendo conduzidos para criar celulases multifuncionais pelo método de fusão gênica, a fim de se obter novas enzimas, com aumento catalítico e maior eficiência enzimática para a degradação da celulose (HONG *et al.*, 2006; KITAGO *et al.*, 2007; STREIT & SCHMITZ, 2004). A fusão de domínios protéicos permite a construção de proteínas quiméricas com aumento da solubilidade e facilidade de purificação (AN *et al.*, 2005). Além disso, a atividade bifuncional das enzimas quiméricas é capaz de catalisar duas ou mais reações e assim, permite a redução do número de enzimas na conversão da biomassa, o que faz com que a utilização das mesmas seja economicamente viável (FAN *et al.*, 2009a, 2009b; LU & FENG, 2008; SUN *et al.*, 2011). Pensando nos benefícios citados, neste trabalho foi realizada a fusão de uma celulase com uma xilanase de *Trichoderma harzianum*.

1.1 Estrutura da parede celular vegetal

Mesmo considerando que há grandes diferenças na composição e estrutura anatômica da parede celular vegetal, pode-se considerar que maior parte é formada por 35-50% de celulose, 5-30% de lignina e de 20-35% de hemicelulose por peso seco da planta (LYND *et*

al., 1999; NAKAZAWA *et al.*, 2009). A figura 1 esquematiza estes polímeros na parede celular vegetal. Os três componentes supracitados formam estruturas chamadas de microfibrilas, as quais estão organizadas em macrofibrilas, que proporcionam estabilidade à parede celular vegetal (RUBIN, 2008).

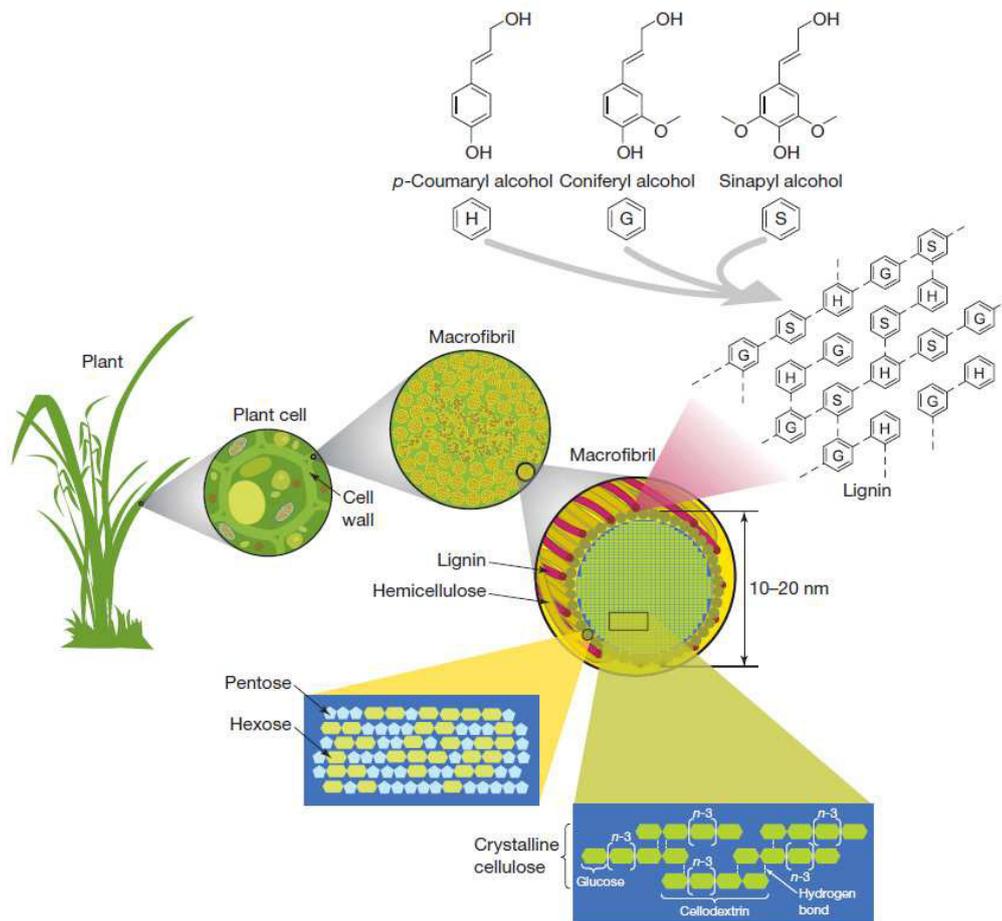


Figura 1. Representação esquemática da estrutura da parede celular vegetal (extraído de RUBIN, 2008).

A celulose é o maior componente da biomassa da planta, sendo um polímero altamente homogêneo e formado por ligações glicosídicas β -1,4 (LAUREANO-PEREZ *et al.*, 2005; SANDGREN *et al.*, 2005) (figura 2). Este polímero é altamente simétrico, pois cada um dos lados da cadeia pela qual é formado possui um número igual de grupos hidroxila. O acoplamento de moléculas de celulose adjacentes por ligações de hidrogênio e força de van der Waal's resulta em um alinhamento paralelo e uma estrutura cristalina, que faz com que as fibras tenham uma grande tensão (ZHANG & LYND, 2004). A cristalinidade de algumas regiões da celulose na parede celular vegetal é separada por regiões menos ordenadas, resultando na celulose amorfa. Esta cristalinidade varia de 50% a 90%, dependendo da origem (HON, 1994).

A hemicelulose é a segunda fonte renovável mais abundante com potencial uso em bioprocessos (KULKARNI *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2009). Ela é uma mistura heterogênea de diferentes polissacarídeos e sua composição varia com o tipo de planta. Sua constituição é basicamente de xilana, um heteropolímero formado por uma cadeia de resíduos de xilose com ligação β -1,4 (SAHA, 2003; SANDGREN *et al.*, 2005) (figura 2). A xilana, além de possuir pentoses como a xilose, também é composto por arabinose, feruloil, ácido metilglucurônico, ácido cumárico e grupos acetil (DODD & CANN, 2009; EBRINGEROVA & HEINZE, 2000).

A principal diferença entre a celulose e a hemicelulose, é que a cadeia de celulose é formada por ligações glicosídicas, enquanto a hemicelulose, a qual é composta principalmente por xilana, é formada por ligações xilosídicas. Além disso, a hemicelulose é mais heterogênea, pois possui curtas cadeias laterais ramificadas consistindo de diferentes açúcares, enquanto a celulose é mais homogênea por ser formada por longas cadeias de glicose facilmente hidrolisáveis (VAN WYK, 2001).

A lignina é o terceiro maior componente da parede celular vegetal, caracterizada por ser um polímero fenólico, sintetizado pela polimerização do álcoois *p*-coumaril, coniferil e sinapil (RUBIN, 2008; SUN *et al.*, 2001). Os blocos de lignina parecem ser ligados de modo aleatório, resultando em uma estrutura bastante complicada. A lignina está covalentemente ligada à hemicelulose, primeiramente por ligações éster com xilana, formando uma matriz complexa cercada por microfibrilas de celulose. Este polímero é responsável por dar resistência à parede celular e proteger a planta de ataques de micro-organismos (DODD & CANN, 2009; MOHR & SCHOPFER, 1995).

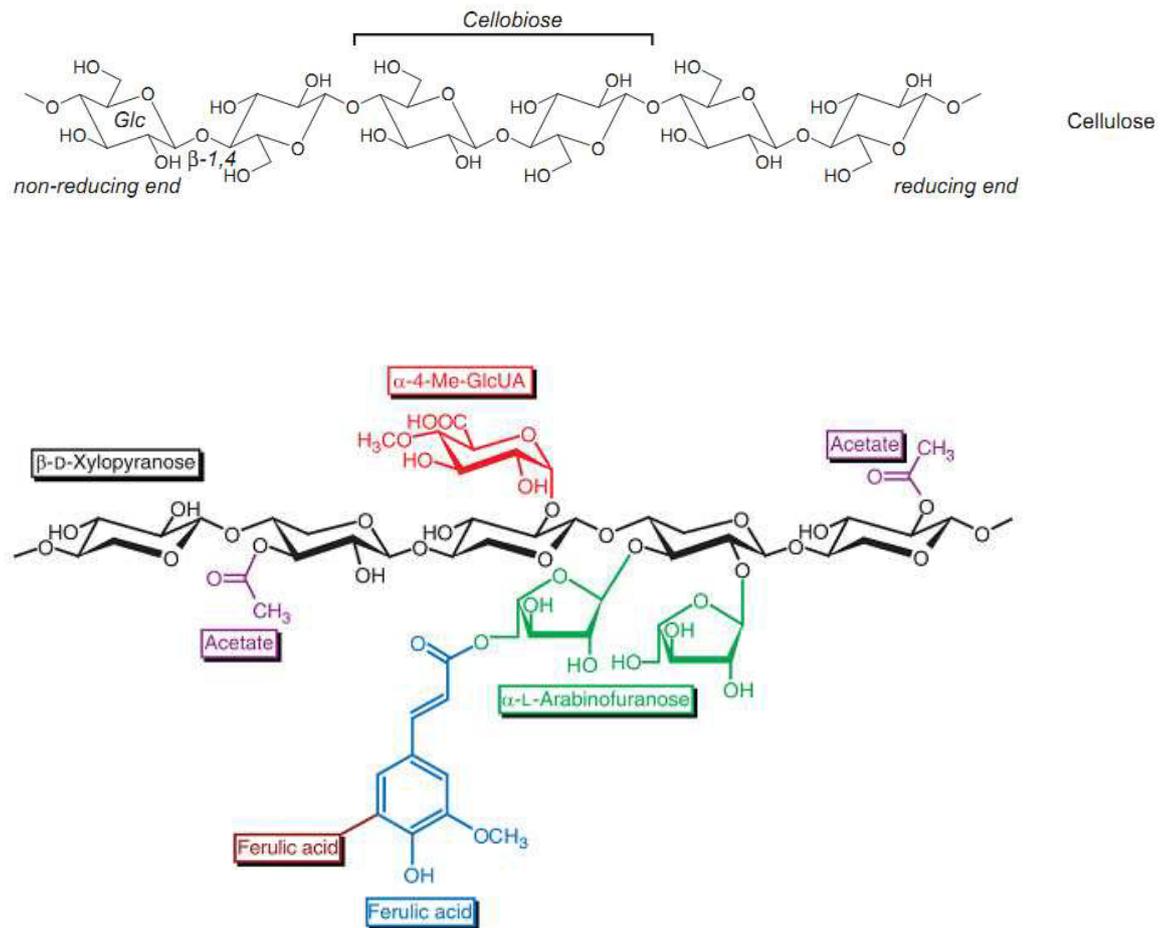


Figura 2. Estrutura química da celulose (extraído de SANDGREN *et al.*, 2005) e da xilana (hemicelulose) (extraído de DODD & CANN, 2009).

1.2 Utilização da biomassa vegetal para a produção de etanol por hidrólise enzimática

Denomina-se de biomassa todos os recursos naturais, ou seja, toda a massa de material orgânico de qualquer material biológico (HOWARD *et al.*, 2003). A biomassa celulósica, também chamada de biomassa lignocelulósica, é a fonte renovável mais abundante existente (HIMMEL *et al.*, 2007; RUBIN, 2008). Esta biomassa pode ser processada para fornecer bioenergia de forma elaborada e adequada para uso. No Brasil, a biomassa predominante é o bagaço da cana-de-açúcar. Em 2008 foram gerados aproximadamente 97 milhões de toneladas deste resíduo (base seca) (CASTRO *et al.*, 2010b). O país é o maior produtor e exportador de cana-de-açúcar, e o segundo maior produtor de etanol (BNDES & CGEE, 2008).

A grande quantidade de biomassa produzida é considerada como resíduo e muitas vezes chamada de “lixo”, porém, este lixo tem um grande potencial para ser convertido em diferentes produtos com alto valor agregado, como biocombustíveis, substâncias químicas, fonte de energia barata, alimentação animal e nutrientes humanos (HOWARD *et al.*, 2003).

A produção de biocombustíveis tem sido o foco da atenção mundial devido a muitos problemas, dentre eles o aumento do preço do petróleo e seu esgotamento, além da alta emissão de CO₂ pelos combustíveis fósseis (CASTRO & PEREIRA JR., 2010). A produção do chamado etanol de primeira geração (obtido por meio da fermentação da glicose proveniente de uma matéria-prima, como da cana-de-açúcar e do milho) tem resultado em uma série de problemas que envolvem o preço dos alimentos, o uso e fertilidade do solo, o habitat de animais selvagens, a emissão de carbono e a qualidade da água. O etanol de segunda geração (obtido a partir do material lignocelulósico por hidrólise enzimática) seria uma solução para os problemas citados anteriormente, entretanto, a produção deste tipo de biocombustível ainda sofre com os custos efetivos e as barreiras tecnológicas (GREENE *et al.*, 2004; JORDAN *et al.*, 2007; LYND *et al.*, 2008; NIGAM & SINGH, 2011; SIMS *et al.*, 2011; SINGH & OLSEN, 2011).

A cultura da qual a biomassa é derivada não é domesticada para este propósito. Os métodos para a sacarificação e fermentação ainda são ineficientes e caros (RUBIN, 2008). Para que a produção de bioetanol torne-se economicamente viável, é crucial a disponibilidade de matéria-prima e a melhora dos custos de enzimas com capacidade de degradá-la, além da otimização dos processos industriais, em especial, da sacarificação (HIMMEL *et al.*, 2007).

A obtenção de bioetanol necessita, portanto, de tecnologias com base em materiais lignocelulósicos que envolvam a hidrólise dos polissacarídeos da biomassa em açúcares fermentescíveis e sua posterior fermentação. Para isso, a hidrólise utiliza tecnologias complexas e multifásicas com o uso de rotas ácidas e enzimáticas para a remoção da lignina e separação dos açúcares (CASTRO & PEREIRA JR., 2010).

Devido à recalcitrância da lignina presente nessa matéria-prima, se faz necessário o uso de pré-tratamentos para a remoção da lignina e acessibilidade das enzimas hidrolíticas à hemicelulose e celulose. Estes pré-tratamentos são classificados como: químicos, físicos ou biológicos (BHAT, 2000). O processo convencional para a produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica inclui os seguintes passos: pré-tratamento, que proporciona a quebra da matriz lignocelulósica; hidrólise enzimática, para a despolimerização da celulose em glicose; fermentação, para transformação da glicose em etanol por meio de leveduras; destilação e desidratação, que permite a separação e purificação do etanol para atender as especificações do combustível (MARGEOT *et al.*, 2009).

Os processos de pré-tratamento podem ser feitos com ácido ou base, explosão a vapor, solventes orgânicos, altas temperaturas e pressão (STEPHANOPOULOS, 2007).

O pré-tratamento químico realizado com ácido diluído consiste em aquecer uma solução de ácido e a biomassa em um reator com elevadas temperaturas para a remoção de praticamente toda a hemicelulose, porém, este tipo de tratamento possui custos mais

elevados do que outros processos, além de ser necessária a neutralização do hidrolisado nas etapas subsequentes de hidrólise enzimática e fermentação (PITARELO, A. P., 2007; SU & CHENG, 2002).

O processo utilizando bases no pré-tratamento utiliza condições moderadas de temperatura e pressão quando comparadas com a utilização de ácidos. O principal efeito é a remoção da lignina da biomassa, por “inchar” a mesma e diminuir a cristalinidade da celulose, desta forma, há um aumento da superfície de contato e porosidade da parede celular (BAUDEL, *et al.*, 2005; PITARELO, A. P., 2007), porém, este processo também é caro em relação aos outros utilizados.

O pré-tratamento físico, como o de explosão a vapor, a biomassa é tratada com vapor saturado a temperaturas de 160 °C e 240 °C durante um curto período de tempo, após, ocorre a descompressão explosiva do sistema e o material pré-tratado é coletado (PITARELO, A. P., 2007). Durante este processo, a hemicelulose é hidrolisada em açúcares solúveis e a lignina parcialmente modificada, tornando a biomassa suscetível à solvatação e depois, aos processos de hidrólise ácida ou enzimática (SUN & CHENG, 2002).

O problema do pré-tratamento são as consequências geradas, como a formação de produtos inespecíficos que degradam o açúcar e inibem a fermentação, necessidade do tratamento posterior dos resíduos químicos gerados e a corrosão de bioreatores e equipamentos (HOWARD *et al.*, 2003; MARGEOT *et al.*, 2009).

A utilização de celulasas na hidrólise da celulose ocorre em condições mais brandas de pressão, temperatura e pH quando comparados com os processos químicos e físicos. A hidrólise enzimática apresenta elevada especificidade e elimina a produção de inibidores na fermentação, como furfurais e derivados de lignina. Embora os custos de biocatalisadores sejam altos, a economia no processo se dá tanto pelo ponto de vista energético quanto metalúrgico, devido os equipamentos serem fabricados com materiais menos nobres, já que terão menos problemas com corrosão (GALBE & ZACCHI, 2002; SHEEHAN & HIMMEL, 1999).

A hidrólise enzimática e a conversão dos açúcares em etanol podem ocorrer por dois processos, de forma sequencial, em um processo denominado HSF (hidrólise separada da fermentação) ou simultânea, em um processo chamado de SSF (sacarificação simultânea à fermentação) (KÁDÁR *et al.*, 2004; OLOFSSON *et al.*, 2008).

O SSF possui menor custo de investimento. A glicose liberada é concomitantemente usada pela fermentação, assim, há uma redução da inibição das enzimas e otimização do processo. Esta baixa concentração de glicose no meio favorece o equilíbrio das outras reações de hidrólise, formando mais produto e reduzindo o risco de contaminação do sistema. Já o HSF tem como vantagem a possibilidade de hidrólise e fermentação ocorrerem em suas condições ótimas, uma vez que os processos acontecem

separadamente. Como não há matéria-prima em suspensão durante a fermentação, as células podem ser recicladas ao sistema, porém, a desvantagem é o acúmulo de açúcares intermediários provenientes da hidrólise e conseqüentemente, a inibição das enzimas, o que faz com que também haja uma redução na conversão final de glicose (KÁDÁR *et al.*, 2004; OLOFSSON *et al.*, 2008). Outro processo que pode ser realizado é o SSCF (sacarificação simultânea à cofermentação), em que há ao mesmo tempo a hidrólise da celulose e da hemicelulose e fermentação. Na cofermentação, há a possibilidade de se fermentar hexoses e pentoses, no caso desta última, xilose, proveniente da hemicelulose (CARDONA & SÁNCHEZ, 2007).

Há duas estratégias para a produção de celulasas por micro-organismos durante a fermentação, uma chamada de FES (fermentação no estado sólido) e outra de FS (fermentação submersa) e a principal diferença entre elas é o teor de água presente no meio (MITCHELL *et al.*, 2000; PANDEY, 2003; RAGHAVARAO *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2004). Na FES, a água livre é praticamente ausente, ou seja, a água encontra-se complexada ao substrato, o qual mimetiza as condições encontradas na natureza (PANDEY, 2003; RAGHAVARAO *et al.*, 2003). A maior desvantagem nesse tipo de estratégia, é que, a limitação de água pode levar à desnaturação de enzimas que participam do processo de metabolismo do fungo, por isso, é evitada quando objetiva-se a geração de muito produto em escalas maiores, como em bioreatores (ROBINSON & NIGAM, 2003). Na FS há um alto teor de água e o meio diluído favorece o controle de temperatura de cultivo, o que permite que não haja degradação de enzimas, porém, há necessidade de esterilização, já que o meio líquido é mais propício a contaminações (MITCHELL *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2004).

Como visto anteriormente, ainda é indispensável o pré-tratamento do material lignocelulósico quando se trata de hidrólise enzimática. A produção de celulasas em quantidade suficiente e sua aplicação se encontram ainda em fase de desenvolvimento. Ainda são necessários muitos estudos sobre quais tecnologias e estratégias devem ser adotadas para que se possa alcançar o aumento da produtividade e fazer com que a produção de bioetanol seja economicamente viável (HIMMEL *et al.*, 2007; STEPHANOPOULOS, 2007). As abordagens biotecnológicas existentes são poderosas e vêm se tornando disponíveis para que se possa vencer a recalcitrância da biomassa e a produção sustentável de bioetanol em larga escala (LYND *et al.*, 2008.)

1.3 Enzimas do complexo celulolítico e xilanalítico

As celulasas e xilanases são hidrolases que constituem um complexo de várias enzimas que atuam sinergicamente. No caso das celulasas, elas clivam regiões da celulose

amorfa e cristalina, já as xilanases, atuam sobre o principal componente da hemicelulose, a xilana.

Estas enzimas são responsáveis pela quebra de ligações O-glicosídicas e primeiramente foram classificadas de acordo com o modo de ação de seu domínio catalítico, mais recentemente, elas são classificadas baseadas sobre suas propriedades estruturais (HENRISSAT *et al.*, 1998).

As enzimas que compõem o sistema celulolítico são as celulases, que são as responsáveis por hidrolisar as ligações glicosídicas β -1,4 na cadeia de celulose. De acordo com a E.C. (Enzyme Commission), as celulases são classificadas com o número 3.2.1.x, onde o x varia de acordo com a enzima celulolítica e são divididas em três grupos (AWAFO, 1997; LYND *et al.*, 2002):

- Endoglucanases: grupo representado pelas β -1,4-endoglucanases (EC 3.2.1.4), as quais clivam aleatoriamente as ligações glicosídicas internas, mais especificamente na região amorfa da celulose, liberando oligossacarídeos de vários tamanhos;
- Exoglucanases: grupo formado pelas β -1,4-celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) e glucanohidrolases (EC 3.2.1.74). As celobiohidrolases atuam sobre as extremidades reductoras (CBHI) e não reductoras (CBHII) da região cristalina da celulose, liberando glicose ou celobiose;
- β -glicosidases: grupo representado pelas β -1,4-glicosidases (EC3.2.1.21), que catalisam a hidrólise da celobiose ou de celodextrinas solúveis em glicose.

De acordo com Lynd *et al.* (2002), a quebra enzimática das ligações glicosídicas β -1,4 ocorre por um mecanismo de hidrólise ácida, usando um próton doador e um nucleófilo ou base.

Devido à natureza recalcitrante da celulose, o sistema celulolítico possui uma característica geral para a maioria das celulases, uma estrutura modular que inclui os módulos catalítico e de ligação à celulose. O módulo de ligação à celulose (CBM: *cellulose-binding module*) facilita a hidrólise por se ligar à superfície da celulose e permite que o domínio catalítico (CD: *catalytic domain*) fique próximo ao seu substrato (LYND *et al.*, 2002). Além disso, os CBMs são importantes para a iniciação e processividade das exoglucanases (TEERI *et al.*, 1998).

As celulases atuam sinergicamente, ou seja, possuem atividade coletiva e de maneira coordenada para hidrolisar eficientemente a celulose, esquematizada na figura 3. Essa atividade coletiva é maior do que a soma das atividades individuais das enzimas. Há quatro formas de sinergismo relatadas: sinergia entre endoglucanases e exoglucanases; sinergia entre as exoglucanases; sinergia entre exoglucanases e β -glicosidases e por fim, sinergia entre CDs e CBMs (DIN *et al.*, 1994).

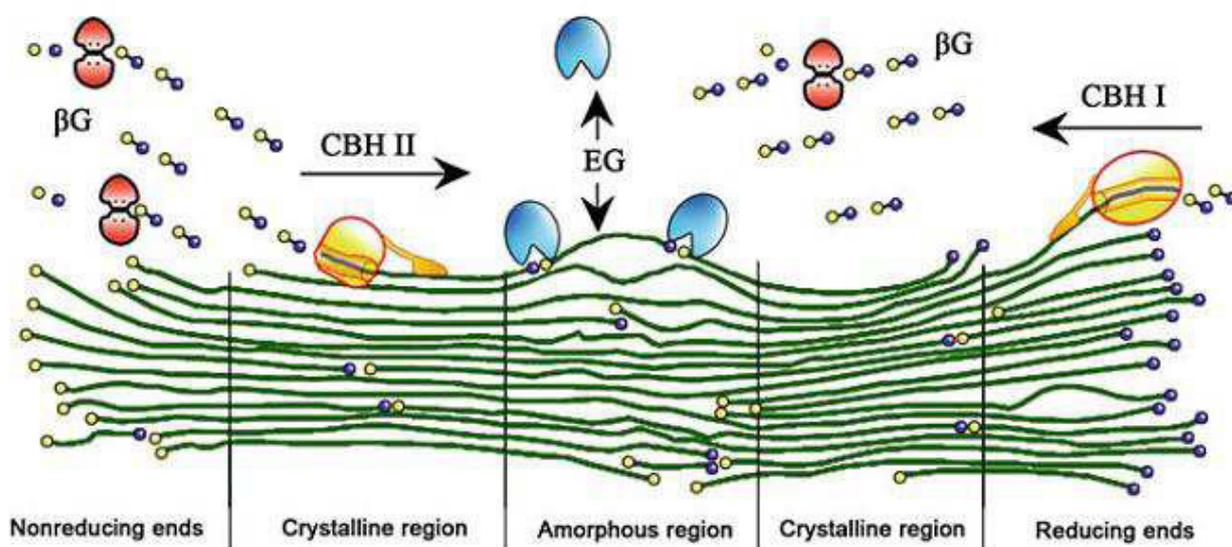


Figura 3. Representação esquemática do modo de ação das principais celulasas que compõem o complexo celulolítico (extraído de WANG *et al.*, 2012a).

As celulasas não são as únicas enzimas pertencentes à família das glicosil-hidrolases (GHs). Muitas hemicelulasas, no caso, xilanases, também pertencem a esta família.

O complexo xilanalítico é formado pelas xilanases, capazes de degradar xilana, o principal componente da hemicelulose. A hidrólise completa da xilana envolve a ação sinérgica de várias enzimas (Figura 4) que podem tanto clivar a cadeia principal de xilana, quanto suas ramificações, são elas (DODD & CANN, 2009; POLIZELI *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2011b):

- β -1,4-xilanases (EC 3.2.1.8), que são responsáveis por clivar ligações xilosídicas internas β -1,4 na cadeia de xilana. Elas reconhecem locais específicos para a clivagem com base em propriedades do polissacarídeo, como o comprimento da cadeia e os níveis de ramificação;
- β -D-xilosidades (EC 3.2.1.37), que hidrolisam a extremidade não redutora de oligômeros β -D-xilopiranosil (resultante da degradação por endoxilanases) liberando xilose. A remoção de xilooligossacarídeos possibilita maior eficiência da hidrólise de xilana, já que esse açúcar inibe a ação das xilanases;
- α -L-arabinofuranosidas (EC 3.2.1.55), que são capazes de clivar ligações α -glicosídicas entre arabinose e xilose. Complexos que contém grande quantidade de arabinoxilana necessitam de um pré-tratamento com esta enzima.
- α -glucuronidas (EC 3.2.1.139), que clivam ligações α (1 \rightarrow 2), as quais ligam unidades do ácido metil-glucurônico na xilana;
- acetilxilanaesterases (EC 3.1.1.72), que permitem a remoção dos grupos O-acetil nas posições 2 e 3 dos resíduos de β -D-xilopiranosil;

- feruloilesterases (EC 3.1.1.73), que hidrolisam as ligações éster entre cadeias de arabinose e ácido ferúlico;
- *p*-ácido cumárico esterases (EC 3.1.1.73), que clivam as ligações éster entre arabinose e ácido *p*-cumárico, e lignina e ácido *p*-cumárico.

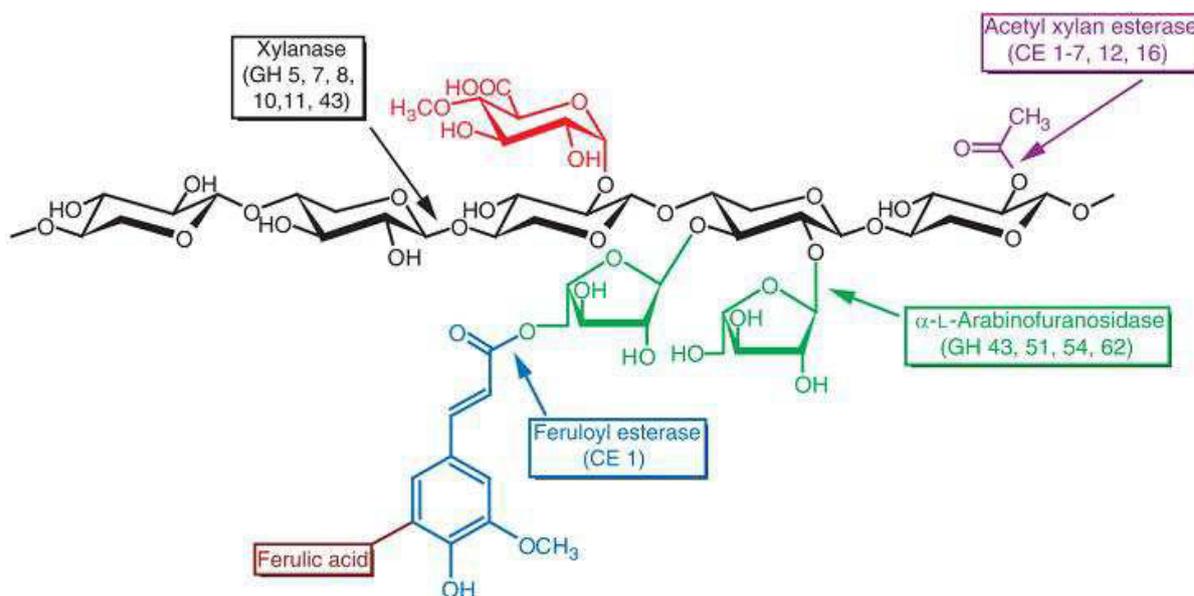


Figura 4. Representação esquemática da xilana e das xilanases que compõem o complexo xilanolítico (extraído de DODD & CANN, 2009).

1.4 O fungo *Trichoderma harzianum*

As celulases podem ser produzidas por uma gama de micro-organismos, mas principalmente por fungos filamentosos. Os fungos hipercelulolíticos mais estudados funcionalmente, bioquimicamente e estruturalmente são: *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*), *Humicola insolens* e *Aspergillus niger* (CASTRO *et al.*, 2010b; KUMAR *et al.* 2008; VON OSSOWSKI *et al.* 2003).

Trichoderma sp. são fungos saprófitos do solo (MELO, 1996). Estes fungos são considerados importantes produtores de celulases e xilanases. Por não serem patogênicos e de fácil cultivo, podem ser usados industrialmente, pois os altos níveis de produção enzimática são extracelulares (KAR *et al.*, 2006).

O fungo *T. harzianum* é uma forma assexuada do fungo *Hypocrea lixii* e é utilizado como controle biológico (ALMEIDA, 2009; FARIA *et al.* 2002). Recentemente, uma cepa particular desse fungo (IOC-3844) tem sido estudada para ser utilizada em processos industriais (CASTRO *et al.*, 2010b). Esse fungo apresenta uma atividade balanceada das celulases β -glicosidases, endoglucanases e exoglucanases, sendo capaz de hidrolisar eficientemente substratos celulolíticos (solúveis e insolúveis) em glicose (CASTRO *et al.*, 2010a, 2010b). Rezende *et al.* (2002) e Silveira *et al.* (1999) verificaram que o mesmo fungo

tem a capacidade de produzir xilanases, e que, a adição destas xilanases facilitam o processo de hidrólise da madeira pré-tratada, assim como no refinamento da celulose.

As enzimas desse fungo já são bem caracterizadas, entretanto, pouco é conhecido sobre a sua maquinaria celulolítica, tanto biofisicamente quanto bioquimicamente (COLUSSI *et al.*, 2010; COLUSSI *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2009).

Apesar do *T. reesei* ser o fungo mais utilizado em processos industriais, o *T. harzianum* mostrou maior produtividade e atividade específica quando se trata de produção de celulasas visando o etanol. Trabalhos demonstram que a cepa *T. harzianum* IOC-3844 é promissora para a produção de celulasas por fermentação submersa do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado (celulignina). Esta cepa possui alta atividade endoglucanásica e uma atividade ainda mais relevante de β -glicosidase. Além disso, o extrato bruto do sobrenadante de cultivo do fungo demonstra ter características apropriadas para hidrólise de celulose, atividade xilanásica acessória e alta estabilidade térmica. Portanto, o *T. harzianum* IOC-3844 é um potencial produtor de enzimas do complexo celulolítico, podendo ser utilizado no processo simultâneo de sacarificação e fermentação da cana-de-açúcar (CASTRO *et al.*, 2010b; CASTRO & PEREIRA JR., 2010; COLUSSI *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2010; VÁZQUEZ *et al.*, 2007). No entanto, ainda são poucos os estudos relativos ao seu sistema celulolítico e xilanolítico.

1.5 Fusão de enzimas

Na natureza, as proteínas estão muitas vezes organizadas em multidomínios, a fim de realizar funções que requerem mais do que uma única função (BAYER *et al.*, 1998; TSUJI *et al.*, 2001). Enzimas multifuncionais, principalmente as bifuncionais, ocorrem na natureza como uma enzima possuidora de capacidades catalíticas diferentes (HUANG *et al.*, 2001; MILES *et al.*, 1999). A expressão desse tipo de enzima pode ser controlada por elementos regulatórios comuns, por vezes, isso se deve a reações de catálise sequenciais, que tendem a evoluir para enzimas bi ou multifuncionais para que o metabolismo seja mais eficiente (KHANDEPARKER & NUMAN, 2008).

Alguns exemplos da diversidade natural de enzimas bifuncionais têm sido relatados em alguns estudos. Pohlschroder *et al.* (1994), demonstraram a presença de um sistema multicomplexo celulase-xilanase em *Clostridium papyrosolvans* C7, em que foi encontrada a atividade de xilanase em adição à atividade de celulase. Flint *et al.* (1993), encontraram outra xilanase-celulase bifuncional de *Ruminococcus xavefaciens* e verificaram atividade de xilanase e β -glucanase, demonstrando que a proteína possuía dois domínios catalíticos separados que resulta em um polipeptídeo que atua em diferentes substratos poliméricos. Chen *et al.* (2006), encontraram uma xilanase de *Aspergillus Níger* A-25, chamada de Xyn3,

a qual demonstrou atividade de β -glucanase além de xilanase, indicando que ambas atividades são catalisadas por um mesmo sítio ativo.

Desde o surgimento das técnicas de DNA recombinante por volta dos anos 70, a tecnologia de fusão gênica tem sido amplamente utilizada para seleção biológica, recuperação e produção (e facilitação de purificação) de proteínas recombinantes (FORD *et al.*, 1991; SLAUCH & SILHAVY, 1991). Apesar de existirem enzimas que evoluíram para a função bifuncional, a maioria das enzimas híbridas é resultante da fusão *in vitro* de enzimas individuais. Portanto, cientistas adotaram a estratégia natural das enzimas bifuncionais para desenvolver proteínas quiméricas recombinantes, as quais tem se tornado ferramentas indispensáveis em muitas aplicações biotecnológicas (BEGUIN, 1999; BÜLOW & MOSBACH, 1991; LEVY & SHOSEYOV, 2002; NIXON *et al.*, 1998).

A fusão protéica é uma abordagem importante em pesquisa bioquímica. A fusão funcional de duas enzimas deve ter várias vantagens em reação às propriedades cinéticas e de produção das enzimas individuais, assim como, novas propriedades e reatividade (LEVY *et al.*, 2003; MESTA *et al.*, 2001).

Algumas vezes, as enzimas quiméricas demonstram atividade superior, ou seja, elas alcançam um melhor desempenho do que a ação sucessiva de enzimas individuais (BÜLOW & MOSBACH, 1991; LEMOS *et al.*, 2003). Entretanto, a atividade específica das enzimas de fusão depende de como a fusão foi realizada, tais como a ordem de suas sequências e comprimento e composição da região conectora entre os módulos protéicos (VON OSSOWSKI *et al.*, 2005). Portanto, a criação de enzimas quiméricas depende do conhecimento detalhado da sequência e, se possível, da estrutura das enzimas nativas (NIXON *et al.*, 1998).

A maior desvantagem na construção de proteínas de fusão, é que elas são suscetíveis à proteólise, pois geralmente, a fusão acaba por interferir nas propriedades funcionais e estruturais das proteínas recombinantes. O enovelamento incorreto da proteína e a interação protéica inapropriada desestabilizam a estrutura e afetam a atividade dos domínios da enzima fusionada (BALBAS, 2001; HONG *et al.*, 2006).

As proteínas de fusão podem ser criadas por dois métodos, um chamado de *end-to-end* e o outro, chamado de insercional. Na fusão *end-to-end*, o N-terminal de um domínio é ligado ao C-terminal de outro (DOI & YANAGAWA, 1999). Este tipo de fusão mantém a função intacta de ambas as proteínas, porém, é essencial uma pequena sequência peptídica, chamada de *linker*, entre as proteínas individuais para reduzir a interferência do enovelamento uma sobre a outra, para que possam executar suas funções independentemente (CRASTRO & FENG, 2000). Na fusão insercional, um domínio é inserido em fase no meio de outro (DOI & YANAGAWA, 1999).

A eficiência enzimática para a degradação de biomassa lignocelulósica depende de muitos fatores, incluindo a estabilidade da enzima, temperatura, sinergia, atividade, composição do substrato, pH, pré-tratamento, entre outros (LYND *et al.*, 2002). Assim, são necessários métodos rápidos, confiáveis e reprodutíveis para avaliar e aperfeiçoar a conversão de açúcares em biocombustível (KIM *et al.*, 2010).

Estudos realizados demonstram que o uso de uma ou poucas celulasas para fins biotecnológicos é limitado e raramente apresenta um alto rendimento (HEINZELMAN *et al.*, 2009; JUNG *et al.*, 1993; ZHANG *et al.*, 2011a).

O aumento da sinergia para melhorar os processos industriais é cada vez mais necessário. A fusão de enzimas do complexo celulolítico e xilanolítico pode aumentar a capacidade da ação destas enzimas na degradação da celulose e hemicelulose (AN *et al.*, 2005; MORAIS *et al.*, 2010).

A necessidade de múltiplas enzimas para a despolimerização da lignocelulose é um dos grandes obstáculos econômicos para a bioconversão em etanol, pois a produção exige um grande número de enzimas, o que torna os custos altos. A possibilidade de aumentar a atividade hidrolítica e a redução no número de enzimas requeridas no processo de sacarificação da biomassa lignocelulósica pode reduzir bastante os custos efetivos para a produção do bioetanol. A engenharia de enzimas com múltiplos domínios capazes de catalisar duas ou mais reações viabilizam essa redução. Deste modo, a engenharia de proteínas permite criar enzimas multifuncionais que podem explorar a construção de enzimas únicas com especificidade para três ou mais substratos (FAN *et al.*, 2009b).

A atividade bifuncional de xilanase e celulase não é vantajosa para a indústria de papel porque é indesejável os efeitos da celulase sobre a qualidade do papel produzido, porém, esta bifuncionalidade pode ser de grande valor para outras aplicações, como a produção de bioetanol (KHANDEPARKER & NUMAN, 2008).

A habilidade de modificar as propriedades das proteínas permitirá expandir seu uso em biotecnologia, resultando em um importante papel das enzimas de fusão. Portanto, qualquer aplicação de enzimas quiméricas é uma estratégia promissora para a conversão enzimática eficiente da biomassa. Entretanto, é necessário que estas quimeras sejam extensivamente caracterizadas enzimaticamente e comparadas com suas parentais (FAN *et al.*, 2009b).

Alguns autores relataram suas experiências com enzimas quiméricas. Kim *et al.* (2010) construíram endoglucanases quiméricas adicionando ou excluindo seu domínio de ligação à celulose a cada região N ou C-terminal das enzimas estudadas para avaliar o seu papel na hidrólise da celulose em relação a substratos sólidos naturais e pré-tratados. Verificaram que a adição do domínio de ligação à celulose (CBD) geralmente aumenta a atividade sobre a celulose microcristalina (Avicel). Já An *et al.* (2005), desenharam uma enzima bifuncional

artificial xilanase-celulase de *Clostridium thermocellum* e de *Pectobacterium chrysanthemi* PY35, respectivamente, que demonstrou ótima atividade em pH 8,0 e na temperatura de 50 °C para a celulase e 70 °C para a xilanase. Von Ossowski *et al.* (2005) colocaram um *linker* longo e flexível entre uma celobiohidrolase e uma exoglucanase, extraíndo seus CBDs para distinguir entre as contribuições do *linker* e do CBD para a curva de dispersão, uma vez que, ambos contém aproximadamente o mesmo número de aminoácidos. Concluíram que as celulases em solução adquirem um conjunto de conformações com diferentes distâncias relativas entre dois domínios funcionais, resultantes da capacidade de seus *linkers* adotarem estruturas compactas e estendidas. Estas propriedades estruturais são provavelmente essenciais para a função do *linker* como uma mola entre os dois módulos funcionais. Portanto, uma enzima que contenha dois domínios pode ter mais de uma conformação, estática ou variável, o que pode interferir em sua atividade.

Vários outros pesquisadores construíram proteínas quiméricas por fusão de extremidades, utilizando xilanasas, endoglucanases, celobiohidrolases e β -glicosidases, combinando, extraíndo ou adicionando seus domínios de ligação e catalítico, e relataram suas avaliações e comparações com as enzimas co-expressas e independentemente expressas, mostrando bons resultados para as proteínas fusionadas (HEINZELMAN *et al.*, 2009, 2010; LANTZ *et al.*, 2010; MORAIS *et al.*, 2010).

Os estudos de enzimas quiméricas fornecem uma compreensão mais ampla de como a estrutura de uma enzima está relacionada à sua função e quais mudanças podem ser toleradas dentro de um caso particular, além da capacidade de projetar propriedades das proteínas e assim ampliar a utilização das mesmas em biotecnologia (NIXON *et al.*, 1998).

1.6 EGIII e Xyn3: as enzimas utilizadas no presente trabalho

Nesse trabalho, foi descrita a abordagem utilizada para construir uma fusão entre uma endoglucanase III (EGIII) e xilanase III (Xyn3) do fungo filamentoso *Trichoderma harzianum* cepa IOC-3844.

As celulases são classificadas em 13 famílias das glicosil-hidrolases de acordo com a similaridade das sequências de aminoácidos: GH 5, 6, 7, 8, 9, 12, 26, 44, 45, 48, 51, 61 e 74 (HENRISSAT & DAVIES, 2000). A EGIII pertence à família 12, por isso, também é conhecida como Cel12A. Enzimas que fazem parte desta família são caracterizadas por ter baixa massa molecular, um único domínio catalítico e ausência de um módulo de ligação à celulose (MACARRÓN *et al.*, 1993; NAKAZAWA *et al.*, 2009). Possuem uma estrutura compacta β -sanduíche curvada para criar um sítio de ligação à celulose (SULZENBACHER *et al.*, 1999). Esta arquitetura é baseada sobre um enovelamento compacto β -*jelly-roll*, que contém uma α -hélice e duas folhas- β consistindo de um total de 15 fitas- β (SANDGREN *et al.*, 2001). Okada *et al.* (2000), identificaram dois resíduos catalíticos, E116 e E200, para a

EGIII de *T. reesei*, esses resíduos encontram-se localizados na mesma posição na sequência de *T. harzianum*.

A EGIII de *T. harzianum*, depositada no banco de dados *GenBank* (número de acesso JQ923478), foi caracterizada em nosso laboratório por Generoso *et al.* (2012). Foi verificado que esta enzima possui 81% de identidade com a de *T. reesei*. A *ORF* possui 705 pb, codificando uma proteína com 235 aminoácidos. A enzima foi expressa em *Pichia pastoris* e apresentou massa molecular teórica de 24,6 kDa, com temperatura ótima de 48 °C e pH 5,5, além de características cinético-enzimáticas semelhantes àquelas encontradas na literatura para a EGIII de *T. reesei*.

As xilanases também são classificadas como glicosil-hidrolases nas famílias: GH 5, 7, 8, 10, 11 e 43, porém, a maioria delas se encontram nas famílias 10 e 11.

As xilanases da família 10 são caracterizadas por ter alta massa molecular e baixo *pI* (BEG *et al.*, 2001; CANTAREL *et al.*, 2009). A estrutura é em forma de tim barril, consistindo de oito α -hélices e oito folhas- β alternadas paralelamente, na qual o substrato se liga superficialmente (DODD & CANN, 2009; NATESH *et al.*, 1999). As enzimas da família 10 podem atacar tanto sítios próximos às ramificações da cadeia, quanto xilooligossacarídeos ligados a outras cadeias polissacarídicas, o que faz com que elas tenham maior versatilidade (BIELY *et al.*, 1993; ZHANG *et al.*, 2011a). A Xyn3 contém dois resíduos catalíticos, E176 e E282 (GENEROSO, 2012).

As xilanases que compõem a família 11, possuem baixa massa molecular, alto *pI* e uma estrutura em *jelly-roll*, formada de folhas- β antiparalelas em forma de barril com uma hélice perpendicular, dando à estrutura da enzima a aparência de uma mão semi-fechada. Nessa família, o grupo catalítico acomoda de cinco a sete resíduos xilopiranosídicos (DODD & CANN, 2009; SUBRAMANIYAN & PREMA, 2002).

A Xyn3 de *T. harzianum* foi caracterizada em nosso laboratório por Generoso (2012), que verificou que esta enzima possui 83% de identidade com a de *T. reesei*. A *ORF* possui 1044 pb, codificando uma proteína com 347 aminoácidos. A massa molecular é de aproximadamente 35 kDa, com temperatura ótima de 40 °C e pH 6,5.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O presente trabalho tem como objetivo a construção, expressão e caracterização bioquímica e cinética de uma enzima quimérica resultante da fusão gênica das enzimas EGIII e Xyn3 provenientes do fungo filamentosso *Trichoderma harzianum* cepa IOC- 3844.

2.2 Objetivos Específicos

- Fundir o cDNA que codifica a endoglucanase III de *T. harzianum* a um que codifica a xilanase III do mesmo fungo (já clonados em vetor para expressão em *Pichia pastoris*);
- Transformar a levedura *P. pastoris* com a construção realizada e isolar transformantes hiperprodutores da enzima quimérica;
- Selecionar os transformantes produtores e purificar a enzima;
- Caracterizar a enzima quimérica quanto às suas atividades catalíticas em relação ao seu pH, temperatura, termoestabilidade e estabelecer parâmetros cinéticos.

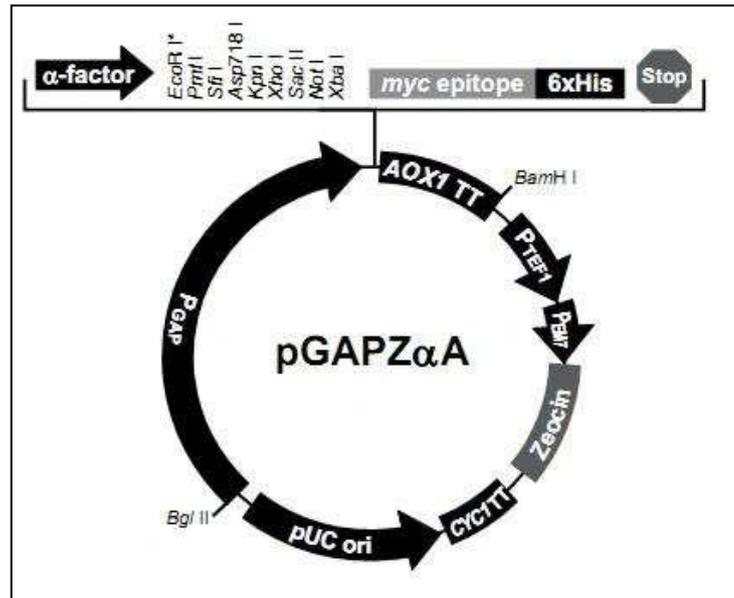
3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Clonagem e expressão da quimera ThEg3Xyn3

3.1.1 Clones usados na construção da quimera

As regiões codificadoras da EGIII e da Xyn3 foram obtidas de uma biblioteca de cDNA do fungo filamentoso *Trichoderma harzianum* cepa IOC-3844, disponível em nosso laboratório (MALAGÓ JR, 2012).

Os dois cDNAs foram clonados em vetor pGAPZ α A (Figura 5). O cDNA da EglIII foi clonado de forma a excluir a sequência codificadora do peptídeo sinal, utilizando dessa forma, o peptídeo sinal do plasmídeo (fator α) (GENEROSO et al., 2012). O cDNA da Xyn3 foi clonado mantendo seu peptídeo sinal nativo, excluindo-se o fator α . A produção recombinante e caracterização da Xyn3 foi tema do trabalho de mestrado do estudante Wesley Cardoso Generoso (GENEROSO, 2012).



```

481 TATTTGAAA CG ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA
    Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala

532 GCA TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG
    Ala Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr
    α-factor signal sequence

583 GCA CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT
    Ala Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp

634 TTC GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG
    Phe Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu

685 TTT ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA TCT
    Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser

736 CTC GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT GAATTCAC GTGGCCCA GCGGCCGTC TOGGATC
    Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala
    Xho I* Kex2 signal cleavage Ste13 signal cleavage EcoR I Pml I Sfi I

793 GGTACCTCGA GCGCGGCGG CCGCCAGCTT TCTA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG
    Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
    Asp718 I Kpn I Xho I Sac II Not I Xba I myc epitope
    Sal I polyhistidine tag

851 GAT CTG AAT AGC GCC GTC GAC CAT CAT CAT CAT CAT TGA GTTTTAGC CTTA
    Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His ***

905 GACATGACTG TTCCTCAGTT CAAGTTGGGC ACTTACGAGA AGACCGGTOT TGOTAGATTC TAAT
    3' AOX1 priming site

969 CAAGAGGATG TCAGAATGCC ATTTGCCTGA GAGATGCAGG CTTCAATTTT GATACTTTT TATT

1033 TGTAACCTAT ATAGTATAGG ATTTTTTTTG TCATTTTGT TCTTCTCG
  
```

* The Xho I site upstream of the Kex2 cleavage site is used to clone the gene of interest flush with the Kex2 cleavage site (see page 14).

Figura 5. Mapa do vetor de expressão pGAPZαA (Invitrogen) e sequência do sítio de clonagem múltipla (MCS). No mapa observa-se a região PGAP, referente ao promotor do gene GAPDH; AOX1 TT, que indica o terminador de transcrição do gene AOX1; Zeocin, o gene de resistência ao antibiótico zeocina; α-factor, sequência que permite a secreção da proteína; 6xHis, cauda de polihistidina. No MCS está indicado o início e fim da sequência sinal fator α, o sinal de clivagem Kex e as enzimas de restrição que podem ser usadas para a clonagem nesse vetor.

3.1.2 Construção do plasmídeo de expressão contendo a quimera

Para a construção da quimera ThEg3Xyn3, o plasmídeo pGAPZαA contendo o cDNA da enzima EGIII (denominado de pGAPEG3) foi usado como base para a fusão com o cDNA da Xyn3 na porção 3' do primeiro cDNA. O plasmídeo pGAPEG3 foi clivado com 10 U da enzima de restrição *SalI* (Fermentas), 1x do tampão Orange, 700 ng de DNA em uma reação de 30 µL. A reação foi incubada a 37 °C por 16 h. Restando 1 h para o término da reação de clivagem, 1U de *SAP* (USB) foi adicionada para evitar a ligação de ambas as extremidades clivadas com *SalI*. Após, a banda do DNA clivado foi purificada de gel de agarose 1%, utilizando o *Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System* (Promega).

A *ORF* da Xyn3, clonada em pGAPZαA, foi amplificada por PCR a partir da sequência de resíduos QASVSI, excluindo-se o seu peptídeo sinal e inserindo um *linker* na porção 5', composto de glicinas e serinas, com o objetivo de dar estabilidade à fusão.

A amplificação foi realizada utilizando os *primers* Xyn3fusFw, 5'-AAAGTCGACGGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGGTGGTAGTCAAGCCTCCGTGAGCAT-3' e ThXyn3_reverse, 5'-CCGTCGACTTGTA^{AAATGCTTACA}ACTG-3' (as sequências grifadas indicam o sítio da enzima de restrição *SalI* e a sequência em negrito indica o *linker* anterior ao início da sequência de Xyn3, que ficou localizado entre as duas proteínas fusionadas).

A amplificação foi realizada utilizando 50 ng de DNA plasmidial, 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen), 1x tampão da enzima, 2,5 mM de MgCl₂, 0,4 µM de cada *primer* e 1,25 U de taq DNA polimerase (Fermentas) em uma reação de 25 µL. O ciclo de reação utilizado foi de 94 °C por 5 min de desnaturação, seguido por 35 ciclos de 1 min a 94 °C de desnaturação, 1 min a 54 °C de hibridização e 1 min a 72 °C de alongação e uma etapa final de 7 min a 72 °C. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1% e purificados do gel utilizando o *Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System* (Promega).

O DNA purificado foi ligado ao vetor de propagação pTZ57R/T (*InstAclone PCR Cloning Kit* - Fermentas) (Anexo I), resultando no plasmídeo pTZXyn3. A ligação foi realizada usando a proporção 5:1 inserto/plasmídeo, juntamente com 3,75 U da T4 DNA ligase (Invitrogen) e 1x tampão da T4 DNA ligase, em um volume final de 20 µL. A reação ocorreu por 16 h a 4 °C e após este período, 20 µL de reação foram adicionados a 200 µL de células de *E. coli* quimiocompetentes TOP10 (Invitrogen). A transformação ocorreu por incubação da mistura por 90 s a 42 °C e 1 min em gelo, posteriormente adicionaram-se 800 µL de meio LB líquido (Invitrogen) e incubou-se por 50 min a 37 °C. Foram inoculados 50 µL desta ligação em placas de Petri contendo 15 mL de meio LB Ágar (Invitrogen) com 100 ug/mL do antibiótico Ampicilina (Gibco), 0,005% de X-gal (USB) e 0,66 mM de IPTG (Invitrogen). As placas foram incubadas por 16 h a 37 °C e as colônias brancas, com os possíveis recombinantes, foram crescidas em 5 mL de meio LB líquido, por 16 h a 37°C com

agitação de 250 rpm. Em seguida, foi efetuada a extração de DNA plasmidial utilizando o método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 2001).

O plasmídeo recombinante pTZXyn3 foi utilizado para obter o fragmento de DNA Xyn3 contendo o *linker* em sua porção N-terminal. O plasmídeo foi clivado com 10 U da enzima de restrição *Sall* (Fermentas), 1x do tampão Orange, 500 ng de DNA em uma reação de 30 µL. A reação foi incubada a 37 °C por 16 h. O pTZXyn3 clivado foi separado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e a banda referente à Xyn3 contendo o *linker* (936 pb) foi retirada do gel e purificada com o *Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System* (Promega).

O DNA purificado foi ligado à extremidade 3' do fragmento de EGIII do plasmídeo pGAPEG3 defosforilado, para isso, foi utilizado 1 x tampão da T4 DNA ligase, 3,75 U da T4 DNA ligase e a proporção 5:1 inserto/plasmídeo em um volume final de 20 µL. A reação ocorreu por 16 h a 4 °C e após este período, 20 µL de reação foram adicionados a 200 µL de células de *E. coli* quimiocompetentes TOP10 (Invitrogen). A transformação ocorreu por incubação da mistura por 90 s a 42 °C e 1 min em gelo, posteriormente adicionaram-se 800 µL de meio LB líquido (Invitrogen) e incubou-se por 50 min a 37 °C. Foram plaqueados 50 µL desta ligação em placas de Petri contendo 15 mL de meio LB Ágar *Low Salt* (Invitrogen) com 25 µg/mL do antibiótico Zeocina (Invitrogen). As placas foram incubadas por 16 h a 37 °C. O plasmídeo contendo a fusão de ambas as enzimas foi denominado pGAPEG3Xyn3.

Para a identificação dos transformantes, foi feita uma PCR de colônia usando um *primer* interno da Xyn3, XYLIII_Harz_Seq3Fw, (5'-GTGACGCCAGAGAATAGC-3') e o *primer* AOX3' (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3') do vetor pGAP. Esta combinação de *primers* foi usada para verificar a orientação em que o fragmento de Xyn3 juntamente com o *linker* havia se ligado ao pGAPEG3, que por possuir o mesmo sítio de restrição em ambas as extremidades, a porção 3' de Xyn3 poderia se ligar à porção 3' do fragmento de EGIII.

Uma pequena quantidade da colônia (pega com a ponta de um palito de dente) foi adicionada à mistura de reação de PCR contendo 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen), 1x tampão da enzima, 2,5 mM de MgCl₂, 0,4 µM de cada *primer* e 1,25 U de taq DNA polimerase (Fermentas) em uma reação de 25 µL. A ciclagem foi de 94 °C por 5 min de desnaturação, seguido por 35 ciclos de 1 min e 30 s a 94 °C de desnaturação, 1 min e 30 s a 53 °C de hibridização e 1 min e 30 s a 72 °C de alongação e uma etapa final de 7 min a 72 °C. Os produtos amplificados gerados pela PCR foram analisados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A extração do DNA plasmidial foi efetuada utilizando o método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 2001).

Um esquema geral da estratégia utilizada para a construção do plasmídeo pGAPEG3Xyn3 pode ser visto na figura 6. A figura 7 mostra uma representação linear do plasmídeo contruído, incluindo os resíduos de aminoácidos das junções.

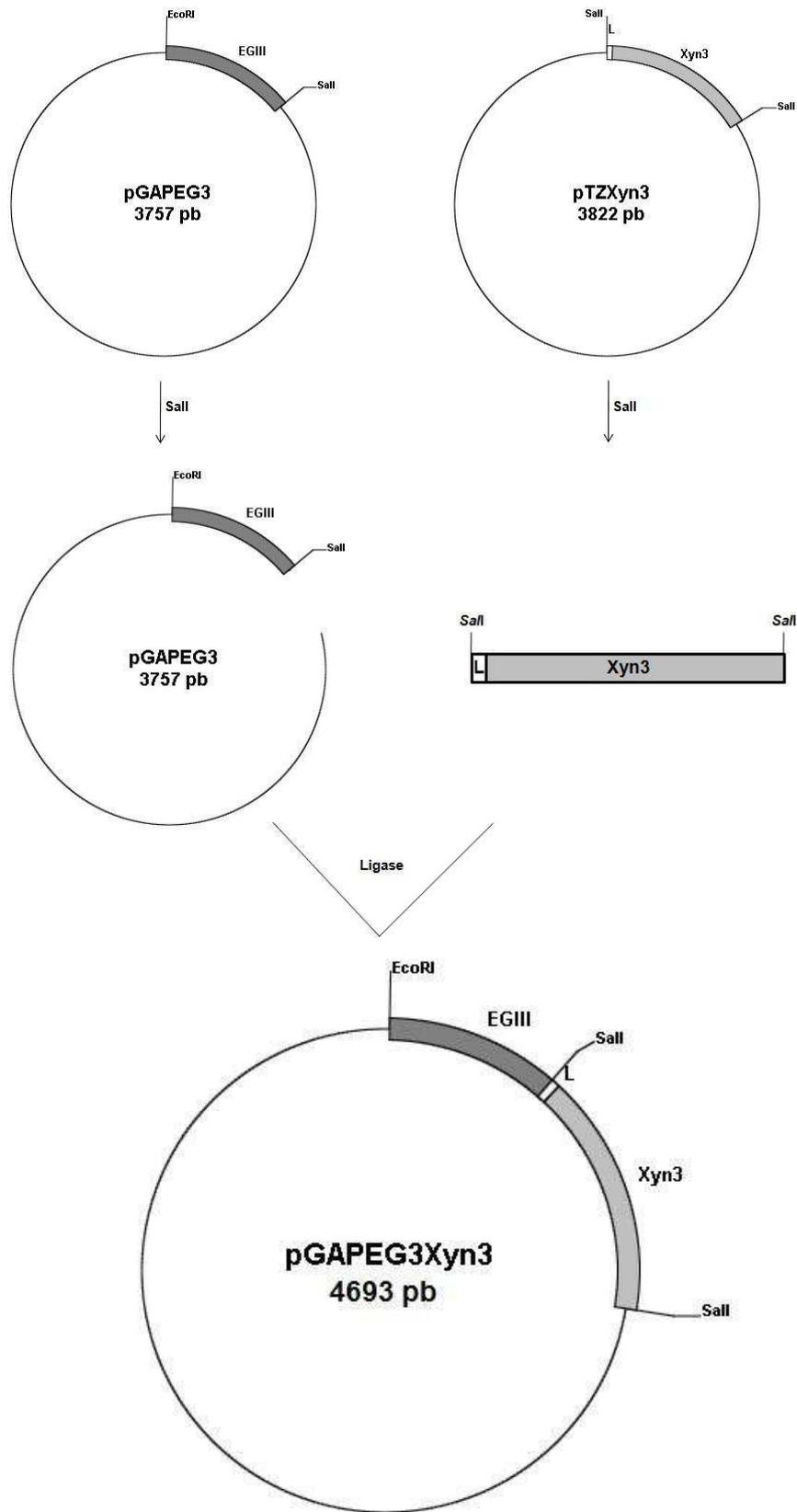


Figura 6. Esquema da fusão que resultou no plasmídeo pGAPEG3Xyn3. O plasmídeo pGAPEG3 foi clivado na região C-terminal de EGIII com a enzima *SalI*, em seguida, o plasmídeo pTZXyn3 foi clivado em ambas extremidades de Xyn3 com a mesma enzima. O N-terminal de Xyn3 foi ligado ao C-terminal de EGIII. Entre a fusão das duas enzimas, foi inserido um *linker* (L) para dar estabilidade à fusão.

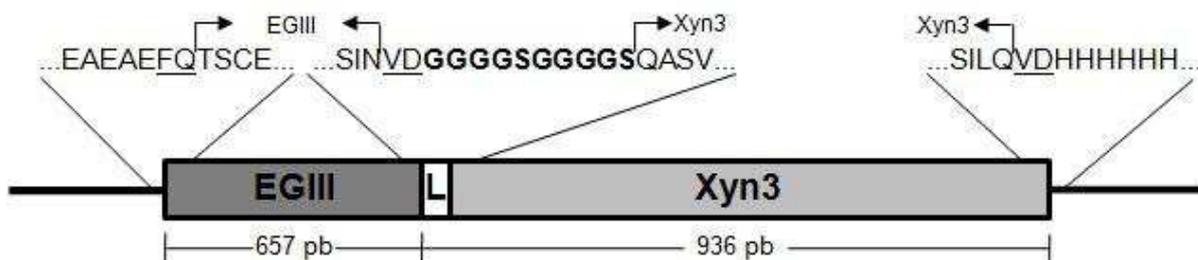


Figura 7. Esquema linear do plasmídeo pGAPEG3Xyn3. O plasmídeo em forma linear representa as junções e seus respectivos resíduos. As flechas indicam os resíduos de EGIII e Xyn3; em negrito estão indicados os resíduos do *linker* (L) e sublinhados os sítios de restrição das enzimas *EcoRI* e *SalI*.

O plasmídeo recombinante pGAPEG3Xyn3 foi identificado pela análise de restrição usando 150 ng de DNA, 1x tampão Orange, 5 U da enzima de restrição *EcoRI* e *SalI* em uma reação final de 10 μ L, por 3h a 37 °C. As enzimas *EcoRI* e *SalI* foram utilizadas para clivar as extremidades 5' e 3', respectivamente, do fragmento de EGIII. As extremidades 5' e 3' do fragmento de Xyn3 contendo o *linker* foram clivadas com a enzima *SalI*. Os produtos clivados foram analisados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Para uma confirmação efetiva do clone, o pGAPEG3Xyn3 foi sequenciado no sequenciador MegaBACE 1000 Flexyble, usando o kit *DYEnamic ET Dye Terminator* (GE Healthcare). Além dos *primers* fator α (5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3') e AOX3' (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3') usados para o sequenciamento das regiões 5' e 3', um *primer* interno, Xyn3fusRv (5'-ATGCTATTCTCTGGCGTCA-3'), foi usado para identificar a região da fusão entre as duas enzimas.

A sequência nucléica da ThEg3Xyn3 foi traduzida em sequência de aminoácidos usando o *software BioEdit Sequence Alignment Editor* (Hall, 1998), sendo também avaliada a massa molecular e a composição de aminoácidos. O pl teórico foi verificado utilizando o *software ProtParam* (GASTEIGER *et al.*, 2005). Após essas análises e confirmação da sequência correta da fusão, partiu-se para a transformação da levedura *Pichia pastoris*.

3.1.3 Transformação de *Pichia pastoris* e análise da expressão em pequena escala

Para a transformação da levedura *P. pastoris*, aproximadamente 2 μ g de DNA do plasmídeo pGAPEG3Xyn3, foram clivados com 15 U da enzima de restrição *XmaI* (Fermentas) utilizando o tampão Tango (1x) em um volume final de reação igual a 60 μ L, por 16 h a 37 °C.

O vetor linearizado foi precipitado adicionando-se 1/10 do volume de acetato de sódio 3M, pH 5,2 e 2,5 vezes o volume de etanol absoluto gelado, a mistura foi homogeneizada e incubada por 15 min a -80 °C. Após a centrifugação (16000 *g*, 10 min a 4 °C), o DNA

precipitado foi lavado com etanol 80%, mais uma vez centrifugado e o sobrenadante descartado, após secagem, ressuspendeu-se o DNA em 10 µL de água.

As células competentes de *Pichia pastoris* cepa KM71H foram produzidas de acordo com Cregg *et al.* (1993). Uma pequena quantidade de massa celular, pega com a ponta de um palito de dente, foi usada para inocular 5 mL de meio YEPD (1% de extrato de levedura - Himedia, 2% de peptona - Himedia, 2% de dextrose – Merck). O inóculo foi incubado por 8 h a 30 °C, 250 rpm. Passadas as 8 h, 50 µL desse inóculo foram utilizados para inocular 50 mL de meio YEPD, na mesma temperatura de incubação e rotação citadas anteriormente, até a densidade ótima a 600 nm igual a 1,0 a 1,5 (aproximadamente 16 h). A suspensão celular (25 mL) foi centrifugada a 1500 g por 5 min a 4° C e o sobrenadante descartado. Ressuspendeu-se as células em 5 mL de YEPD, juntamente com 1 mL de Hepes (JT Baker) 1M, pH 7,0 e 125 µL de DTT (USB) 1M, pH 5,2 e incubou-se por 15 min a 30 °C. Após, o volume da mistura foi completado com água gelada para 25 mL. A solução foi centrifugada nas mesmas condições e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspendidas em 12,5 mL de água gelada e novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado. Foi adicionado 1 mL de Sorbitol (JT Baker) 1M gelado e centrifugou-se, descartando-se o sobrenadante. As células foram ressuspendidas em 50 µL de Sorbitol 1M gelado e 40 µL foram aliquotados para a transformação.

Aproximadamente 1 µg do plasmídeo linearizado foi adicionado aos 40 µL de células competentes, que após homogeneização foram incubadas por 5 min em gelo. Após o tempo decorrido, as células foram eletroporadas em cubetas de 0,2 cm (BioRad) a 1,5 kV, 25 µF e 200 Ω. Adicionou-se às células 1 mL de Sorbitol 1 M (JT Baker) e incubou-se por 2 h a 28 °C, sem agitação. Posteriormente, os transformantes foram inoculados em meio YEPDS ágar (1% de extrato de levedura - Himedia, 2% de peptona - Himedia, 2% de dextrose - Merck, 2% de ágar - Himedia, 1 M de sorbitol – JT Baker), contendo 100 e 500 µg/mL do antibiótico Zeocina (Invitrogen). Após quatro dias de incubação, foram isoladas as colônias com os supostos recombinantes, os quais foram identificados por PCR.

Anteriormente à PCR, uma pequena quantidade de células isoladas (somente a ponta de um palito de dente) das colônias foi homogeneizada em 20 µL de uma solução de SDS 0,2% e fervida por 3 min, em seguida, a solução foi centrifugada em microcentrífuga por 30 seg à velocidade máxima. A PCR foi conduzida utilizando-se 1 µL da solução como molde de DNA, 1x tampão da enzima, 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 mM de dNTP, 1% de Triton X-100, 0,4 µM do *primer* XYLIII_Harz_Seq3Fw e do *primer* AOX3', 1,25 U de Taq DNA polimerase (Fermentas), em uma reação de 25 µL. O programa utilizado para amplificação foi: 3 min a 94 °C de desnaturação, seguido por 35 ciclos de 1 min a 94 °C de desnaturação, 1 min e 30 s a 53 °C de hibridização e 4 min a 72 °C de alongação e uma etapa final de 7 min a 72 °C.

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

As colônias recombinantes foram avaliadas quanto à produção da enzima ThEg3Xyn3 em um processo de indução de expressão em pequena escala, usando uma placa de cultura de 24 poços (Whatman). Dentre as colônias recombinantes, 23 foram selecionadas e inoculadas em 3 mL de meio YEPD tamponado com 100 mM de tampão fosfato de potássio, pH 6,0, a 30 °C e agitação de 250 rpm. Em um dos poços, foi inoculado o clone da Xyn3 como controle positivo. Seguindo intervalos de 24 h, foram retirados 100 µL do sobrenadante, até completar 96 h de indução. Cada um dos intervalos foi analisado em SDS-PAGE 12% (SAMBROOK *et al.*, 2001). O clone selecionado para a produção da enzima recombinante em escala maior foi o que apresentou maior produção de enzima em um menor intervalo de tempo.

3.1.4 Produção e purificação da enzima recombinante

Para a produção da ThEg3Xyn3 em maior escala, uma pequena quantidade de massa celular, pega com a ponta de um palito de dente, foi crescida em 10 mL de meio YEPD tamponado com 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,0 por 16h, a 30 °C sob agitação de 250 rpm. Posteriormente, foram utilizados 200 µL deste pré-inóculo para inocular 200 mL de meio YEPD tamponado com 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,0, por 48 h, a 30 °C, sob agitação de 250 rpm.

Após a indução, a cultura foi centrifugada a 20 °C por 5 min a 3000 g e o sobrenadante filtrado em membrana de nitrocelulose 0,45 µm (Millipore) e purificado por cromatografia de afinidade utilizando uma coluna carregada com 5 mL de resina *Ni-NTA Superflow* (Qiagen).

Anteriormente à purificação da enzima, a coluna foi equilibrada com 5 volumes de tampão de equilíbrio (10 mM de Tris, 50 mM de Na₂HPO₄ monohidratado, 100 mM de NaCl), em seguida, o sobrenadante foi passado pela coluna, e posteriormente, esta foi lavada com 3 volumes do mesmo tampão de equilíbrio, para retirar qualquer impureza que houvesse na coluna. A proteína foi eluída com concentrações de 50 mM e 250 mM de tampão de eluição contendo imidazol (10 mM de Tris, 50 mM de Na₂HPO₄ monohidratado, 100 mM de NaCl, 250 mM de imidazol). Cada uma das frações coletadas foi analisada em SDS-PAGE 12%.

A fração contendo a enzima eluída foi usada para a troca de tampão utilizando a coluna *HiTrapTM Desalting* (GE Healthcare). A coluna foi fixada no equipamento Akta (GE Healthcare) e equilibrada com 25 mL do tampão de eluição sem imidazol com fluxo de 5 mL/min. Em seguida, 1 mL da enzima foi injetada no aparelho e eluída da coluna com o mesmo tampão de equilíbrio, com fluxo igual a 1 mL/min. Os picos de eluição da proteína foram acompanhados pelo *software* do equipamento.

Após a troca de tampão, a enzima foi quantificada pelo *kit BCA Protein Assay* (Thermo Scientific).

3.2 Ensaios de atividade enzimática da ThEg3Xyn3

3.2.1 Análise de atividade hidrolítica da enzima por DNS

A análise de atividade hidrolítica utilizando DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) consiste na quantificação do conteúdo de açúcares redutores, ou seja, de extremidades reductoras resultantes pela ação da enzima (MILLER, 1959). Este método foi usado, com modificações, para a análise de açúcares redutores formados pela enzima ThEg3Xyn3.

A solução DNS foi preparada utilizando-se 32,9 mM de ácido 3,5-dinitrosalicílico, 350 mM de hidróxido de sódio, 76,6 mM de tartarato de sódio e potássio, 0,54% de fenol e 30 mM de metabissulfito de sódio dissolvidos em água.

A reação foi conduzida em microplacas de 96 poços em termociclador *Mastercycle Gradient* (Eppendorf). Para a reação, foram usados 45 µL de uma solução tamponada com 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,0 contendo 2% do substrato específico para cada uma das enzimas, CMC (Sigma) para EGIII e xilana *birchwood* (Sigma) para Xyn3. Esta solução foi pré-incubada por 10 min (para xilana) e 15 min (para CMC) a 37 °C antes de ser adicionada a enzima, posteriormente, 5 µL da enzima foram adicionados à solução e incubou-se por 15 min à mesma temperatura. Passados os 15 min, a reação foi interrompida adicionando-se 100 µL de DNS. A reação foi incubada por 5 min a 99°C. A amostra foi resfriada em gelo e foi realizada a leitura da absorbância a 540 nm.

Os açúcares redutores formados foram quantificados utilizando uma curva padrão para cada açúcar formado, glicose (Merk) no caso da EGIII e xilose (Vtec) no caso da Xyn3. A curva padrão foi construída a partir de concentrações crescentes de açúcar, variando de 0,1 g/L a 1 g/L, diluídos com o mesmo tampão da enzima. Todas as reações foram realizadas em triplicatas, tendo como controle branco a reação sem enzima, substituída por seu tampão.

Os ensaios realizados para determinação de pH, temperatura e termoestabilidade foram padronizados utilizando-se 2% de substrato específico para cada uma das enzimas, sendo usado 0,133 µM de enzima em 50 µL de volume final de reação quando o substrato era CMC, para verificar a atividade de EGIII e 0,250 µM de enzima quando o substrato utilizado era xilana, para verificar a atividade de Xyn3. Para a determinação dos parâmetros cinéticos, variou-se a concentração de substrato e a concentração de enzima usada foi de 0,5 µM e 0,4 µM para xilana e CMC, respectivamente.

Os dados obtidos a cada ensaio foram inseridos em gráficos considerando a média e desvio padrão e avaliados por análise estatística. Um intervalo de confiança maior ou igual a

95% foi considerado. Todas as análises foram realizadas pelo *software* estatístico *Prism 5* (GraphPad Prism).

3.2.2 Determinação do efeito da temperatura e do pH sobre a quimera

Para a determinação do efeito de temperatura e pH sobre a ThEg3Xyn3 diferentes faixas de temperatura e pH foram testadas a partir de reações padronizadas.

Primeiramente, foi estabelecida o efeito da temperatura sobre a ThEg3Xyn3 usando como substrato xilana *birchwood*, ou seja, avaliando-se a temperatura quanto à atividade de Xyn3. Para isso, a reação foi estabelecida usando uma solução de 2% de xilana tamponada como 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 6,0, incubando-se a reação por 10 min. A atividade da enzima foi avaliada variando-se a temperatura de 19,9 °C a 49,8 °C. As temperaturas analisadas foram: 19,9; 22,8; 27,8; 30,7; 33,4; 36,0; 38,2; 39,9; 43,4; 46,0 e 49,8 °C. Para o estabelecimento da temperatura ótima usando como substrato CMC, ou seja, avaliando-se a temperatura ótima quanto à atividade de EGIII, a reação foi estabelecida nas mesmas condições que a de xilana, entretanto, houve algumas modificações em relação ao tempo de incubação da reação, que foi de 15 min e em relação às temperaturas analisadas, que foram: 19,9; 22,8; 25,1; 30,6; 33,4; 36,0; 38,2; 39,9; 40,7; 48,2; 49,8 e 50,8 °C.

Depois de estabelecida a temperatura ótima da enzima, foi determinado o efeito do pH sobre a quimera. Assim como feito para a temperatura, a análise de pH foi verificada para cada um dos substratos específicos para cada enzima. A solução contendo 2% de xilana *birchwood* foi tamponada variando-se o pH de 4,0 a 9,5. Foram utilizadas as seguintes soluções tamponantes: 100 mM de tampão citrato de sódio pH 4,0; 100 mM de tampão acetato de sódio pH 4,5, 5,0 e 5,5; 100 mM de tampão fosfato de sódio pH 6 e 6,5; 100 mM de tampão Tris-HCl pH 7,0, 7,5, 8,0 e 8,5 e 100 mM de tampão glicina-hidróxido de sódio pH 9,0 e 9,5. A solução contendo 2% de CMC foi tamponada variando-se o pH de 3,0 a 8,5. Foram utilizadas as seguintes soluções tamponantes: 100 mM de tampão citrato de sódio pH 3,0, 3,5 e 4,0; 100 mM de tampão acetato de sódio pH 4,5, 5,0 e 5,5; 100 mM de tampão fosfato de sódio pH 6 e 6,5 e 100 mM de tampão Tris-HCl pH 7,0, 7,5, 8,0 e 8,5.

3.2.3 Determinação da termoestabilidade

Para avaliar a termoestabilidade da ThEg3Xyn3, a mesma foi pré-incubada por 1 h na ausência de substrato nas seguintes temperaturas: 0, 10, 20, 30, 35, 40, 45, 50 e 55 °C. Após este período, a enzima foi adicionada à reação padronizada sob condições ótimas de temperatura e pH previamente estabelecidas.

3.2.4 Determinação dos parâmetros cinéticos enzimáticos

Os parâmetros cinéticos K_m e k_{cat} foram determinados para os dois substratos, xilana e CMC.

As curvas de velocidade inicial foram realizadas em triplicatas para cada um dos substratos específicos (solução contendo 2% de substrato juntamente com 100 mM de tampão fosfato de sódio pH 6,0) e a concentração de enzima usada foi de 0,5 μ M e 0,4 μ M para xilana e CMC, respectivamente, em um volume final de reação de 50 μ L. Foram realizadas 10 reações, incubadas a 38 °C, sendo cada uma delas interrompidas com 100 μ L de DNS a cada 3 min, em um tempo total de 30 min. Após analisar as curvas, foi determinado o tempo de reação para cada substrato, sendo de 10 min para xilana e 15 min para CMC.

A reação foi realizada sob condições ótimas de temperatura e pH da enzima já previamente estabelecidas. A atividade hidrolítica foi analisada variando-se a concentração de substrato.

Para xilana, as concentrações usadas foram: 0,06%; 0,12%; 0,24%; 0,48%; 0,72%; 1,2%; 1,68% e 2,16%. Antes de adicionar a enzima, o substrato foi pré-incubado em sua temperatura ótima por 10 minutos, após a enzima ser adicionada, a reação foi conduzida por 10 minutos de incubação.

Para CMC, as concentrações usadas foram: 0,12%; 0,24%; 0,48%; 0,72%; 1,2%; 1,68%; 2,16%; 2,88 e 3,12%. O substrato foi pré-incubado por 10 minutos, após a adição da enzima, a reação foi conduzida por 15 minutos de incubação em sua temperatura ótima.

Os valores de absorbância foram convertidos em quantidade de produtos gerados e os dados foram inseridos em uma curva não-linear de Michaelis-Menten.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização e análise do plasmídeo de fusão pGAPEG3Xyn3

Além do nosso laboratório já possuir o plasmídeo pGAPEG3, que facilitou a construção da fusão, outro motivo que levou ao uso deste vetor foi o fato dele possuir o promotor do gene GAP, que codifica a proteína GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase). Este vetor permite a expressão constitutiva das proteínas recombinantes quando as células crescem em glicose, glicerol, metanol ou ácido oléico e demonstram expressar proteínas em altos níveis dependendo da fonte de carbono utilizada (WATERHAM *et al.*, 1997). O vetor pGAPZ α A produz proteínas fusionadas a um sinal de secreção denominado fator α , pertencente à levedura *Saccharomyces cerevisiae*, o qual permite a perfeita secreção das proteínas a ele fusionadas. As ampliações dos fragmentos de cDNA para construção dos plasmídeos foram então realizadas utilizando oligonucleotídeos excluindo as sequências codificadoras dos peptídeos sinais nativos.

A estratégia estabelecida para a construção do plasmídeo pGAPEG3Xyn3 (Figuras 6 e 7) foi bem sucedida e possibilitou a construção de uma proteína de fusão cujas sequências de nucleotídeos e de aminoácidos são mostradas na figura 8.

A fusão gênica de EGIII e Xyn3 foi realizada ligando-se o N-terminal de Xyn3 ao C-terminal de EGIII e entre elas foi adicionado um *linker* de 10 resíduos, composto por glicinas e serinas para proporcionar maior estabilidade à fusão.

A sequência total codificadora de ThEg3Xyn3, na construção, possui 1896 pb, considerando a sequência do peptídeo sinal (fator α) do vetor pGAPZ α A e outros resíduos adicionados na construção. A sequência codificadora referente à proteína madura, ou seja, aquela já sem o peptídeo sinal, possui 1629 pb, considerando os sítios das enzimas de restrição usadas para a clonagem, o *linker* e a cauda de histidinas (657 pb do fragmento de EGIII; 936 pb do fragmento de Xyn3 juntamente com o *linker*, 18 pb dos sítios de restrição e 18 pb da cauda de histinas). A proteína de fusão secretada, sem o peptídeo sinal e com a sequência de histidinas, contém 543 resíduos de aminoácidos, massa molecular teórica de 59150,47 Daltons e pI igual a 6,67.

1 ATGAGATTTCTTCA ATTTTTACTGCTGTT TTATTTCGAGCATCC TCCGCATTAGCTGCT CCAGTCAACACTACA
 M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T
 76 ACAGAAGATGAAACG GCACAAATTCCGGCT GAAGCTGTCATCGGT TACTCAGATTTAGAA GGGGATTTTCGATGTT
 T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D V
 151 GCTGTTTTGCCATTT TCCAACAGCACAAAT AACGGGTATTGTTT ATAAATACTACTATT GCCAGCATTGCTGCT
 A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A A
 226 AAAGAAGAAGGGGTA TCTCTCGAGAAAAGA GAGGCTGAAGCTGAA TTCCAGACCAGCTGC GAACAGTATGCAGTG
 K E E G V S L E K R E A E A  E F Q T S C E Q Y A V
 301 TTCTCTGGTGGCAAT GGCTATTCAGTCAGC AACAACTCTGCGGG CAATCTGCCGGTAGT GGCTTCGGCTGCATC
 F S G G N G Y S V S N N L W G Q S A G S G F G C I
 376 ACCGTAACTCACTC AACTCGGCTGCTTCC TGGCATGCAGACTGG CAGTGGTCTGGTGGC CAAAACAACGTC AAG
 T V N S L N S A A S W H A D W Q W S G G Q N N V K
 451 TCCTATCCCAATGTC CAAATCGCCATTCCC CAAAAGAGAATTGTC AACAGTATCGGCAGC ATGCCGACCACTGCT
 S Y P N V Q I A I P Q K R I V N S I G S M P T T A
 526 AGCTGGAGCTACAG GGGAGCAACCTTCGC GCCGATGTAGCTTAT GATCTCTTCACTGCG TCAAATCCCAACCAT
 S W S Y T G S N L R A D V A Y D L F T A S N P N H
 601 GTCACTTATTCTGGG GATTACGAGCTCATG ATCTGGCTGGCAAGA TACGGAGACATTGGC CCCATCGGATCTGCT
 V T Y S G D Y E L M I W L A R Y G D I G P I G S A
 676 CAGGGCACGGTGACC ATCAATGGTCAGAGC TGGACGCTCTACTAT GGCTTCAACGGAGCC ATGCAAGTCTATAGC
 Q G T V T I N G Q S W T L Y Y G F N G A M Q V Y S
 751 TTTGTGGCCCCAGT ACTGTCACCAATTGG AGTGGAGATGTGAAG AACTTCTTCAACTAT CTACGAGACAACAAA
 F V A P S T V T N W S G D V K N F F N Y L R D N K
 826 GGATACCCAGCATCA AGCCAATATGTCCTC AGTTACCAATTGGT ACTGAGCCTTTTACA GGCAGTGGGACGCTG
 G Y P A S S Q Y V L S Y Q F G T E P F T G S G T L
 901 AACGTAAATTCCTGG ACCGCATCTATCAAC GTCGACGGTGGTGGT GGTTCTGGTGGTGGT GGTTCTGGTGGTGGT
 N V N S W T A S I N V D G G G G S G G G G S Q A S
 976 GTGAGCATTGATCAG CTCTTCAAAGGAAA GGCAAAGTTTATTTT GGAAGTCAACTGAC CGTGGCTTACTCCAA
 V S I D Q L F K R K G K V Y F G T A T D R G L L Q
 1051 CGAGAACGAAATGCA GCCATTATCCAGGCT AATCTTGGACAAGTG ACGCCAGAGAATAGC ATGAAATGGCAGTCA
 R E R N A A I I Q A N L G Q V T P E N S M K W Q S
 1126 CTTGAGCCTAACCAA GGCCAGTATAATTGG GGAGATGCAGATTAC CTTGTAACTTCGCC CAACAAAACGGCAAG
 L E P N Q G Q Y N W G D A D Y L V N F A Q Q N G K
 1201 ACGATACGTGGACAT ACTCTGATTTGGCAC TCACAACCTAATAAT TGGGTCAATAACATC AATAATGCAGATACT
 T I R G H T L I W H S Q L P N W V N N I N N A D T
 1276 TTGCGCCAGGCTATC CGTACTCATGTTCTC ACTGTTGTTGGAAGA TATAAAGGAAAGATT CGCGCTTGGGATGTA
 L R Q A I R T H V L T V V G R Y K G K I R A W D V
 1351 GTAAACGAGATCTTC AACGAGGATGGAACA CTACGCTCTTCTGTG TTTTCTAGACTGCTA GGCGAAGAGTTTGTG
 V N E I F N E D G T L R S S V F S R L L G E E F V
 1426 TCGATTGCTTTCCGT GCTGCTCGAGAAGCT GATCCGCTGCTGCTG CTCTACATCAACGAT TACAATCTCGATGTT
 S I A F R A A R E A D P S A R L Y I N D Y N L D V
 1501 GCCGGGTCTAGTAAA GTCAACTTGATGAGA TACTATGTGGATAAAA TGGATCTCTCAAGGA GTTCCCATTGACGGC
 A G S S K V N L M R Y Y V D K W I S Q G V P I D G
 1576 ATCGGAACCTCAAACC CACATCGGTGCTGGA GGAGGTGCCTCTGTA CAAGGTGCACTTCCAG CAGCTAGCTACAGCA
 I G T Q T H I G A G G G A S V Q G A L Q Q L A T A
 1651 CCAGTCACTGAATTG GCCATTACTGA^{*}ACTT GACATCGTGGGCGCA CCGTCGAACGATTAC AGCGCAGTTGTTTGA
 P V T E L A I T E L D I V G A P S N D Y S A V V R
 1726 GGATGTTTTGAACGTT CCTAAGTGCTTGGGG ATCAGTGTGTGGGGT ATTAGCGCAAAGAC TCGTGGCGTTCAGGC
 G C L N V P K C L G I T V W G I S D K D S W R S G
 1801 TCCAGTCCCCTTCTA TTCGACAGCAACTTC AATCCTAAAGCAGCT TACAACAGTATTGTA AGCATTTTACAAGTC
 S S P L L F D S N F N P K A A Y N S I V S I L Q V
 1876 GACCATCATCATCAT CATCAT
 D H H H H H H

Figura 8. Sequências nucléica e de aminoácidos da ThEg3Xyn3. A região referente à EGIII encontra-se destacada em cinza (com os resíduos E e F no N-terminal, oriundos do pGAPZαA), seguida da região referente à Xyn3. A cabeça de flecha indica o final da sequência do peptídeo sinal (fator α) oriundo do vetor pGAPZαA. Sublinhadas duplamente encontram-se as sequências das enzimas de restrição *EcoRI* e *SalI*. Os asteriscos indicam os resíduos catalíticos das enzimas EGIII e Xyn3; sublinhados encontram-se o *linker* e a cauda de histidinas.

Pelo fato da clivagem do fragmento Xyn3 (com o *linker*) ter sido realizada com uma única enzima (*SalI*), foi necessário verificar quais transformantes haviam recebido o fragmento na orientação correta, ou seja, com o 5' de Xyn3 ligado corretamente à porção 3' de EGIII. Para tanto, uma PCR de colônia foi realizada usando um *primer* interno *forward* da Xyn3 e o *primer* AOX3' do vetor. Após a PCR, os fragmentos com amplificação positiva (banda de 908 pb) puderam ser identificados em gel de agarose, confirmando os plasmídeos que continham o fragmento na orientação correta.

Antes da transformação em levedura, os possíveis plasmídeos recombinantes pGAPEG3Xyn3 foram clivados com as enzimas *EcoRI* e *SalI* para a confirmação da fusão. Após a clivagem com as duas enzimas, foram verificadas as bandas: de aproximadamente 660 pb, referente à EGIII; de aproximadamente 940 pb, referente à Xyn3 e de aproximadamente 3000 pb, referente ao vetor pGAPZαA. A figura 9 mostra foto do gel de agarose com os produtos clivados.

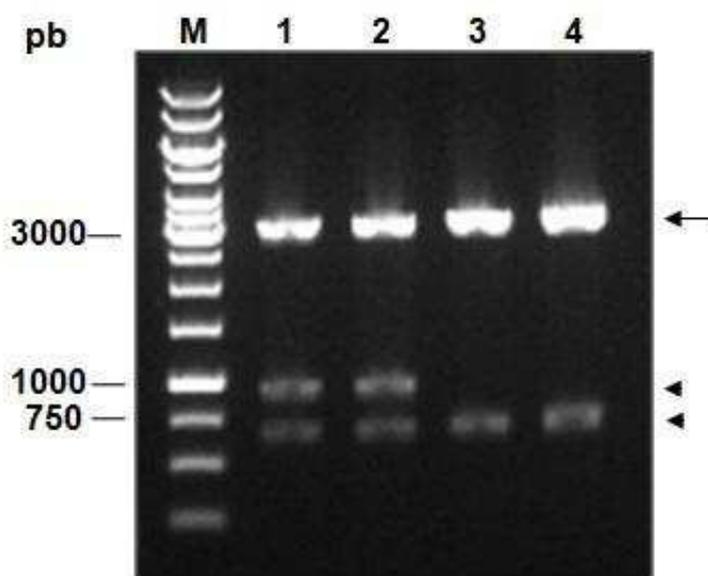


Figura 9. Análise da clivagem dos plasmídeos recombinantes pGAPEG3Xyn3. Os produtos resultantes da clivagem do plasmídeo pGAPEG3Xyn3 com as enzimas *EcoRI* e *SalI* foram separados em gel de agarose 1% por eletroforese. M: marcador de massa molecular GeneRuler 1kB (Fermentas); 1-2: plasmídeos recombinantes da ThEg3Xyn3, 3-4: plasmídeo contendo somente a EGIII. A seta indica as bandas de aproximadamente 3000 pb, referentes ao vetor pGAPZαA; as cabeças de setas indicam, respectivamente, as bandas de aproximadamente 940 pb, resultado da clivagem de Xyn3 pela enzima *SalI* e as de aproximadamente 660 pb, resultado da clivagem de EGIII pelas enzimas *EcoRI* e *SalI*.

4.2 Expressão e purificação da quimera ThEg3Xyn3

Para expressar a ThEg3Xyn3 foi utilizado o sistema de expressão heteróloga da levedura *Pichia pastoris*. Este sistema possui as características necessárias para a produção deste tipo de enzimas, pois alia as vantagens do sistema de expressão de

procariotos, pela sua facilidade e de eucariotos, pela possibilidade de modificações pós-traducionais e processamento do peptídeo sinal (CREGG *et al.*, 1993; CREGG *et al.*, 2000). Além disso, a *P. pastoris* tem a vantagem de secretar a proteína recombinante praticamente pura para o meio de cultura, pelo fato de secretar baixa produção de suas proteínas nativas, facilitando a posterior purificação e às vezes, até mesmo dispensando o passo de purificação da enzima, o que seria uma vantagem para uso industrial (CEREGHINO & CREGG, 2000). A purificação da ThEg3Xyn3 foi necessária para a realização dos ensaios de caracterização da enzima.

A cepa de *Pichia pastoris* KM71H foi utilizada como hospedeira para transformação com os plasmídeos recombinantes linearizados. Uma PCR de colônia, usando os mesmo *primers* para a análise de orientação da Xyn3, foi conduzida para verificar as colônias recombinantes na levedura. Uma banda de aproximadamente 900 pb foi observada no gel de agarose, confirmando a recombinação. A figura 10 representa o gel de agarose com os produtos amplificados.

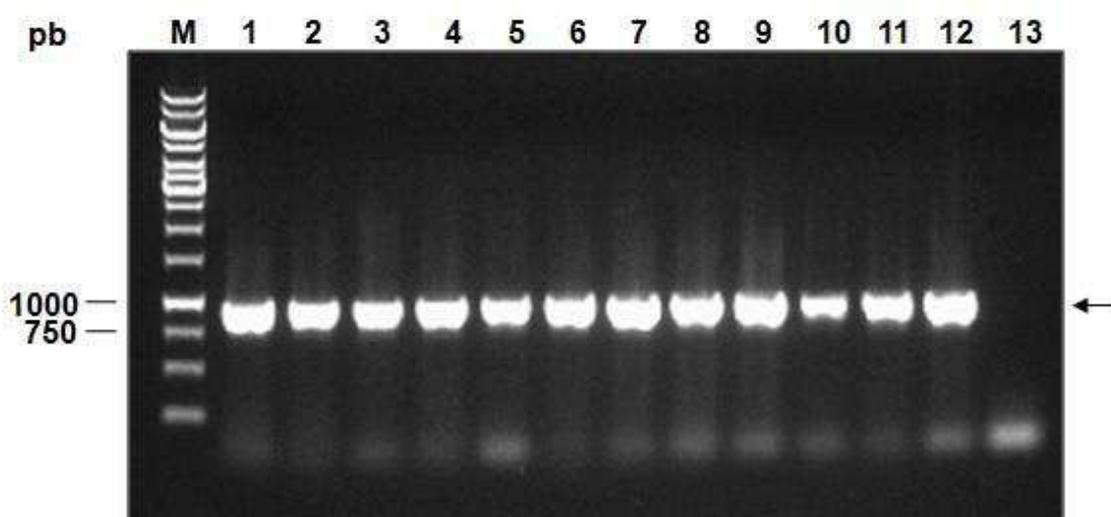


Figura 10. Identificação de transformantes de *Pichia pastoris* com o plasmídeo pGAPEG3Xyn3. A amplificação de um fragmento de 908 pb utilizando um *primer* interno da Xyn3 e o *primer* AOX3' do vetor indicam que a levedura foi transformada. Gel de agarose 1% por eletroforese, mostrando em M: marcador de massa molecular GeneRuler 1kB (Fermentas); 1-12: colônias recombinantes de ThEg3Xyn3; 13: controle negativo da PCR. A seta indica a banda amplificada de aproximadamente 900 pb.

Após identificar vários transformantes, 23 colônias recombinantes foram utilizadas para uma análise da expressão em pequena escala, em busca de clones com boa expressão da proteína de fusão. Essa análise foi feita em placas de 24 poços contando 3 mL de meio, como descrito em métodos. Um destes poços foi usado para o controle positivo da expressão usando a Xyn3, já caracterizada em nosso laboratório. A indução foi realizada em meio YEPD tamponado (pH 6,0) por 48 h. Apenas uma colônia das vinte e três

selecionadas para a análise não expressou a proteína, e duas colônias demonstraram melhor desempenho de expressão, uma foi escolhida para a expressão em maior escala e purificação. Observa-se na figura 11 as bandas de expressão da ThEg3Xyn3 em SDS-PAGE 12% com massa molecular próxima a 59 kDa, como esperado.

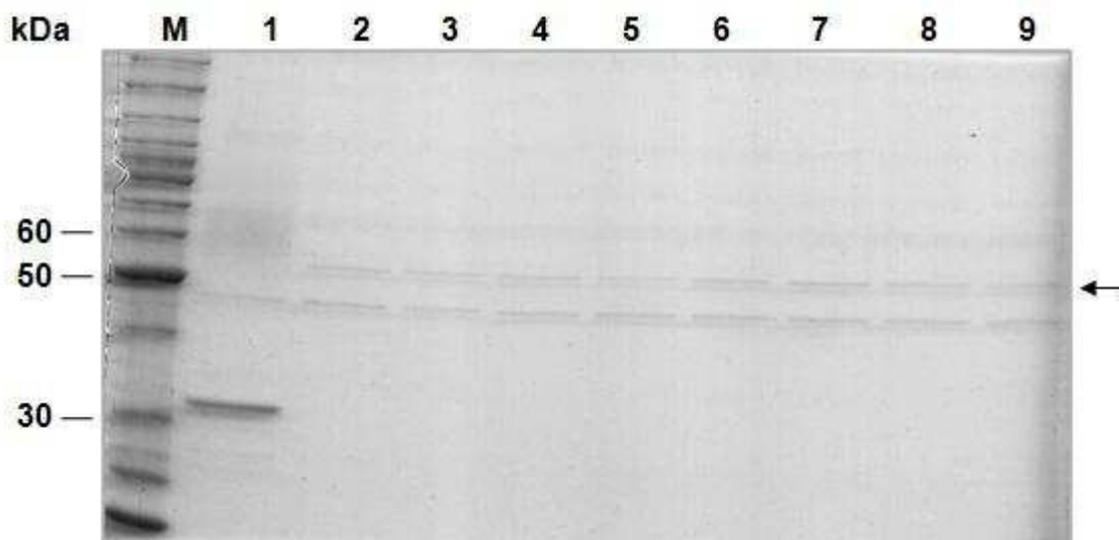


Figura 11. Análise em pequena escala da expressão de ThEg3Xyn3 em transformantes de *Pichia pastoris*. SDS-PAGE 12% mostrando em M: marcador de massa molecular Bench Mark (Invitrogen); 1: controle positivo (Xyn3); 2-9: colônias recombinantes expressando a ThEg3Xyn3. A seta indica a banda de expressão, de aproximadamente 59 kDa da ThEg3Xyn3, como esperado.

A colônia escolhida como sendo a que melhor expressava a enzima foi usada para a indução em 200 mL de meio YEPD tamponado (pH 6,0), nas mesmas condições em que foi realizada a indução em pequena escala.

Após 48 h de indução, o processo de purificação da enzima foi realizado em coluna de afinidade com Ni^{+2} . Na figura 12 podem ser observadas as frações com diferentes concentrações de imidazol usadas para a eluição da proteína. Pode-se notar que a maior parte da proteína foi eluída quando usada a concentração de 250 mM de imidazol. O rendimento total da enzima quimérica recombinante purificada foi de 7,5 mg/L de meio de cultura YEPD tamponado. Foi verificado também que quando o meio de indução não era tamponado, ficando próximo ao pH 5,0, a enzima não se aderiu bem à resina de níquel. Generoso (2012) observou o mesmo fato durante a purificação da Xyn3.

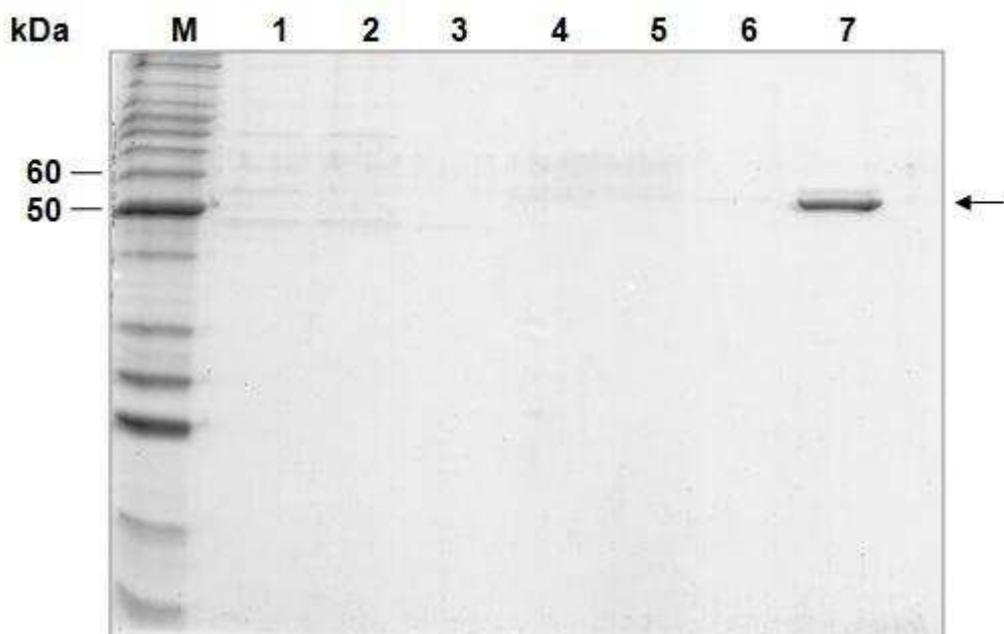


Figura 12. Análise da purificação de ThEg3Xyn3. Foram analisadas cada uma das frações contendo diferentes concentrações de imidazol. SDS-PAGE 12% mostrando em M: marcador de massa molecular Bench Mark (Invitrogen); 1: sobrenadante da ThEg3Xyn3 induzida por 48h; 2: eluato; 3: lavagem; 4-5: frações coletadas contendo 50 mM de imidazol; 6-7: frações coletadas contendo 250 mM de imidazol. A seta indica uma banda próxima a 60 kDa, referente à enzima quimérica, que possui massa molecular igual a 59 kDa.

4.3 Análise do efeito da temperatura e do pH e termoestabilidade

Ensaio bioquímicos para verificar a atividade da ThEg3Xyn3 e de suas parentais foram realizados usando DNS. Os primeiros ensaios não foram realizados de forma padronizada, portanto, foram utilizadas concentrações de substratos e enzima somente para verificar se a mesma possuía atividade para dois substratos diferentes, CMC e xilana.

Após verificar que a enzima quimérica estava ativa, os ensaios foram realizados seguindo as concentrações de enzima e substrato usados por Generoso *et al.* (2012) e Generoso (2012) para manter os mesmos padrões em que foram realizados os ensaios das enzimas parentais e assim poder compará-los sem que houvesse qualquer modificação na metodologia.

A temperatura ótima exibida pela ThEg3Xyn3 foi de 38,2 °C tanto para CMC quanto para xilana, ou seja, a mesma temperatura ótima para ambas as enzimas, como mostra a figura 13. A temperatura ótima de EGIII encontrada por Generoso *et al.* (2012), foi de 48,2 °C. Já a temperatura ótima de Xyn3, também caracterizada por Generoso (2012), foi de 40,7 °C.

De acordo com a literatura, são poucas as enzimas de fusão que mantêm a mesma temperatura ótima para ambas as enzimas fusionadas. Resultados semelhantes à ThEg3Xyn3 foram encontrados por Adlakha *et al.* (2011) e Sun *et al.* (2011).

Adlakha *et al.* (2011), isolaram uma endoglucanase e uma xilanase de uma bactéria presente no intestino do inseto *Helicoverpa armigera* (lagarta do algodão). Após as análises bioquímicas das enzimas, verificaram que ambas possuíam a mesma temperatura ótima (50 °C) e pH ótimo (7,0), e que estas características eram desejáveis para uma quimera. Construíram quatro fusões: 1) celulase-xilanase; 2) xilanase-celulase; 3) celulase-xilanase separadas por um *linker* e 4) xilanase-celulase separadas por um *linker*. Foram avaliadas as propriedades estruturais e funcionais de todas as fusões. Verificaram que o modelo 3 possuía a mesma temperatura ótima (50 °C) tanto para atividade celulolítica quanto xilanolítica, assim como suas parentais. O modelo 3 era a fusão que tinha as propriedades estruturais secundárias mais parecidas com as parentais. Portanto, parece que quanto menos afetada e modificada são as estruturas das enzimas em uma fusão, menor é a possibilidade de se variar suas características em relação às parentais.

Sun *et al.* (2011) fusionaram uma β -glucanase de *Bacillus amyloliquefaciens* com a mesma enzima de *Clostridium thermocellum*, e encontraram a temperatura ótima igual a 70 °C para a enzima de fusão, quando as parentais apresentavam temperaturas ótimas diferentes, sendo de 50 °C para a β -glucanase de *Bacillus amylolique-faciens* e 70 °C para a de *Clostridium thermocellum*. Os autores supõem que as variações de atividade de enzimas de fusão são provavelmente atribuídas a um enovelamento imprevisível de cada proteína, além disso, interações entre os módulos das enzimas de fusão poderiam resultar em diferenças em função ou eficiência entre a fusão e as enzimas parentais.

Portanto, a temperatura ótima de 38 °C encontrada para a quimera é desejável para o processo SSF, já que é muito próxima à temperatura de 37 °C usada na fermentação.

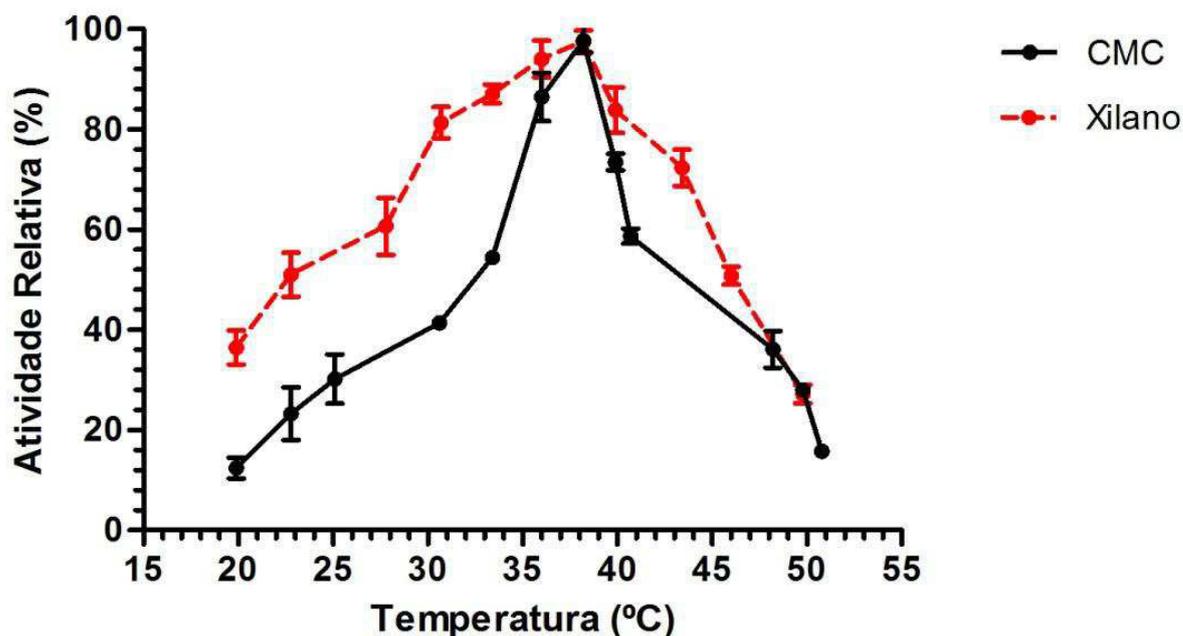


Figura 13. Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática da ThEg3Xyn3. Os valores encontrados no eixo das abscissas são referentes à temperatura e os encontrados no eixo das ordenadas são referentes à atividade relativa apresentada. O CMC foi usado como substrato específico para EGIII e a xilana para Xyn3. A maior atividade é considerada como sendo 100%. A temperatura ótima encontrada para ambas as enzimas foi igual a 38,2 °C.

O pH ótimo encontrado para a quimera ThEg3Xyn3 também foi o mesmo para as duas atividades, estimado em 6,0, como pode ser verificado na figura 14. No trabalho de Generoso *et al.* (2012), o pH ótimo encontrado para a EGIII foi igual a 5,5, enquanto o de Xyn3 foi de 6,5. Outros trabalhos também demonstram encontrar o mesmo pH ótimo para a atividade de ambas as enzimas usadas para a fusão.

As fusões realizadas por Adlakha *et al.* (2011) e Sun *et al.* (2011), já citados anteriormente, assim como para temperatura ótima, também exibiram o mesmo pH ótimo para a atividade de ambas as enzimas usadas na fusão. Adlakha *et al.* (2011) encontraram para a sua fusão o pH ótimo igual a 6,0, o mesmo que foi encontrado para suas enzimas parentais. Sun *et al.* (2011), verificaram um pH ótimo igual a 6,0, enquanto suas parentais apresentaram como pHs ótimos 5,0 (β -glucanase de *Bacillus amylolique-faciens*) e 8,0 (β -glucanase de *Clostridium thermocellum*).

Lu *et al.* (2006) e Lu & Feng (2008) sintetizaram uma enzima quimérica composta por uma β -glucanase de *Bacillus amyloliquefaciens* e uma xilanase de *Bacillus subtilis*, que exibiu um pH ótimo igual a 9,0, o mesmo foi encontrado para as suas parentais.

Outra fusão que demonstrou ter o mesmo pH ótimo para ambas as enzimas usadas na fusão foi a de An *et al.* (2005). Foram construídas três fusões usando uma xilanase de *Clostridium thermocellum* com uma celulase de *Pectobacterium chrysanthemi*. Em cada uma

das fusões, um módulo da xilanase foi retirado. Na primeira construção não foi retirado nenhum módulo; na segunda foi retirado o domínio *S-layer-like* e no terceiro, só foi mantido o CD. As três fusões demonstraram ter o mesmo pH ótimo, igual a 8,0, entretanto, no trabalho não são citados os pHs ótimos das enzimas parentais.

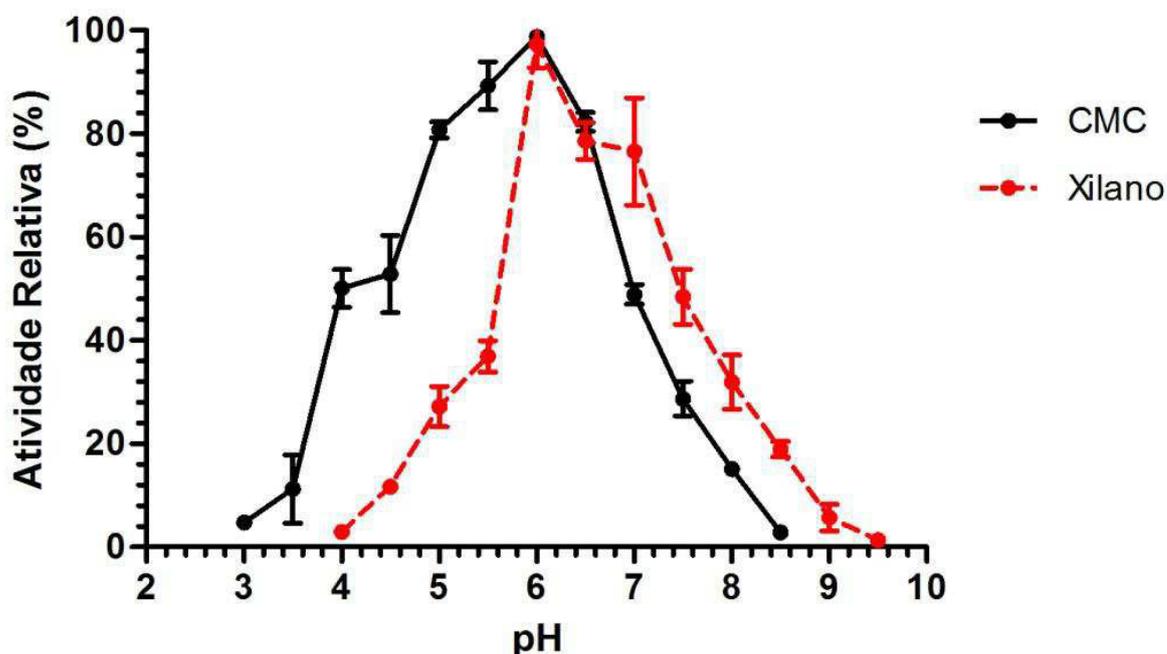


Figura 14. Efeito do pH sobre a atividade enzimática da ThEg3Xyn3. Os valores encontrados no eixo das abscissas são referentes ao pH e os encontrados no eixo das ordenadas são referentes à atividade relativa apresentada. O CMC foi usado como substrato específico para EGIII e a xilana para Xyn3. A maior atividade é considerada como sendo 100%. O pH ótimo encontrado para ambas as enzimas foi igual a 6,0.

Segundo Seo *et al.* (2000), as variações encontradas em relação à atividade de enzimas quiméricas podem ser imprevisíveis e atribuídas ao envelhecimento de cada enzima da quimera.

Pouco é conhecido sobre as enzimas de fusão e apesar de muitas tentativas, a caracterização de ambas as unidades ainda é complicada, isso porque as interações entre as enzimas em uma quimera resultam em diferenças na função ou eficiência quando comparadas com as parentais (Lu *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2011). Além disso, mudanças de pH e temperatura ótima em quimeras em relação às parentais, podem ser atribuídas pela mudança de pH no microambiente criado ou pela estrutura terciária (Bulow, 1987).

Ainda para caracterizar bioquimicamente a enzima quimérica ThEg3Xyn3, foi realizado o ensaio de termoestabilidade. A enzima permaneceu estável até a temperatura de 30 °C usando como substrato CMC e xilana, como ilustra a figura 15. Generoso *et al.* (2012) e

Generoso (2012) caracterizou a EGIII e a Xyn3 quanto às suas estabilidades térmicas e verificou que foram estáveis a 40 °C e 35 °C, respectivamente.

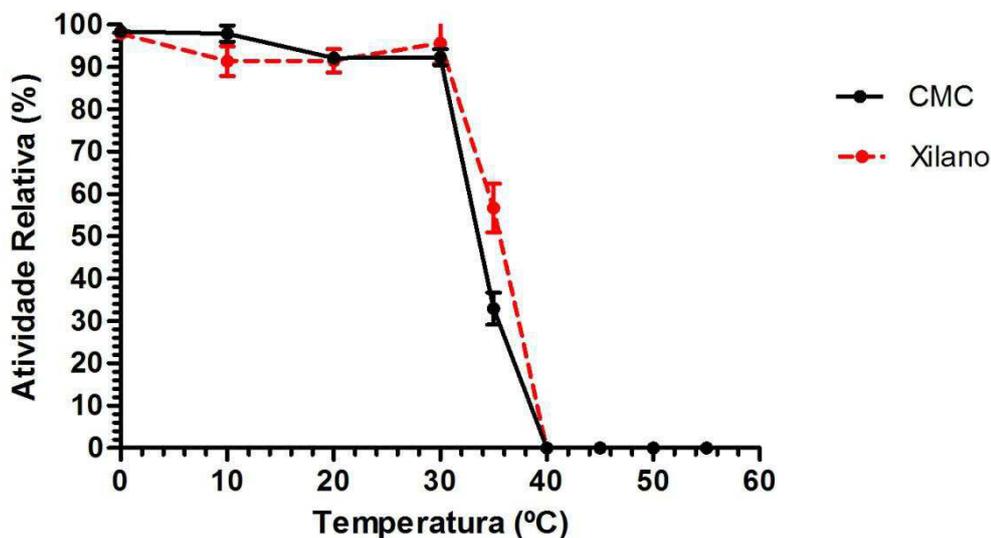


Figura 15. Determinação da termoestabilidade da ThEg3Xyn3. Após 1h de pré-incubação da enzima, foi verificada a estabilidade térmica da quimera. Os valores encontrados no eixo das abscissas são referentes à temperatura e os encontrados no eixo das ordenadas são referentes à atividade relativa apresentada. O CMC foi usado como substrato específico para EGIII e a xilana para Xyn3. A maior atividade é considerada como sendo 100%. A quimera permaneceu estável até 30 °C.

Apesar dos valores ótimos de temperatura, pH e estabilidade para a atividade de ThEg3Xyn3 serem diferentes dos que foram encontrados para suas parentais EGIII e Xyn3, eles são considerados desejáveis para a produção de bioetanol. A temperatura ótima de 38 °C e o pH ótimo igual a 6,0, para as duas atividades, se mostra eficiente principalmente para o processo SSF, em que a sacarificação é realizada juntamente com a fermentação. De acordo com Olofsson *et al.* (2008), enzimas com temperatura ótima próxima a 37 °C e pH próximo a 5,0 são mais apropriadas para a produção de etanol de segunda geração pelo processo de SSF.

4.4 Caracterização cinética da ThEg3Xyn3

Para a caracterização cinética de ThEg3Xyn3, foram utilizados novamente os substratos específicos para cada uma das enzimas, sendo CMC para determinar a atividade de endoglucanase e xilana para a de xilanase.

A curva de Michaelis-Menten foi realizada para a fusão, assim como, para as enzimas parentais e comparadas em um mesmo gráfico.

A concentração de substrato usada para as análises foi semelhante e a concentração molar de enzima foi igual tanto para a fusão quanto para as enzimas isoladas, ou seja, para a atividade celulolítica foi usada a concentração de 0,4 μM da quimera ThEg3Xyn3 e a

mesma concentração de EGIII, para a qual já havia sido estabelecidos os parâmetros cinéticos por Generoso *et al.* (2012). Para verificar a atividade xilanolítica, foi usada a concentração de 0,5 μM da quimera ThEg3Xyn3 e a mesma concentração de Xyn3, para a qual também já havia sido estabelecidos os parâmetros cinéticos realizados por Generoso (2012).

Os valores obtidos para a análise cinética da ThEg3Xyn3 usando como substrato xilana, relacionados à atividade xilanolítica da quimera, podem ser verificados na figura 16. O valor de K_m foi igual a 3,21 g/L e o de k_{cat} igual a 347,4 min^{-1} , com eficiência de 108,2 $\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. A análise cinética da Xyn3 parental também foi realizada nas mesmas condições ótimas que as encontradas para a ThEg3Xyn3. Neste caso, a Xyn3 se mostrou menos ativa do que a quimera, pois seu K_m foi igual a 2,55 g/L e k_{cat} igual a 184,3 min^{-1} . A eficiência de ThEg3Xyn3 foi uma vez e meia maior do que a de Xyn3.

A ThEg3Xyn3 também foi comparada com a Xyn3 parental em suas condições ótimas. O valor do K_m encontrado para a Xyn3 por Generoso (2012) foi de 6,12 g/L, quase duas vezes maior que o da enzima quimérica, e o valor do k_{cat} encontrado para a Xyn3 foi de 678 min^{-1} , também quase duas vezes maior que o encontrado para a atividade xilanolítica da quimera. Portanto, a eficiência catalítica da xilanase na quimera é bastante semelhante à mesma de forma isolada, pois a eficiência da ThEg3Xyn3 foi de 108,2 $\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ e a da Xyn3 caracterizada por Generoso (2012) foi igual a 110,8 $\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. Desta forma, pode-se notar que a quimera manteve os parâmetros cinéticos relacionados à atividade xilanolítica mesmo estando em fusão com outra enzima, o que se mostra vantajoso. Também foi analisada a possível atividade de endoglucanase usando xilana, no entanto, não foi verificada qualquer atividade de EGIII sobre este substrato, o que prova que a atividade analisada foi somente da Xyn3.

Os valores de temperatura e pH ótimos, assim como os parâmetros cinéticos das enzimas ThEgXyn3, Xyn3 nas mesmas condições ótimas da quimera e de Xyn3 em suas condições ótimas, estão representados na tabela 1.

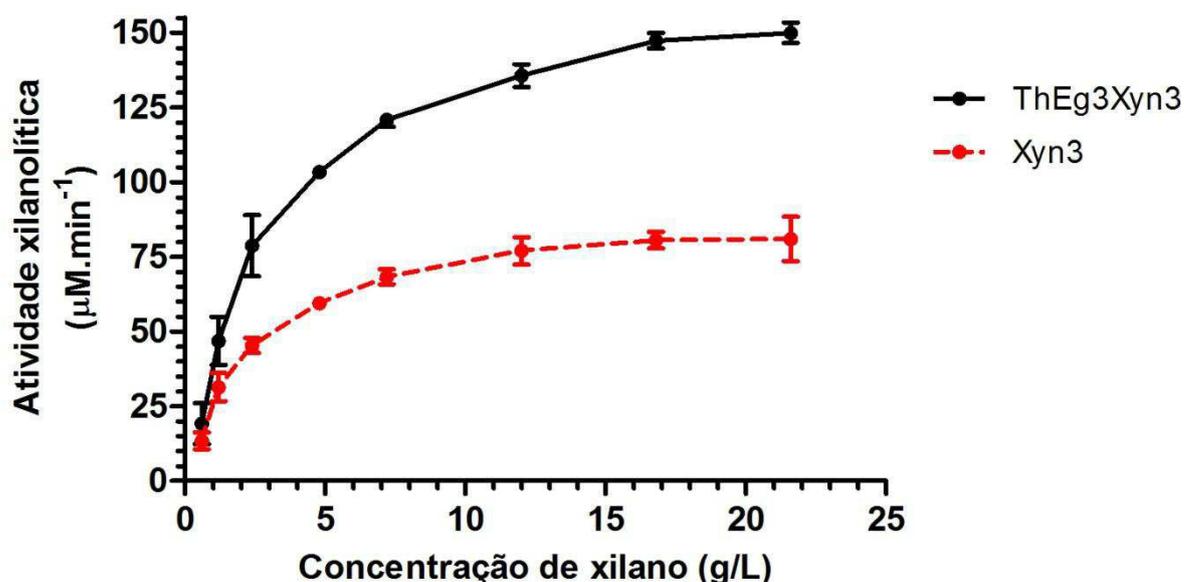


Figura 16. Caracterização cinética da atividade xilanolítica da enzima quimérica ThEg3Xyn3. A curva de Michaelis-Menten foi obtida pela velocidade da reação, encontrada no eixo das ordenadas e da concentração crescente de xilano *birchwood*, encontrada no eixo das abscissas. No gráfico, a curva em preto representa a atividade cinética de ThEg3Xyn3; enquanto a curva em vermelho representa a atividade cinética da Xyn3 nas mesmas condições ótimas da quimera.

Tabela 1. Temperatura ótima, pH ótimo e parâmetros cinéticos da atividade xilanolítica da enzima quimérica ThEg3Xyn3 comparados ao de Xyn3. Na tabela podem ser observados os valores encontrados de temperatura ótima, pH ótimo e os parâmetros cinético-enzimáticos tanto para a quimera ThEg3Xyn3, quanto para a Xyn3. Observe que há dois valores para Xyn3, a Xyn3 sem asterisco representa a enzima parental nas mesmas condições encontradas para a quimera, já a Xyn3 juntamente com um asterisco, apresenta os valores da enzima em suas condições ótimas.

Enzima	Temperatura (°C)	pH	K_m (g/L)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_m (L·g ⁻¹ ·min ⁻¹)
ThEg3Xyn3	38,2	6,0	3,21±0,22	347,4±7,3	108,2
Xyn3	38,2	6,0	2,55±0,2	184,3±3,97	72,3
Xyn3*	40,7	6,5	6,12±0,6	678±20,6	110,8

A análise cinética da ThEg3Xyn3 usando como substrato CMC, foi realizada para obter os parâmetros cinético-enzimáticos relacionados à atividade de endoglucanase. Os dados obtidos podem ser verificados na figura 17. O valor de K_m foi igual a 1,26 g/L e o de k_{cat} igual a 14,11 min⁻¹, com eficiência catalítica igual a 11,2 L·g⁻¹·min⁻¹. A cinética da EGIII parental também foi analisada nas mesmas condições ótimas encontradas para a ThEg3Xyn3. Neste caso, a EGIII se mostrou menos ativa do que a quimera, apresentando um K_m de 7,31 g/L, aproximadamente seis vezes maior que o da quimera, enquanto que o k_{cat} foi igual a 41,75 min⁻¹, praticamente três vezes maior que o de ThEg3Xyn3. Esta maior afinidade da enzima quimérica pelo substrato faz com que ela seja quase duas vezes mais ativa que a EGIII. Portanto, sob as condições ótimas encontradas para a enzima quimérica,

as quais se mostram satisfatórias para a produção de bioetanol por SSF, a fusão ThEg3Xyn3 se mostra vantajosa para uso comercial em relação à EGIII.

A possível atividade de xilanase foi verificada sobre o substrato CMC e nenhuma atividade foi observada, o que certifica que os valores obtidos são específicos para endoglucanase.

A comparação da ThEg3Xyn3 com a EGIII parental em suas condições ótimas também foi realizada. O valor de K_m encontrado por Generoso *et al.* (2012) para a EGIII foi de 21,35 g/L, dezessete vezes maior que o da enzima quimérica, enquanto o valor de k_{cat} foi igual a 1880 min^{-1} , aproximadamente cento e trinta vezes maior que o de ThEg3Xyn3. A eficiência catalítica de EGIII encontrada por Generoso *et al.* (2012) foi de 88,06 $\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, enquanto que a de ThEg3Xyn3 foi aproximadamente oito vezes menor, igual a 11,2 $\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. Os valores de temperatura e pH ótimos, assim como os parâmetros cinéticos das enzimas ThEg3Xyn3, EGIII nas mesmas condições ótimas da quimera e de EGIII em suas condições ótimas, estão representados na tabela 2.

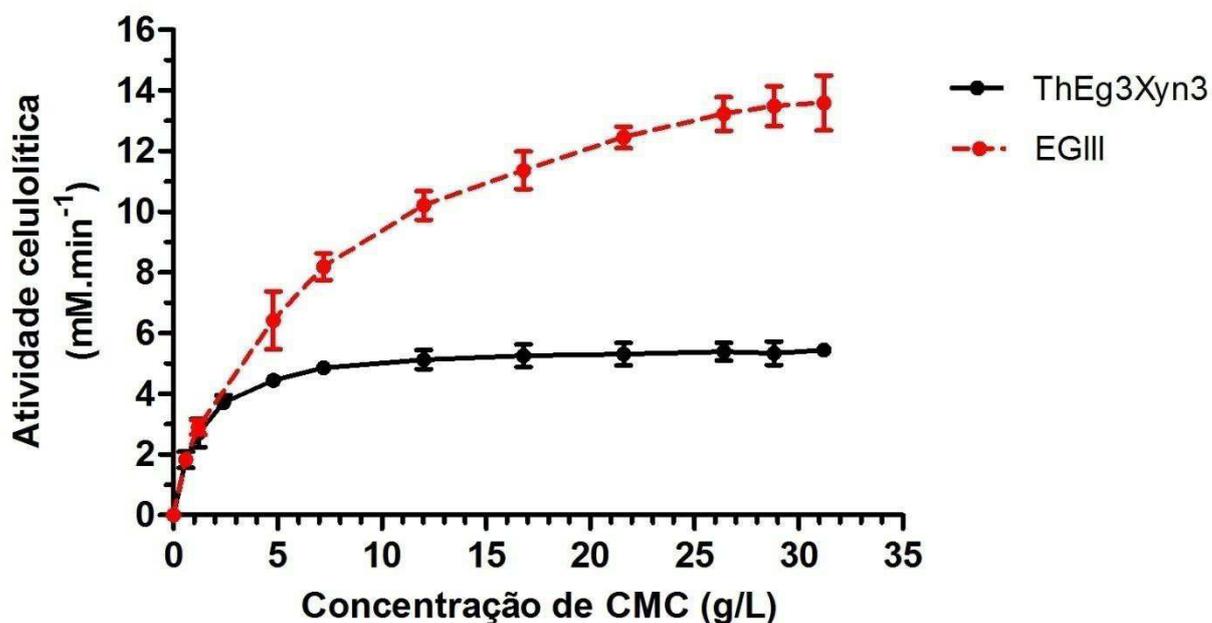


Figura 17. Caracterização cinética da atividade celulolítica da enzima quimérica ThEg3Xyn3. A curva de Michaelis-Menten foi obtida pela velocidade da reação, encontrada no eixo das ordenadas e da concentração crescente de CMC, encontrada no eixo das abscissas. No gráfico, a curva em preto representa a atividade cinética de ThEg3Xyn3; enquanto a curva em vermelho representa a atividade cinética da EGIII nas mesmas condições ótimas da quimera.

Tabela 2. Temperatura ótima, pH ótimo e parâmetros cinéticos da atividade celulolítica da enzima quimérica ThEg3Xyn3 comparados ao de EGIII. Na tabela podem ser observados os valores encontrados de temperatura ótima, pH ótimo e os parâmetros cinético-enzimáticos tanto para a quimera ThEg3Xyn3, quanto para a EGIII. Observe que há dois valores para EGIII, a EGIII sem asterisco representa a enzima parental nas mesmas condições encontradas para a quimera, já a EGIII juntamente com um asterisco, apresenta os valores da enzima em suas condições ótimas.

Enzima	Temperatura (°C)	pH	K_m (g/L)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_m (L·g ⁻¹ ·min ⁻¹)
ThEg3Xyn3	38,2	6,0	1,26 ± 0,16	14,11 ± 0,31	11,2
EGIII	38,2	6,0	7,31 ± 0,94	41,75 ± 1,65	5,7
EGIII*	48,2	5,5	21,35 ± 1,87	1880 ± 82	88,06

Geralmente, uma enzima de fusão construída com duas unidades enzimáticas pode apresentar pelo menos um dos três comportamentos a seguir: 1) maior eficiência de ambas as enzimas; 2) menor eficiência de ambas ou 3) aumento da eficiência de uma enzima e queda da outra (LU *et al.*, 2006). Pelas características encontradas na ThEg3Xyn3, ela possui um comportamento diferente dos três supracitados, pois uma das enzimas manteve a atividade de sua parental, enquanto a outra teve uma queda.

A fusão de duas ou mais enzimas deve ter várias vantagens sobre as enzimas individuais em relação à reação cinética e produção, bem como novas propriedades e reatividade por catalisarem ao mesmo tempo uma reação sequencial, porém, nem sempre isso é possível.

Segundo Balbas (2001), Hong *et al.* (2006) e Nixon *et al.* (1998), clivagem, enovelamento incorreto e interação inapropriada da proteína com o substrato e mesmo entre as proteínas, estão entre os fatores que desestabilizam a estrutura protéica e afetam as atividades dos domínios fusionados. Fan *et al.* (2009a), afirmam que é difícil criar enzimas de fusão que possuam a eficiência catalítica equivalente àquela atingida pela combinação das enzimas parentais.

Alguns trabalhos demonstram que as atividades específicas das enzimas dependem de como a fusão foi construída, tais como a ordem sequencial das enzimas e comprimento da região conectora.

Hong *et al.* (2006) relataram que a fusão *end-to-end* realizada por eles de uma celulase com uma xilanase, ambas de *Thermotoga marítima*, exibiu atividade quando a xilanase era fusionada após a celulase, porém, quando a fusão era realizada de forma inversa, a fusão não exibia atividade celulolítica. O mesmo foi encontrado por Hong *et al.* (2007), que verificaram atividade de ambas enzimas quando β -glicosidase era fusionada após uma celulase, porém, não havia atividade quando a β -glicosidase era fusionada anteriormente à celulase.

An *et al.* (2005) fez várias fusões combinando celulase-xilanase de *Pectobacterium* e *Clostridium*, respectivamente. As enzimas eram ativas quando a celulase era fusionada após a xilanase, mas não quando contrário. Também observaram que havia diferenças na atividade quando as unidades eram fusionadas inteiras e quando somente parte delas era fusionada, pois quando uma curta sequência da xilanase foi usada para a fusão, uma menor atividade foi encontrada, concluindo que a estrutura primária das enzimas usadas para a fusão são importantes para que a proteína quimérica seja ativa.

Nos trabalhos citados acima, os autores sugerem que o enovelamento incorreto do módulo catalítico ou interações desfavoráveis entre as enzimas, desestabilizam o complexo protéico e afetam a estrutura quaternária da fusão.

Para a quimera ThEg3Xyn3, não foi construída uma fusão de forma inversa à atual, o que poderia gerar um resultado diferente do obtido. Generoso (2012) realizou uma modelagem estrutural da Xyn3 e os resultados indicaram que a sua extremidade C-terminal se encontra internalizada na proteína, o que talvez dificultasse uma fusão nessa região, a qual poderia inclusive levar a uma desestabilização da estrutura da xilanase. Por esse motivo, foi escolhida a fusão da xilanase na porção C-terminal da EGIII, a qual, de acordo com estudos estruturais realizados por grupos colaboradores de nosso laboratório, se encontra livre.

Um resultado semelhante ao de ThEg3Xyn3 foi relatado por Lu *et al.* (2006), que realizaram a fusão de uma β -glucanase e uma xilanase de *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis*, respectivamente. Eles verificaram um aumento da atividade de β -glucanase

e um decréscimo na atividade da xilanase. Um resultado parecido também foi encontrado por Aÿ *et al.* (1998), na enzima quimérica β -glucanase-xilanase de *Bacillus macerans* e *Bacillus subtilis*, respectivamente. A atividade de β -glucanase foi semelhante à parental, mas a atividade encontrada para xilanase foi menor. Ambos os trabalhos atribuem a queda de atividade ao enovelamento incorreto adquirido na fusão. Já Lee *et al.* (2011), construíram seis fusões de uma β -glicosidase de *Clostridium cellulovorans* com três diferentes celulases (duas endoglucanases e uma exoglucanase) de *Clostridium thermocellum*. Todas as fusões demonstraram ter a mesma atividade do que suas parentais.

Outro aspecto importante a ser considerado em fusões é o *linker*. Estudos demonstram que um *linker* apropriado deve ser inserido entre as enzimas individuais para reduzir a interferência no enovelamento de cada uma das unidades, e assim, elas funcionarem independentemente. A seleção correta dos *linkers* é importante para se ter certo grau de flexibilidade e hidrofobicidade (CRASTO & FENG, 2000; GUSTAVSSON *et al.*, 2001; VOLKEL *et al.* 2001). De acordo com Gokhale & Khosla (2000), muitas propriedades são requeridas para um *linker* adequado, como o número de resíduos, possíveis glicosilações, extensão da glicosilação e composição de aminoácidos. A análise de cada uma delas, com a ajuda de *softwares* específicos para estes fins, como o *I-TASSER Server* (ZHANG, 2008), pode auxiliar na obtenção de um *linker* adequado à fusão.

A ThEg3Xyn3 possui um *linker* de 10 resíduos, que é considerado curto, podendo fazer com que haja uma interferência de Xyn3 na atividade de EGIII por estarem relativamente próximas. Gustavsson *et al.* (2001) realizaram seis fusões usando o CBD de Cel6A de *Neocallimastix patriciarum* e a lipase B de *Candida antarctica*, variando o comprimento de seus *linkers* (baseado no de Cel6A de *T. reesei*), que continham de 4 a 44 resíduos, somente três variantes foram estáveis. Verificaram que a capacidade de ligação à celulose das fusões que continham *linkers* curtos (de 4-13 resíduos) era ligeiramente inferior do que as que continham *linker* longo. Porém, notaram que os *linkers* longos eram mais propícios a clivagens. Sabe-se que, *linkers* longos devem resultar em baixa produtividade da quimera ativa, pois regiões desprotegidas e flexíveis são suscetíveis à clivagem proteolítica durante a produção recombinante. Já os *linkers* curtos podem superar os problemas associados com degradação por proteases, por outro lado, há o risco de permitir a ligação das unidades por estarem muito próximas e assim resultar na perda de função.

Lu & Feng (2008), caracterizaram oito fusões (β -glucanase-xilanase de *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis*, respectivamente), com variações de *linkers*, somente algumas se mostraram ativas. Os autores sugerem que o efeito nas fusões se deve pela distância entre as duas enzimas usadas para a construção da fusão e pelos diferentes tipos de fusões realizadas. Os autores ressaltam que é conveniente desenhar um *linker* em um *web Server*, porém, é necessário otimizar seu comprimento para uso prático. Desta forma,

fica claro que mudanças no comprimento, composição e estrutura do *linker* podem afetar o desempenho das unidades e também da fusão. Por isso, há a necessidade de otimizar o *linker* para a construção de uma quimera funcional.

O *linker* usado na fusão ThEg3Xyn3 não foi desenhado e nem analisado em um *web Server*. Ele foi desenhado com base naquele de Adlakha *et al.* (2011), que desenharam um *linker* de dez resíduos, composto por glicinas e serinas. Apesar de Markaryan *et al.* (1999) verificarem que proteínas com sítios de Gly-Ser são mais sensíveis à clivagem proteolítica durante a expressão em *P. pastoris*, não foi verificada qualquer tipo de clivagem na ThEg3Xyn3.

Segundo Adlakha *et al.* (2011), uma maneira de solucionar a redução de atividade, é expressar a quimera com vários *linkers* e verificar qual deles faz com que a enzima apresente melhor atividade, e qual permite que as propriedades estruturais secundárias da proteína sejam mais próximas às nativas. Nesse presente trabalho, somente um *linker* foi desenhado para a quimera ThEg3Xyn3 e não foram realizados ensaios para a sua otimização, já que a mesma, em um primeiro momento, se mostrou estável e ativa.

Von Ossowski *et al.* (2005), observaram em seu trabalho que as O-glicosilações também são importantes para a estabilização de um *linker*. Entretanto, não foram verificadas possíveis glicosilações na quimera ThEg3Xyn3, visto que o tamanho da proteína expressa é muito similar ao predito. Os autores supracitados também analisaram um *linker* de 88 resíduos responsável por conectar dois domínios de tamanhos similares em uma celulase dupla quimérica. O *linker* mostrou-se flexível e desordenado, adotando conformações compactas e estendidas, assim como o de algumas celulasas que possuem dois módulos. Portanto, os autores afirmam que um *linker* pode adotar várias conformações juntamente com muitas diferenças de distância entre as enzimas.

Outras fusões que tem demonstrado bons resultados são aquelas em que há a fusão de um CBM a uma enzima desprovida deste tipo de módulo, ou até mesmo, um módulo adicional.

A EGIII utilizada na construção de ThEg3Xyn3 não possui CBM. Os trabalhos relatados a seguir, demonstram que a ligação de um CBM a endoglucanases dão a estas enzimas, além de maior atividade sobre CMC, a capacidade de hidrolisar Avicel.

Telke *et al.* (2012) fizeram uma quimera adicionando um CBM de *Clostridium thermocellum* à Cel9A de *Alicyclobacillus acidocaldrius*. A Cel9A é uma endoglucanase desprovida de CBM e acredita-se que por essa razão ela apresente baixa atividade hidrolítica. Eles observaram que a quimera tinha um aumento de atividade não só para CMC como também para Avicel. Seria bastante interessante em uma fusão como a ThEg3Xyn3, possuir uma endoglucanase não só com aumento de atividade contra substrato solúvel (CMC), como também ao insolúvel (Avicel), pois somente as celobiohidrolases possuem a

capacidade de hidrolisar eficientemente Avicel. Assim, em uma única quimera haveria a atividade de três enzimas: endoglucanase, xilanase e celobiohidrolase.

Kim *et al.* (2010), também observaram um aumento de atividade contra Avicel quando adicionaram um CBM a seis CDs de endoglucanases bacterianas.

Outros estudos também demonstram o potencial emprego de CBM para modificações de atividade de uma enzima. Kim *et al.* (1998), verificaram que substituindo o CBD de uma endoglucanase de *B. subtilis* pelo da CBHI de *T. viride*, havia uma maior capacidade de ligação e atividade hidrolítica sobre celulose microcristalina. Limon *et al.* (2001), adicionaram o CBM de CBHI de *T. reesei* a uma quitinase de *T. harzianum*, que resultou em aumento da atividade hidrolítica em substratos insolúveis. O que se verifica na maior parte destes trabalhos é que as celulasas fusionadas com CBM aumentam a atividade para celulose microcristalina, mas nem sempre para CMC. Wang *et al.* (2012b), sugerem que isso se deve ao fato do CBM competir com o CD e conseqüentemente levar a queda de atividade contra este substrato.

Há também estudos que envolvem a adição de CD às enzimas, como foi feito por Liu *et al.* (2006), que fusionaram a uma *EgIV* um CD adicional, resultando em um aumento da atividade específica em quatro vezes. Porém, em alguns casos, esta melhora na atividade não é alcançada.

A fusão das enzimas EGIII e Xyn3 para originar a ThEg3Xyn3 foi realizada por meio de clivagens com enzimas de restrição e ligação. Entretanto, Lu (2005), em uma revisão, afirma que componentes de moléculas híbridas devem ser trabalhados precisamente, sem a presença de sequências extras intervenientes e indesejáveis. Segundo o mesmo autor, a técnica clássica de fusão gênica, que envolve o uso de enzimas de restrição, pode deixar para trás sequências adicionais, como as dos sítios de restrição, na junção das enzimas. A introdução extra de resíduos de aminoácidos nas junções pode ter efeitos indesejados sobre a estrutura e atividade da proteína de fusão e assim interferir no estudo acurado da fusão gênica. Para que esse tipo de problema não ocorra, é que existe a clonagem "*sem costuras*", a qual permite que a fusão seja precisa, contínua e que os fragmentos de DNA sejam unidos sem a adição de qualquer nucleotídeo nas junções dos fragmentos. Com o advento da PCR, vários métodos e abordagens para fusão gênica tem sido propostos, como por exemplo, DNA *shuffling* e PCR *overlap*.

Os estudos estruturais da ThEg3Xyn3 ainda não foram realizados, portanto, ainda não se pode afirmar quais foram as causas da queda de atividade de EGIII, sendo assim, qualquer uma das situações citadas acima podem ter ocorrido. Mutagêneses aleatórias podem ser usadas para restabelecer a atividade da enzima, presumidamente por restaurar interações adequadas, como o enovelamento, estabilidade e formação estrutural correta (Nixon *et al.*, 1998).

Até o momento, este é o primeiro trabalho que relata a construção de uma fusão usando as enzimas EGIII e Xyn3 do fungo *T. harzianum*. Esta quimera foi construída com o intuito de se ter em uma única enzima a capacidade de hidrólise da celulose e da hemicelulose, já que os processos usados para pré-tratamento da biomassa para que a celulose se torne disponível para a ação de celulases, além de caro, pode ter efeitos negativos sobre a fermentação.

O estudo detalhado de enzimas de fusão pode minimizar os custos para a produção de bioetanol, fazendo com que este tipo de combustível seja economicamente viável, pois a hidrólise da biomassa lignocelulósica requer a ação coordenada de múltiplas enzimas e ao se reduzir o número de enzimas necessárias para a mistura de reação de hidrólise, reduzirá também os custos efetivos no processo de produção de etanol advindo do bagaço da cana-de-açúcar.

A quimera ThEg3Xyn3 se mostra satisfatória para a redução de custos durante a sacarificação e fermentação. Pois em uma única enzima há a vantagem de se ter duas funções distintas, a atividade celulolítica e xilanolítica, juntamente com temperatura e pH ótimos desejáveis ao processo SSF. Outra vantagem é em ter a produção de uma enzima que executa a função seqüencial de duas enzimas, em um mesmo sistema, o que também gera economia. Além disso, há a possibilidade de se transformar um fungo com a enzima quimérica com objetivo de tê-la no próprio meio durante a fermentação e com maior produção.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir o seguinte:

- A construção do plasmídeo da enzima de fusão foi bem sucedida;
- A expressão da quimera recombinante ThEg3Xyn3 usando um sistema heterólogo em *Pichia pastoris* se mostrou eficiente, gerando proteína pura e em quantidade suficiente para estudos funcionais;
- A quimera se mostrou ativa em CMC e xilana *birchwood*;
- A ThEg3Xyn3 possui características adequadas de temperatura e pH para a sua aplicação em usinas para a produção de etanol a partir do bagaço da cana-de-açúcar;
- Mesmo a atividade de EGIII sendo menor na fusão do que quando comparada à sua parental, o fato dela estar associada à Xyn3 e as duas desempenharem seus papéis na degradação de celulose e hemicelulose, já faz com que a fusão seja vantajosa em relação à reação sequencial das mesmas enzimas usadas separadamente para um futuro uso comercial;
- A enzima de fusão se mostrou mais ativa do que suas parentais quando estas foram analisadas sob as mesmas condições ótimas da quimera. Tais condições ótimas são favoráveis àquelas necessárias para o uso de enzimas em sacarificação e fermentação simultâneas.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Pretende-se agora fazer os estudos estruturais da ThEg3Xyn3, a fim de se obter mais informações sobre a quimera, como a estrutura adquirida após a fusão e o que foi alterado em relação à estrutura das enzimas parentais.

A quimera apresentou características vantajosas de pH e temperatura para SSF, porém, uma das enzimas não alcançou a eficiência catalítica igual à sua parental, por isso, algumas abordagens, como mutagêneses aleatórias por DNA shuffling, adição de um CBM e variações de *linker*, serão estudadas para verificar qual melhor se adéqua para aumentar a eficiência catalítica de ThEg3Xyn3.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLAKHA, N. *et al.* Synthesis and characterization of chimeric proteins based on cellulase and xylanase from an insect gut bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n.14, p.4859-4866, 2011.

ALMEIDA, F. M. *Trichoderma harzianum*. Global Relva, 2009. Disponível em: http://globalrelva.org/index.php?view=article&catid=41%3Auniversal&id=188%3Atrichoderma-harzianum&format=pdf&option=com_content&Itemid=59. Acesso em 03 abr. 2011.

AN, J. M. *et al.* Evaluation of a novel bifunctional xylanase–cellulose constructed by gene fusion. **Enzyme and Microbial Technology**, v.36, p.989-995, 2005.

AWAFO, V. A. **Biosynthesis of cellulase-system from *Trichoderma reesei* and its characteristics**. Quebec, Canada, 1997. Tese (Ph.D.), McGill University.

AY, J. *et al.* Structure and function of the Bacillus hybrid enzyme Gluxyn-1: native-like jellyroll fold preserved after insertion of autonomous globular domain. **PNAS**, v.95, p.6613-6618, 1998.

BALBAS, P. Understanding the art of producing protein and nonprotein molecules in *Escherichia coli*. **Journal of Molecular Biology**, v.19, p.251-267, 2001.

BHAT, M. K. Research review paper: Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, p.355-383, 2000.

BAUDEL, H. M.; ZAROR, C; ABREU, C. A. M. Improving the value of sugarcane bagasse wastes via integrated chemical production systems: an environmentally friendly approach. **Industrial Crops and Products**, v.21, n.3, 309-315, 2005.

BAYER, E. A. *et al.* Cellulosomes-structure and ultrastructure. **Journal of Structural Biology**, v.124, p.221-234, 1998.

BEG, Q. K. *et al.* Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.56, p.326-338, 2001.

BEGUIN, P. Hybrid enzymes. **Current Opinion in Biotechnology**, v.10, p.336–340, 1999.

BHAT, M. K. Research review paper: Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, p.355-383, 2000.

BIELY, P. *et al.* Mode of action of three endo-beta-1,4-xylanases of *Streptomyces lividans*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1162, p.246-254, 1993.

BNDES & CGEE. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento**. Rio de Janeiro : BNDES, 316p., 2008.

BULOW, L. Characterization of an artificial bifunctional enzyme, betagalactosidase/galactokinase, prepared by gene fusion. **European Journal of Biochemistry**, v.163, n.3, p.443-448, 1987.

BULOW, L.; MOSBACH, K. Multienzyme systems obtained by gene fusion. **Trends Biotechnology**, v.9, p.226–231, 1991.

- CANTAREL, B. L. *et al.* The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. **Nucleic Acids Research**, v.37, p.D233-D238, 2009.
- CARDONA, C. A.; SÁNCHEZ, O. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. **Journal Bioresource Technology**, Review, v.98, p.103-110, 2007.
- CASTRO, A. M. *et al.* High-yield endoglucanase production by *Trichoderma harzianum* IOC-3844 cultivated in pretreated sugarcane mill by product. **Enzyme Research**, p.1-8, 2010a.
- CASTRO, A. M. *et al.* *Trichoderma harzianum* IOC-4038: A promising strain for the production of a cellulolytic complex with significant β -glucosidase activity from sugarcane bagasse cellulignin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.162, n.7, p.2111-2122, 2010b.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v.33, N1, p.181-188, 2010.
- CHEN, H. *et al.* Purification and characterization of novel bifunctional xylanase, *XynIII*, isolated from *Aspergillus niger* A-25. **Journal of Microbiology and Biotechnololy**, v.16, p.1132-1138, 2006.
- COLUSSI, F. *et al.* Purification, and biochemical and biophysical characterization of cellobiohydrolase I from *Trichoderma harzianum* IOC 3844. **Journal of Microbiology and Biotechnololy**, v.21, n.8, p.808-817, 2011.
- COLUSSI, F. *et al.* Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of the catalytic domain of the extracellular cellulase CBHI from *Trichoderma harzianum*. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v.66, p.1041-1044, 2010.
- CRASTO, C. J.; FENG, J. LINKER: a program to generate linker sequences for fusion proteins. **Protein Engineering Design and Selection**, v.13, p.309-312, 2000.
- CREGG J. M. *et al.* Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Molecular Biotechnology**, v.16, p.23-52, 2000.
- CREGG, J. M.; VEDVICK, T. S.; RASCHKE, W. C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. **Biotechnology**, v.11, n.8, p.905-910, 1993.
- DIN, N. *et al.* C1-Cx revisited: intramolecular synergism in a cellulase. **PNAS**, v.91, p.11383-11387, 1994.
- DIPARDO, J. **Outlook for biomass ethanol production and demand**. Washington: Energy Information Administration, Department of Energy, p.1-14, 2000.
- DODD, D.; CANN, I. K. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **Global Change Biology Bioenergy**, v.1, n.1, p.2-17, 2009.
- DOI, N.; YANAGAWA, H. Insertional gene fusion technology. **FEBS Letters**, v.457, n.1, p.1-4, 1999.
- EBRINGEROVÁ, A.; HEINZE T. Xylan and xylan derivatives – biopolymers with valuable properties, 1.Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. **Macromolecular Rapid Communications**, Review, v.21, n.9, p.542-556, 2000.

ERENO, D. Álcool de celulose: Bagaço e palha da cana são cotados para aumentar a produção de etanol. **Revista Fapesp Online**, ed. 133, março de 2007.

FAN, Z. *et al.* The construction and characterization of two xylan-degrading chimeric enzymes. **Biotechnology and Bioengineering**, v.102, n.3, p. 683-692, 2009a.

FAN, Z.; WERKMAN, J. R.; YUAN, L. Engineering of a multifunctional hemicellulase. **Biotechnology Letters**, v.31, p.751-757, 2009b.

FARIA, A. Y. K.; NETO, D. C.; ALBUQUERQUE, M. C. de F. Atividade antagônica *in vitro* de *Trichoderma harzianum* a patógenos de sementes de algodoeiro. **Revista Agrícola Tropical**, vol.6, n.1, p.59-68, 2002.

FERREIRA, V. *et al.* Simultaneous saccharification and fermentation process of different cellulosic substrates using a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* harbouring the β -glucosidase gene. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.13, n.2, p.1-7, 2010.

FLINT, H. J. *et al.* A bifunctional enzyme with separate xylanase and beta-(1,3-1,4)-glucanase domains, encoded by the *XynD* gene of *Ruminococcus Xavefaciens*. **Journal of Bacteriology**, v.175, p.2943-2951, 1993.

FORD, C. F.; SUOMINEN, I.; GLATZ, C.E. Fusion tails for the recovery and purification of recombinant proteins. **Protein Expression and Purification Journal**, v.2, p.95-107, 1991.

GALBE, M.; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.59, p.618-628, 2002.

GASTEIGER, E. *et al.* *Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server*; (In) John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press (2005). pp. 571-607

GENEROSO, W. C. *et al.* Recombinant expression and characterization of an endoglucanase III (cel12a) from *Trichoderma harzianum* (Hypocreaceae) in the yeast *Pichia pastoris*. **Genetics and Molecular Research**, v.11, n.2, p.1544-1557, 2012a.

GENEROSO, W. C. **Expressão recombinante e caracterização de uma endoxilanase não descrita de *Trichoderma harzianum***. São Carlos, 2012b, 76p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos.

GOKHALE, R. S.; KHOSLA, C. Role of linkers in communication between protein modules. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.4, n.1, p.22-27, 2000.

GREENE, N. *et al.* **Growing Energy: How Biofuels Can Help End America's Oil Dependence**. Natural Resources Defense Council, New York, 78p., 2004.

GUSTAVSSON, M. *et al.* Stable linker peptides for a cellulose-binding domain-lipase fusion protein expression in *Pichia pastoris*. **Protein Engineering Design and Selection**, v.14, p.711-715, 2001.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, p.95-98, 1999.

HEINZELMAN, P. *et al.* A family of thermostable fungal cellulases created by structure-guided recombination. **PNAS**, v.106, n.14, p.5610-5615, 2009.

HEINZELMAN, P. *et al.* Efficient screening of fungal cellobiohydrolase class I enzymes for thermostabilizing sequence blocks by SCHEMA structure-guided recombination. **Protein Engineering, Design & Selection**, v.23, n.11, p.871-880, 2010.

HENRISSAT, B.; DAVIES, G. J. Glycoside hydrolases and glycosyl-transferases. Families, modules, and implication for genomics. **Plant Physiology**, v.124, p.1515-1519, 2000.

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

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

HON, D. N. S. Cellulose: a random walk along its historical path. **Cellulose**, v.1, p.1-25, 1994.

HONG, S. Y. *et al.* Assembling a novel bifunctional cellulase–xylanase from *Thermotoga maritima* by end-to-end fusion. **Biotechnology Letters**, v.28, p.1857-1862, 2006.

HONG, S. Y. *et al.* Construction of the bifunctional enzyme cellulase-b-glucosidase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. **Biotechnology Letters**, v.29, p.931-936, 2007.

HOWARD, R. L. *et al.* Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, v.2, n.12, p.602-619, 2003.

HUANG, X.; HOLDEN, H. M.; RAUSHEL, F.M. Channeling of substrates and intermediates in enzyme-catalyzed reactions. **Annual Review of Biochemistry**, v.70, p.149-180, 2001.

JORDAN, N. *et al.* Sustainable development of the agricultural bio-economy. **Science**, v.316, p.1570-1571, 2007.

JUNG, E. D. *et al.* DNA sequences and expression in *Streptomyces lividans* of an exoglucanase gene and an endoglucanase gene from *Thermomonospora fusca*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.3032-3043, 1993.

KÁDÁR, ZS.; SZENGYEL, ZS.; RÉCZEY, K. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. **Industrial Crops and Products**, v.20, p.103-110, 2004.

KAR, S. *et al.* Production of cellulase-free xylanase by *Trichoderma reesei* SAF3. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, n.4, p.462-464, 2006.

KHANDEPARKER, R.; NUMAN, M. T. Bifunctional xylanases and their potential use in biotechnology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.35, p.635-644, 2008.

KIM, H. *et al.* Functional analysis of a hybrid endoglucanase of bacterial origin having a cellulose binding domain from a fungal exoglucanase. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.75, p.193-204, 1998.

KIM, T. W. *et al.* Binding modules alter the activity of chimeric cellulases: Effects of biomass pretreatment and enzyme source. **Biotechnology and Bioengineering**, v.107, n.4, p.601-611, 2010.

KITAGO, Y. *et al.* Crystal structure of Cel44A, a glycoside hydrolase family 44 endoglucanase from *Clostridium thermocellum*. **Journal of Biological Chemistry**, v.282, p. 35703-35711, 2007.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v.23, p.411-456, 1999.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.35, p.377-391, 2008.

LANTZ, S.E. *et al.* *Hypocrea jecorina* CEL6A protein engineering. **Biotechnology for Biofuels**, v.3, n.20, p.1-13, 2010.

LAUREANO-PEREZ, L. *et al.* Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass: characterization of pretreated corn stover. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.121-124, p.1081-1099, 2005.

LEE, J. M. *et al.* Molecular cloning and expression of the *Trichoderma harzianum* C4 Endo- β -1,4-xylanase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Microbiology and Biotechnology**, v.19, p.823-828, 2009.

LEMONS, M. A. *et al.* The enhancement of the cellulolytic activity of cellobiohydrolase I and endoglucanase by the addition of cellulose binding domains derived from *Trichoderma reesei*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, p.35-40, 2003.

LEVY, I.; PALDI, T.; SHOSEYOV O. Engineering a bifunctional starch-cellulase cross-bridge protein. **Biomaterials**, v.25, p.1841-1849, 2003.

LEVY, I.; SHOSEYOV, O. Cellulose-binding domains: industrial and biotechnological application. **Biotechnology Advances**, v.20, p.191-213, 2002.

LIMON, M. C. Addition of substrate-binding domains increases substrate-binding capacity and specific activity of a chitinase from *Trichoderma harzianum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 198, p.57-63, 2001.

LIU, G. *et al.* Improvement of the cellulolytic activity of *Trichoderma reesei* endoglucanase IV with an additional catalytic domain. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.22, p.1301-1305, 2006.

LU, P. *et al.* Construction and characterization of a bifunctional fusion enzyme of *Bacillus*-sourced beta-glucanase and xylanase expressed in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v.261, p.224-230, 2006.

LU, P.; FENG, M. G. Bifunctional enhancement of a β -glucanase-xylanase fusion enzyme by optimization of peptide linkers. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.79, p.579-587, 2008.

LU, Q. Seamless cloning and gene fusion. **Trends in Biotechnology**, v.23, n.4, p.199-207, 2005.

LYND, L. R. *et al.* How biotech can transform biofuels. **Nature biotechnology**, v.26, n.2, p.169-172, 2008.

LYND, L. R. *et al.* Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.66, n.3, p. 506-57, 2002.

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

MACARRÓN, R. *et al.* Mode of action of endoglucanase III from *Trichoderma reesei*. **Biochemical Journal**, v.289, p.867-873, 1993.

MALAGÓ-JR., W. **Clonagem e estudos de expressão de enzimas do fungo filamentosso trichoderma harzianum ioc-3844 envolvidas na degradação de biomassa**. São Carlos, 2012. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos.

MARGEOT, A. *et al.* New improvements for lignocellulosic ethanol. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p.372-380, 2009.

MARKARYAN, A. *et al.* Atypical processing of amyloid precursor fusion protein by proteolytic activity in *Pichia pastoris*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.262, n.1, p.263-268, 1999.

MELLO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, v.4, p.261-295, 1996.

MESTA, L. *et al.* Construction of a chimeric xylanase using multidomain enzymes from *Neocallimastix frontalis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.29, p.456–463, 2001.

MILES, E. W.; RHEE, S.; DAVIES, D. R. The molecular basis of substrate channelling. **Journal of Biological Chemistry**, v.274, p.12193-12196, 1999.

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

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.68, p.61-138, 2000.

MOHR, H.; SCHOPFER, P. **Plant physiology**. Berlin: Springer, 629p., 1995.

MORAÏS, S. *et al.* Cellulase-xylanase synergy in designer cellulosomes for enhanced degradation of a complex cellulosic substrate. **MBio**, v.1, n.5, p.1-8; 2010.

NAKAZAWA, H. *et al.* Directed evolution of endoglucanase III (Cel12A) from *Trichoderma reesei*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.83, p.649-657, 2009.

NATESH, R. *et al.* Crystal structure at 1.8 Å resolution and proposed amino acid sequence of a thermostable xylanase from *Thermoascus aurantiacus*. **Journal of Molecular Biology**, v.288, p.999-1012, 1999.

NIGAM, P.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, v.37, p.52-68, 2011.

NIXON, A. E.; OSTERMEIER, M.; BENKOVIC, S. J. Hybrid enzymes: manipulating enzyme design. **Trends Biotechnology**, v.16, p.258-264, 1998.

OKADA, H. *et al.* Identification of active site carboxylic residues in *Trichoderma reesei* endoglucanase Cel12A by site-directed mutagenesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.10, n.1, p.249-255, 2000.

- OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G. A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnology for Biofuels**, v.1, p.7, 2008.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.81–84, 2003.
- PITARELO, A. P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática**. Curitiba, 2007, 125p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná.
- POHLSCHRODER, M.; LESCHINE, S. B.; PAROLA, E. C. Multicomplexcellulase–xylanase system of *Clostridium papyrosolvens* C7. **Journal of Bacteriology**, v.176, p.70-76, 1994.
- POLIZELI, M. L. T. M. *et al.* Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.67, p.577–591, 2005.
- RAGHAVARAO, K. S. M. S., RANGANATHAN, T. V.; KARANTH, N.G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.127-135, 2003.
- REZENDE, M. I. *et al.* Xylanase production by *Trichoderma harzianum rifai* by solid state fermentation on sugarcane bagasse. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p.67-72, 2002.
- ROBINSON, T.; NIGAM, P. Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residue by solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.197-203, 2003.
- RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature Reviews**, v.454, p.841-845, 2008.
- SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.30, p.279-291, 2003.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- 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, p.295–310, 2001.
- SANDGREN, M.; STAHLBERGB, J.; MITCHINSONC, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Biophysics and Molecular Biology**, Review, v.89, p.246-291, 2005.
- SANTOS, M. M. *et al.* Thermal denaturation: is solid-state fermentation really a good technology for the production of enzymes? **Bioresource Technology**, v.93, p.261-268, 2004.
- SEO, H. S. *et al.* Characterization of a bifunctional enzyme fusion of trehalose-6-phosphate synthetase and trehalose-6-phosphate phosphatase of *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.2484-2490, 2000.
- SHEEHAN, J.; HIMMEL, M. Enzymes, energy, and the environment: A strategic perspective on the U.S. Department of Energy's research and development activities for bioethanol. **Biotechnology Progress**, v.15, p.817-827, 1999.

- SILVEIRA, F. Q. P. *et al.* Hydrolysis of xylans by enzyme system from solid cultures of *Trichoderma harzianum* strains. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.32, p.947-952, 1999.
- SIMS, R. E. H. *et al.* An overview of second generation biofuel technologies. **Bioresource Technology**, v.101, p.1570-1580, 2011.
- SINGH, A.; OLSEN, S. I. A critical review of biochemical conversion, sustainability and life cycle assessment of algal biofuels. **Applied Energy**, v.88, p.3548-3555, 2011.
- SLAUCH, J. M.; SILHAVY, T. J. Genetic fusions as experimental tools. **Methods in Enzymology**, v.204, p.213-248, 1991.
- STEPHANOPOULOS, G. Challenges in engineering microbes for biofuels production. **Science**, v.315, p.801-804, 2007.
- STREIT, W. R.; SCHMITZ, R. A. Metagenomics – the key to the uncultured microbes. **Current Opinion in Microbiology**, v.7, p.492-498, 2004.
- SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: Enzymology, molecular biology and application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.22, n.1, p. 33-46, 2002.
- SULZENBACHER, G. *et al.* The crystal structure of a 2-fluorocellootriosyl complex of the *Streptomyces lividans* endoglucanase CelB2 at 1.2 Å resolution. **Biochemistry**, v.38, p.4826-4833, 1999.
- SUN, J. *et al.* Construction and characterization of a fusion β -1,3-1,4-glucanase to improve hydrolytic activity and thermostability. **Biotechnology Letters**, v.33, p.2193-2199, 2011.
- SUN, R. C.; SUN, X. F.; ZHANG, S. H. Quantitative determination of hydroxycinnamic acids in wheat, rice, rye, and barley straws, maize stems, oil palm frond fiber, and fast-growing poplar wood. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.5122-5129, 2001.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulose materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v.83, n.1, p.1-11, 2002.
- TEERI, T. T. *et al.* *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose? **Biochemical Society Transactions**, v.26, p.173-178, 1998.
- TELKE, A. A. *et al.* Construction and characterization of chimeric cellulases with enhanced catalytic activity towards insoluble cellulosic substrates. **Bioresource Technology**, v.112, p.10-17, 2012.
- TSUJI, S. Y.; WU, N.; KHOSLA, C. Intermodular communication in polyketide synthases: comparing the role of protein–protein interactions to those in other multidomain proteins. **Biochemistry**, v.4, p.2317-2325, 2001.
- VAN WYK, J. P. Biotechnology and the utilization of biowaste as a resource for bioproduct development. **Trends Biotechnology**, v.19, p.172-177, 2001.
- VÁSQUEZ, M. P. *et al.* Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.137-140, n.1-12, p.141-53, 2007.

VOLKEL, T. *et al.* Optimized linker sequences for the expression of monomeric and dimeric bispecific single-chain diabodies. **Protein Engineering Design and Selection**, v.14, p.815-823, 2001.

VON OSSOWSKI, I. *et al.* Engineering the *exo*-loop of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase, Cel7A. A comparison with *Phanerochaete chrysosporium* Cel7D. **Journal of Molecular Biology**, v.333, n.4, p.817-829, 2003.

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

WACKETT, L. P. Biomass to fuels via microbial transformations. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.12, n.12, p.187-193, 2008.

WANG, M. *et al.* Cellulolytic enzyme production and enzymatic hydrolysis for second-generation bioethanol production. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.128, p.1-24, 2012a.

WANG, Y. *et al.* Chimeric cellulase matrix for investigating intramolecular synergism between non-hydrolytic disruptive functions of carbohydrate-binding modules and catalytic hydrolysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n.35, p.29569-29578, 2012b.

WATERHAM, H. R. *et al.* Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. **Gene**, v.186, p.37-44, 1997

ZHANG, J. *et al.* Comparison of the synergistic action of two thermostable xylanases from GH families 10 and 11 with thermostable cellulases in lignocellulose hydrolysis. **Bioresource Technology**, v.102, n.19, p.9090-9095, 2011a.

ZHANG, J. *et al.* Thermostable recombinant xylanases from *Nonomuraea flexuosa* and *Thermoascus aurantiacus* show distinct properties in the hydrolysis of xylans and pretreated wheat straw. **Biotechnology for Biofuels**, v.4, 12p., 2011b.

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

ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics**, v.9, n.40, p.1-8, 2008.

ANEXO I

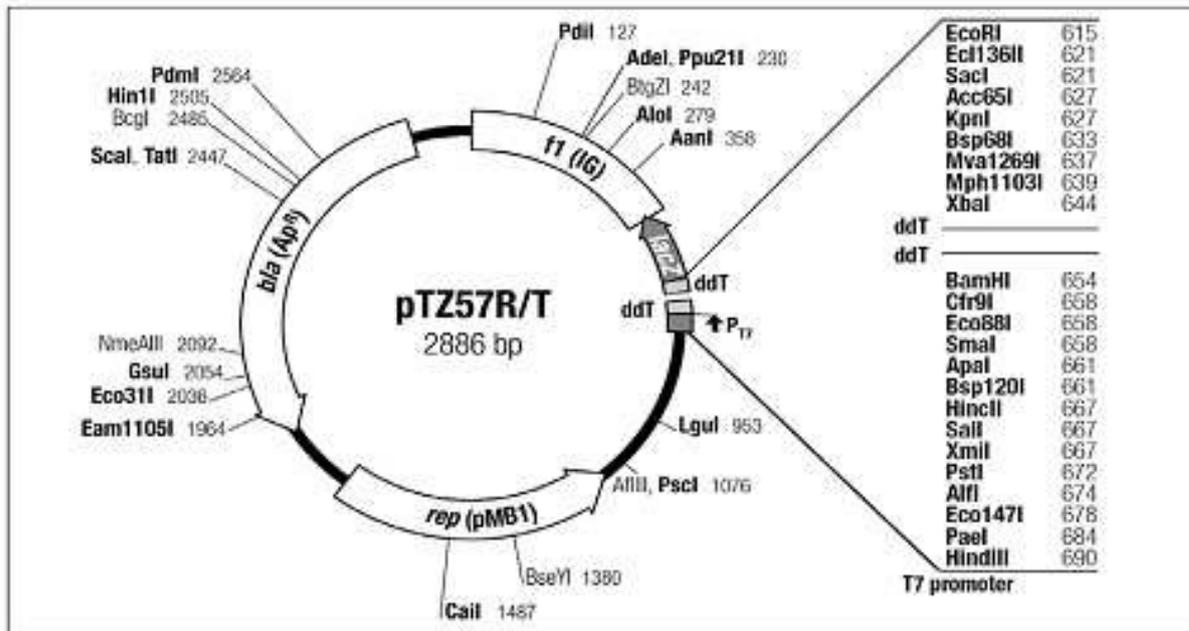


Figura 18. Mapa do vetor de propagação pTZ57RT (Fermentas). No mapa estão indicadas todas as enzimas de restrição que podem ser usadas para clonagem neste vetor.